

ISSN

VIRTUAL: 2708-0315
IMPRESO: 2225-8787



UNIVERSIDAD MAYOR, REAL Y PONTIFICIA DE
SAN FRANCISCO XAVIER
DE CHUQUISACA



XXIX
JORNADAS
DE JÓVENES
INVESTIGADORES
2022

7-8-9 / SEP 2022

“Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para
la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

Eje Ciencias Exactas

**AUTORIDADES DE LA
UNIVERSIDAD MAYOR REAL Y PONTIFICIA
SAN FRANCISCO XAVIER DE CHUQUISACA**

Ing. Walter Arízaga Cervantes
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD

Dr. Erick Gregorio Mita Arancibia
VICERRECTOR DE LA UNIVERSIDAD

**AUTORIDADES
ASOCIACIÓN DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO
“AUGM”**

Profa. Sandra Goulart Almeida
Rectora Universidade Federal de Minas Gerais
Presidenta de AUGM

Dr. Osvaldo Enrique Corrales Jorquera
Rector Universidad de Valparaíso
Vicepresidente de AUGM

Prof. Álvaro Rico
Secretario Ejecutivo

ASOCIACIÓN DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO MIEMBROS

ARGENTINA

Universidad de Buenos Aires (UBA)
Universidad Nacional de Córdoba (UNC)
Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo)
Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER)
Universidad Nacional del Litoral (UNL)
Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP)
Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)
Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires (UNNOBA)
Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)
Universidad Nacional de Rosario (UNR)
Universidad Nacional del Sur (UNS)
Universidad Nacional de San Luis (UNSL)
Universidad Nacional de Tucumán (UNT)

BOLIVIA

Universidad Mayor de San Andrés (UMSA)
Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca (UMRPSFXCH)
Universidad Mayor de San Simón (UMSS)

BRASIL

Universidade Federal do ABC (UFABC)
Universidade Federal de Goiás (UFG)
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FURG)
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Universidade de Brasília (UnB)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
Universidade de São Paulo (USP)

CHILE

Universidad de Chile (UChile)
Universidad de Playa Ancha (UPLA)
Universidad de Santiago de Chile (USACH)
Universidad de Valparaíso (UV)

PARAGUAY

Universidad Nacional de Asunción (UNA)
Universidad Nacional de Concepción (UNC)
Universidad Nacional del Este (UNE)
Universidad Nacional de Itapúa (UNI)

URUGUAY

Universidad de la República (UDELAR)

COMITE

**UNIVERSIDAD MAYOR REAL Y PONTIFICIA
SAN FRANCISCO XAVIER DE CHUQUISACA**

Ing. Walter Arízaga Cervantes

RECTOR

Dr. Erick Gregorio Mita Arancibia

VICERRECTOR

M.Sc. Cecilia Guevara Avilés

DIRECTORA RELACIONES INTERNACIONALES

Dr. Carlos Fernando Pinto Navia

DIRECTOR INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Dr. Juan Carlos Rojas Vidovic

DIRECTOR CENTRO ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Lic. Gualberto Ichazú Baldivieso

DIRECTOR ADMINISTRATIVO Y FINANCIERO

Lic. Jorge Fuentes Ávila

DIRECTOR PLANIFICACIÓN Y EVALUACIÓN INSTITUCIONAL

Lic. Antonio Oblitas Vedia

DIRECTOR PLANIFICACIÓN Y EVALUACIÓN ACADÉMICA

1. Caracterización funcional del síndrome de QT largo adquirido provocado por bloqueo de canales de Potasio hERG en corazones aislados de *Cavia porcellus* (cobayo)
2. Exploración de las emociones de agrado y desagrado de niños a través de las respuestas de ERD/ERS en las oscilaciones del electroencefalograma
3. Obtención de una formulación liposomal ultradeformable con potencial aplicación para la administración transdérmica de fármacos
4. Processamento e caracterização microestrutural de alumínio deformado plasticamente: Análise do incremento de nanoplaquetas de grafeno por forjamento de dobras acumulativas.
5. Estudio de la nucleación y post nucleación de la heteroestructura 2d bii3-grafeno.
6. Explorando disolventes verdes en síntesis orgánica y biocatálisis
7. Mecanismos de Deep Learning y Redes Neuronales para el Reconocimiento Efectivo del Iris
8. Modelización de las relaciones de colimación de un instrumento de radiografía de neutrones para el futuro Reactor Nuclear de Investigación (RNI) Boliviano
9. Revalorización de residuos de biomasa en la síntesis de novedosos agentes potencialmente bioactivos: estudio teórico-experimental
10. Sistema biaxial de seguimiento solar autónomo
11. Software para la obtención de la resistencia del suelo basado en los datos proporcionados por el Standard Penetration Test (SPT)
12. Vaporizador de inyección electrónica para líquidos anestésicos
13. Robot para Inspección de Sistemas de Saneamiento y Alcantarillado
14. Efecto de la frecuencia y altura de corte en la producción forrajera de *brachiaria brizantha* cv. Mg4, cuarto año de evaluación
15. Geração de malhas triangulares em geofísica

16. Aplicación in vivo de compuestos puros sobre bacterias del género *Xanthomonas* sp. causantes de Bacteriosis común en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.)
17. Actividad antifúngica de la fracción de alcaloides obtenida de hojas de *Prosopis nigra*
18. Búsqueda de microorganismos biotransformadores de cannabinoides en el microbioma de dos variedades de *Cannabis sativa* L. cultivada en Uruguay
19. Casca da jabuticaba liofilizada reduz os sinais clínicos e a incidência de tumores em camundongos com câncer colorretal
20. Composición de residuos de granos de quinua para la recuperación de metabolitos y aplicación como biopesticida
21. Distintas aproximaciones hacia la síntesis total de Quindolina
22. Estudio de la actividad antiviral de extractos de hojas de *Cannabis sativa* L. y *Cannabis indica* con distinto contenido de cannabinoides
23. Estudio estructural del alcaloide natural quinina basado en cálculos DFT
24. Genisteína y su acción en el microambiente oviductal bovino
25. Hidrólisis Enzimática de Colágeno de Piel de Surubí: Evaluación del Perfil Electroforético y Actividad Antioxidante
26. Produção de Biopesticida Natural em *Escherichia coli* Recombinant
27. Sustancias Bioactivas de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat: Aislamiento, Biodisponibilidad y Actividad Biológica de Compuestos Galoileados
28. Análisis de Estilos de Aprendizaje Mediante Minería de Datos
29. DRL for Inter-Slice Resource Allocation in 5G Networks
30. Minería de datos aplicada a salud mental en trabajadores de Tecnología de la Información, Paraguay
31. Um Sistema de Detecção de Intrusão Interno Baseado em Fog Computing para Redes IoT com Restrição de Recursos
32. Análisis de mezclas de derivados proteicos de espirulina y caseinato de sodio con miras al diseño de productos lácteos con valor agregado
33. Sistemas 1D acoplados débilmente por intercambio

34. USO DE HERRAMIENTAS BIOFÍSICAS PARA LA COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA APLICADOS AL ESTUDIO DEL DETERIORO EN SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.).
35. Análisis de discriminabilidad multiestado en sistemas ICC basado en respuestas SSVEP evocadas por fuentes luminosas parpadeantes de frecuencia única
36. Aplicación de dosificación experimental IBRACON IPT en hormigones en base a 3 bancos de agregado laterítico de Beni – Riberalta
37. Material renovable electroactivo para la captura y el control de CO₂ a bajas Concentraciones
38. Nanoarquitectura a base de WO₃/BiVO₄ para produção de hidrogênio verde
39. “Síntesis y caracterización de materiales catódicos LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄ obtenidos por el método sol-gel para su evaluación preliminar en una celda de ion litio”
40. Atributo de calidad evaluado en paltasposcosecha tratadas con UV-C
41. Extracción líquido-líquido de Cobalto (II) desde soluciones acuosas usando líquidos iónicos como diluyentes y Cyanex 272 como extractante
42. Caracterización Acústica Direccional en Caverna de las Brujas
43. Elaboración de un nuevo producto sustituto de la madera tradicional, mediante el reciclado de papel periódico
44. Evaluación de eficiencia energética y emisiones en cocinas mejoradas a biomasa bajo la norma ISO 19867:1-2018
45. Pyronin Y, un colorante de ácidos nucleicos con altas prestaciones para detección temprana de NETosis mediante microscopía de fluorescencia multimodal.
46. Secuestro de Cu⁺² en columnas de lecho fijo elaborado con alginato pseudoplástico
47. Transformando la evaluación científica en las políticas de Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI) de América Latina y el Caribe: un estudio desde la altimetría
48. Efecto de bioestimulantes en la germinación y desarrollo de plantas mutantes de *Hibiscus sabdariffa* L.
49. Actividad antifúngica de R-citronellal, componente mayoritario del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) frente *Sporothrix brasiliensis*
50. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA BIOMASSA DO FUNGO ENDOFÍTICO *Glomerella cingulata*
51. Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas

52. Síntesis de Derivados Esteroidales Bioactivos vía Reacciones Multicomponente de Ugi- Smiles. Nueva Ruta Sintética hacia 3 aminonitroestronas N,N-disustituídas con Potencial Actividad Antiproliferativa y Antiviral.
53. Tradescantia ¿Ornamental o Medicinal? Caracterización Química de la Tradescantia pallida en Paraguay
54. Uso de herramientas informáticas para la gestión documental en trabajos de investigación, Facultad de Enfermería y Obstetricia, San Lorenzo-Paraguay
55. Influencia de la temperatura de síntesis en el tamaño de las ZnO-Ps. Determinación del área superficial
56. Análisis cuantitativo de las condiciones ambientales en espacios de exhibición y de almacenamiento en un museo de historia natural y su relación con el deterioro de los ejemplares biológicos
57. Nuevos complejos heterolépticos [Cu(6-[(quinolin-2-il-metilen)amino]-2H-cromen-2-ona)(PP)]+, con potencialidades fotofísicas, donde PP corresponden a ligandos derivados de fenil-fosfínas.
58. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos polifenólicos en vainas de Mucuna pruriens y su actividad antioxidante, optimizada por metodología de superficie de respuesta

“Caracterización funcional del síndrome de QT largo adquirido
provocado por bloqueo de canales de Potasio hERG en corazones
aislados de *Cavia porcellus* (cobayo)”



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



C.23. Biofísica.

"Caracterización funcional del síndrome de QT largo adquirido provocado por bloqueo de canales de Potasio hERG en corazones aislados de Cavia porcellus (cobayo)"

Autora: **Chavarría**, Luisina; luisina.chava@hotmail.com

Co-autor(es): **Santander**, Axel; axelsantander@gmail.com ; **Solaro**, Paulina; paulinasolaro@gmail.com; **Souto**, Maira; maira.i.souto@gmail.com ; **Valentini**, Agustín; agusvalentinif@gmail.com

Profesor/a guía: **Ferreira**, Gonzalo; ferreiragon@gmail.com

Universidad de la República.

RESUMEN.

El **síndrome de QT largo (SQTL)** abarca gran número de anomalías generalmente desencadenadas por alteraciones del normal funcionamiento de **canales iónicos cardíacos**. Se caracteriza por la prolongación de la despolarización cardíaca, que genera el aumento del tiempo del intervalo QT del electrocardiograma. **Puede derivar en alteraciones graves de la funcionalidad cardíaca** (ej. arritmias ventriculares). Los SQTL pueden ser congénitos o adquiridos.

El objetivo fue **caracterizar la curva dosis-respuesta de función cardíaca en corazón aislado (Cavia Porcellus) de un fármaco específico para canales de potasio hERG, Dofetilide (DFT), que**

provoca SQTL, y su posterior contraste con la **administración previa y posterior de nanomicelas ultrasonificadas de lípidos comunes a las membranas**.

Se utilizó un dispositivo de retroperfusión coronaria Langendorf, por donde se perfundió al corazón solución Tyrode 1.8mM, y los distintos agentes a explorar por otro set de tubuladuras (nanomicelas y DFT). Se registró **actividad contráctil** (mediante sistema de transducción de tensión) **y eléctrica del corazón** (mediante electrodos de plata clorurados). Ambas señales fueron procesadas y visualizadas mediante el software Axoscope 9.2. **La aplicación de nanomicelas ultrasonificadas antes o después de la aplicación de DFT, muestra que la curva dosis respuesta denota un enorme desplazamiento a**



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



AÑOS

valores mayores de DFT, lo que sugiere que dichas nanomicelas tienen un potente efecto preventivo y terapéutico para tratar SQTL provocado por hERG. Estos resultados comprenden una experiencia piloto innovadora para tratamientos preventivos y/o terapéuticos reversibles de SQTL por la aplicación de nanomicelas.

Palabras clave: nanomicelas, SQTL, hERG.

INTRODUCCIÓN.

En Uruguay las enfermedades del sistema circulatorio son la principal causa de muerte constituyendo 28,1% de las defunciones. Dentro de éstas, las segundas más frecuentes son las arritmias. (Presidencia de la República. Mides, 2015). El SQTL es una causa muy frecuente de arritmia. El canal de potasio hERG es un blanco farmacológico frecuente en la generación de SQTL adquirido.

Con el fin de comprender mejor los factores anteriormente mencionados, se da inicio a una breve descripción conceptual de estos términos, sus relaciones e importancia.

Una de las características del corazón es que posee actividad marcapasos. Sus células son capaces de descargar espontáneamente potenciales de acción (PA), que se propagan hacia el resto de las células (sincicio funcional). Esta función radica primariamente en las células del nodo sinusal, cuyo potencial de membrana es más despolarizado cercano al umbral, permitiéndole determinar la frecuencia de descarga. A partir de este punto se van despolarizando las demás células encargadas de la conducción eléctrica, a distintos niveles del corazón (Best CH, Taylor NB, Dvorkin MA, Cardinali DP, Iermoli RH, 2010).

Para evaluar la actividad eléctrica de forma extracelular, se puede realizar un electrocardiograma (ECG). La onda P corresponde a la actividad auricular mientras que el complejo QRS se corresponde a la fase 0 del PA ventricular, el segmento ST a la meseta (fase 2) y la onda T a la repolarización tardía (fase 3). El complejo QRS y onda T representan un promedio de todas las despolarizaciones y repolarizaciones de PA ventriculares. Por ello, la duración del intervalo QT se aproxima a la duración de la meseta del PA y por ende permite estimar trastornos



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



sobre canales iónicos claves para la duración de la meseta del PA (Cingolani H, 2000), central en el marco del **Síndrome de QT Largo (SQTL)**.

El SQTL es un desorden en el que se manifiestan potenciales de acción ventriculares prolongados a expensas de la meseta. Recibe esta nominación dado a que en el ECG se observa una prolongación del intervalo QT ("Arrhythmias - Long QT Syndrome | NHLBI, NIH," 2021). Puede ser congénito o adquirido. Como el potencial de acción en los miocitos está determinado por el balance dinámico entre las corrientes iónicas de entrada y de salida, una disminución en las corrientes de K⁺ salientes repolarizantes y/o un incremento de las corrientes de Na⁺ o Ca²⁺ entrantes despolarizantes, puede derivar en el alargamiento del intervalo QT como ocurre en SQTL (Schwartz PJ, Crotti L, 2012).

Ello facilita la aparición de postdespolarizaciones precoces (PDPs) o early after depolarizations (ADP) en inglés. Las PDPs al alcanzar una amplitud umbral pueden desencadenar una taquicardia ventricular (TV) característica conocida como "torsade de pointes" (TdP) (Lanzotti ME, 1983), caracterizada por

tener complejos QRS que cambian constantemente sus ejes y su amplitud alrededor de una línea de base (Boron W, 2017) , pudiendo provocar síncope, fibrilación ventricular y en la quinta parte de los casos, muerte súbita (Höcht C, Opezzo JAW, 2004).

EL SQTL congénito se produce generalmente por defectos genéticos en canales iónicos del miocardio o proteínas asociadas habiéndose descrito hasta hoy 12 de ellos (Cingolani H, 2000). Los más comunes, mayoritariamente afectan los dos canales de potasio responsables de las corrientes I_{Ks} e I_{Kr} y el canal de sodio encargado de la corriente rápida (Camm et al., 2000). El SQTL1 se debe a una mutación de canal KvLQT1 o KCNQ1, disminuyendo I_{Ks}. **El SQTL2 tiene como causa la mutación del canal hERG, disminuyendo I_{Kr}**. Estos terminan afectando la corriente de repolarización tardía. El SQTL3 se da por una mutación de la subunidad alfa del canal de Na⁺ cardíaco- Nav 1.5, llevando a que la corriente despolarizante de sodio (I_{Na+}) perdure por mayor tiempo porque se inactiva menos. Otro de ellos SQTL4, puede afectar también transportadores de membrana conocidos como Na/K ATPasa e intercambiador Na/Ca²⁺. SQTL7 afecta



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



AÑOS

otros canales de K⁺ (Kir) afectando la corriente rectificadora entrante (IK1). El SQT18 afecta los canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes tipo L (Cav 1.2), por pérdida de la inactivación, llevando a un aumento de I_{Ca}. Este tipo es uno de los más peligrosos, acudiéndose a tratamiento con bloqueantes de canales de Ca²⁺. Los SQT1 tipo 9, 10 y 12 afectan al canal de Na⁺ por mutación de subunidades (tipo 10) o proteínas reguladoras (caveolina 3- tipo 9 y sintrofina- tipo 12), aumentando a I_{Na} (Kramer DB, 2011). SQT11 se debe a mutaciones de AKAP, proteína central para direccionar la fosforilación y modulación del canal Cav1.2. **La forma adquirida del SQT es mucho más frecuente** y puede deberse a diversos trastornos electrolíticos (ejemplos: hipopotasemia o hipercalemia) o por **efecto de medicación prescrita o de libre disposición** (Boron W, 2017) sobre canales iónicos.

Existe una amplia lista de fármacos de uso común que suelen prolongar el intervalo QT. Se destacan algunas clases: anti-arrítmicos de clase IA y III, anti-fúngicos (ej: ketoconazole), antihistamínicos (ej: terfenadina y astemizol), gran variedad de antibióticos

(ej: eritromicina, antihiperlipidémicos (ej: probucol), antipsicóticos (haloperidol) (Turker I, Ai T, Itoh H, 2017). Muchas de estas drogas que inducen alargamiento del intervalo QT afectan al canal responsable del componente rápido de la corriente rectificadora tardía (IK_r) hERG, y con menos frecuencia a los canales de IKs (Litwin JS, Kleiman RB, 2008).

El canal hERG es más propenso a bloqueo debido a características estructurales que lo dotan de mayor susceptibilidad al bloqueo por algunos fármacos. Los **aminoácidos aromáticos con cadenas dirigidas hacia el centro del poro** proporcionan gran afinidad en sitios de unión para compuestos que forman parte de muchos fármacos. Como no suelen estar presentes en otros canales de potasio, el bloqueo en ellos es menos frecuente. También, estos canales **carecen de dos residuos de prolina** (presentes en el resto de los canales) en la parte del poro, los cuales evitan el acceso al sitio de unión a moléculas tales como el fármaco utilizado (Kallergis, Goudis, Simantirakis, Kochiadakis, & Vardas, 2012). De acuerdo con Vandenberg et al (2012) (Vandenberg et al., 2012) sobre los aspectos estructurales del canal, la



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

proteína hERG codificada por el gen KCNH2 posee seis segmentos transmembrana (S1-S6). El sensor de voltaje (segmento S4), posee cargas positivas que actúan como sensor para la apertura del canal con el potencial de membrana. Los segmentos S5-S6 forman parte del poro del canal. Los otros segmentos importan para el anclaje del canal a la membrana e interacción con lípidos y proteínas de membrana. La estructura entera consiste en un tetrámero, con los dominios del poro de cada monómero, enfrentando el centro del canal. En adición a la estructura transmembrana del canal, estos tienen largos dominios citoplasmáticos C y N terminal (C por COOH, carboxilo y N por NH₃, amino). Éste es un canal selectivo al Potasio (K⁺) y regulado por voltaje, el cual se manifiesta como el componente rápido de la corriente rectificadora tardía de Potasio cardíaca (IKr). Pueden existir en estado "cerrado", "abierto" o "inactivado". Es importante notar que el proceso de inactivación es bastante inusual porque se da más rápidamente que la deactivación/cierre y es voltaje dependiente (Zhang M, Liu J, 2004). Estas características explican su rol fisiológico en la determinación de la duración de la meseta del potencial de

acción. También se especula que tienen cierta contribución en la actividad marcapasos en el nodo sinoauricular (SA) y aurículo-ventricular (AV) (Vandenberg et al., 2012).

Dofetilide es un fármaco que bloquea fuertemente y de forma específica a hERG, siendo una herramienta práctica para provocar SQT/L por hERG en este estudio. Corresponde a un antiarrítmico de clase III que se usa en el síndrome de QT corto (Saliba, 2001). Es una "metanesulfonamida" con fórmula global C₁₉H₂₇N₃O₅S₂ cuyo nombre químico IUPAC es "N-[4-[2-[2-[4-(methanesulfonamido)phenoxy]ethylmethylamino]ethyl]phenyl]methanesulfonamide". Al bloquear hERG, suprime de forma selectiva IKr y en dosis adecuadas no presenta efectos sobre el componente lento (IKs), ni la corriente rectificadora entrante (IK1), ni tampoco efectos sobre los canales de Na⁺ y Ca²⁺. Esto provoca el alargamiento de la duración del potencial de acción, lo cual explica su efecto arritmogénico (Roukoz H, 2007). La interacción que posee esta droga con el canal se torna complicada de analizar debido a la compleja cinética que posee, estimándose que en el bloqueo están involucradas interacciones con los



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



AÑOS

estados abierto e inactivado, hallándose a su vez que si bien se requiere despolarización, es independiente del potencial de membrana ante despolarizaciones prolongadas en el tiempo (Weerapura M, Hébert TE, 2002)

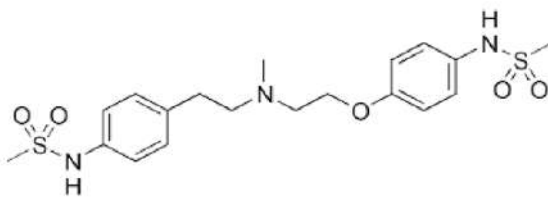


Fig.1- Estructura de Dofetilide.

Basándose en ello, se decide probar si vesículas ultrasonicadas de la mezcla de glicerofosfolípidos de membrana (NTFL), es capaz de prevenir o tratar los casos en que el canal hERG es bloqueado (lo cual sucede con un enorme número de fármacos de uso común). La mayoría de los componentes de NTFL promueven la apertura del canal hERG, por lo cual decidimos estudiar su posible efecto preventivo o terapéutico en caso de SQT/L adquirido por bloqueo de HERG.

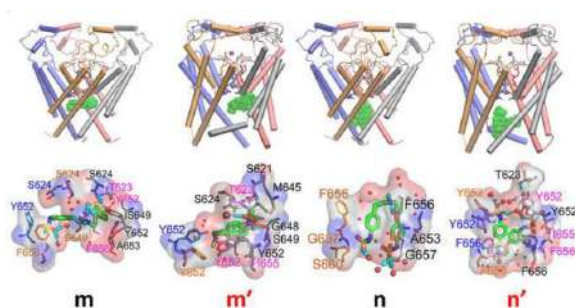


Fig.2- Bloqueo de canal hERG por DFT (Wang et al., 2016). En verde se indica la presencia de DFT dentro del canal hERG lo que causa su bloqueo. La afinidad de DFT por residuos aromáticos y cisteínas es central. Medios que abran las compuertas en S5 y S6 donde se cruzan las mismas, facilitarán la salida de DFT de la cavidad de hERG y por tanto evitarán el bloqueo, Los lípidos de nanomicelas de NTFL contribuyen a ello.

El producto **NTFL** es utilizado para la terapia de reposición lipídica (MLR-Membrane-Lipid-Replacement). Este producto reproduce la composición de la mayor parte de las membranas biológicas habiéndose probado como sumamente efectivo en incorporarse en minutos a las membranas biológicas (Nicolson & ME, 2014). Su composición lipídica es variada, incluyendo tanto Glicerofosfolípidos comunes de membrana (fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, ácido fosfátidico, digalactosyaldicglicerol, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina entre otros), así como ácidos grasos insaturados (ácido linoleico, palmítico, oleico, linolenico y esteárico), siendo los más abundantes de cada grupo los primeros de cada listado,



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



con porcentajes de 31% y 58% respectivamente (Nicolson, 2016). Además, también poseen antioxidantes para proteger a los glicerofosfolípidos de la peroxidación de lípidos de membrana, con lo cual no solo rellenan posibles discontinuidades de la membrana, sino que mejora y repara el daño al que se ven sometidos permanentemente las membranas biológicas (Nicolson GL, Ferreira G, Settineri R, Ellithorpe RR, Breeding P, 2018). Estas partículas lipídicas reconstituidas como nanomicelas, se han probado como relevantes en terapia a nivel molecular en espermatozoides por el Laboratorio de Canales Iónicos y otros (Ferreira G, Costa C, Bassaizteguy V, Santos M, Cardozo R, Montes J, 2018), existiendo abundantes resultados logrados acerca de la exploración de ensayos piloto con uso de estas nanomicelas (Nicolson GL, Rosenblatt S, Ferreira de Mattos G, Settineri R, Breeding PC, Ellithorpe RR, 2016). Ha demostrado eficacia para la disminución de los síntomas de varias enfermedades crónicas que implican daño de membranas biológicas (Nicolson GL, Settineri R, Ferreira G, 2018). Asimismo, su administración no presenta riesgos para la salud humana. Por ello, está aprobado su uso por la FDA ("U.S

Federal Drug Administration") dentro de la categoría GRAS ("Generally Recognized as Safe"). Inclusive, altas dosis de fosfolípidos de membrana han sido suministrados a animales y humanos sin aparente toxicidad, existiendo también efectos positivos demostrados sobre los niveles de algunos parámetros sanguíneos (ej: incremento de niveles plasmáticos de HDL- High Density Lipoprotein y apolipoproteína A1 y reducción de los niveles de triglicéridos) (Nicolson, 2016).

En este proyecto se realizó un ensayo piloto particular con el SQTl adquirido provocado por bloqueo de hERG con Dofetilide usando NTFL como nanomicelas aplicadas a cardiomiocitos con este síndrome. Es de resaltar que hERG es ampliamente modulado por los lípidos de membrana, por lo cual es esperable que las nanomicelas, modulen la actividad de este canal, pudiendo cambiar sus distintos estados cinéticos y por tanto su bloqueo.

OBJETIVOS.

El objetivo general de este proyecto, fue **estudiar el síndrome de QT largo adquirido en corazón aislado de**



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



cobayo y su vinculación con la alteración funcional cardíaca.

La hipótesis general de trabajo es que dado que este síndrome se caracteriza por un alargamiento de la meseta del potencial de acción ante la acción de fármacos o sustancias sobre ciertos canales centrales para la función cardíaca, es esperable ver una alteración de la funcionalidad cardíaca ante la exposición de los fármacos o sustancias que provocan este síndrome adquirido, existiendo mayor probabilidad de arritmias (por ejemplo, las provocadas por post despolarizaciones tempranas, en inglés "early-after-depolarizations") y anomalías contráctiles.

- a. **Objetivo específico 1:** *estudiar las curvas dosis-respuesta en relación con la duración del potencial de acción (despolarización ventricular) y respuesta contráctil (amplitud de la contractilidad), provocadas por exposición extracelular al antiarrítmico clase III "Dofetilide", en corazones aislados de cobayo.*

La **hipótesis de trabajo 1**, es que dado que el canal de potasio hERG ("human Ether-à-go-go-Related Gene Potassium channel"), canal bloqueable por Dofetilide, es central

para la repolarización y terminación de la meseta ventricular, es esperable que se prolongue esta fase de meseta en los potenciales de acción monofásicos registrados. Concomitantemente, dado que la meseta se prolonga, implica un aumento más pronunciado del calcio intracelular por mayor influjo por los canales de calcio tipo L de la membrana (Cav 1.2), esperando apreciar contracciones largas y mantenidas.

- b. **Objetivo específico 2:** *analizar si el suministro previo de nanomicelas hechas con lípidos comunes a las membranas celulares, es capaz de mitigar el bloqueo y generación del síndrome de QT largo adquirido.* Dicha preparación compuesta de lípidos comunes a las membranas celulares, resistentes a la oxidación, se abrevian como NTFL, y presentan una composición definida. Cabe destacar que este laboratorio ha realizado estandarización de tiempos y concentraciones de nanomicelas activas en espermatozoides, observando su incorporación a las membranas biológicas mediante microscopía electrónica.



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



AÑOS

La **hipótesis de trabajo 2** es que, dado que hERG es ampliamente modulado por la composición lipídica de la membrana, esperamos por ello, que el tratamiento con nanomicelas pueda influir en el síndrome de QT largo adquirido. Para este objetivo, se repetirán las curvas dosis-respuesta del objetivo 1, y se reportará si hay cambios estadísticamente significativos o no, en sus parámetros.

- c. **Objetivo específico 3:** *analizar si una vez que se instaura el síndrome de QT largo adquirido por nuestro fármaco modelo (Dofetilide), la aplicación extracelular de nanomicelas es capaz de mitigar terapéuticamente los efectos de este fármaco.* De esta manera, el objetivo 2 evalúa la capacidad de prevención del QT largo de las nanomicelas debido al bloqueo del canal hERG, y el objetivo 3 evalúa la posibilidad de uso terapéutico de las nanomicelas una vez configurado el cuadro. **La hipótesis de trabajo 3** es que, dado que hERG es ampliamente modulado por la composición lipídica de la membrana, se espera por ello, que el tratamiento con nanomicelas

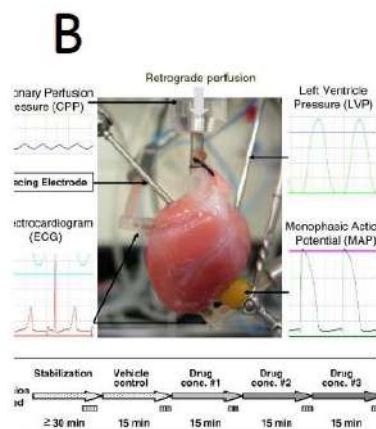
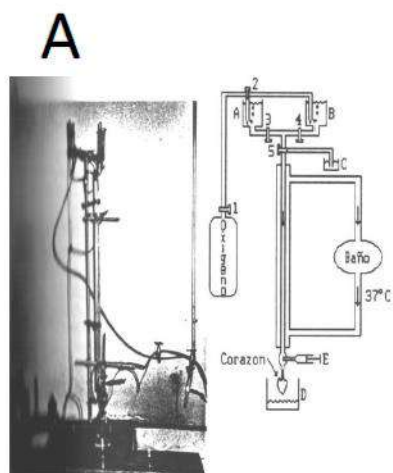
pueda influir en el síndrome de QT largo adquirido. Para este objetivo, se repetirán las curvas dosis-respuesta del objetivo 1, y se reportará si hay cambios estadísticamente significativos o no de sus parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS.

En líneas generales, para el estudio del SQT largo adquirido y su repercusión cardíaca, se realizaron **estudios a nivel de órgano entero (estudio macroscópico)** del modelo de experimentación (corazón aislado de cobayo). Para ello, previamente se realizó la **extracción y aislamiento** del corazón desde el animal sacrificado por dislocación cervical (protocolos aprobados por CHEA- Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Facultad de Medicina, Exp N° 070153-000235-18 y Exp 070153-000793-20). Luego se efectuó la canulación del corazón por medio una cánula de vidrio que introdujimos en la arteria Aorta para realizar retroperfusión coronaria por el método de Langendorff. Por este medio se suministra solución fisiológica (Tyrode) con la composición iónica y energética necesaria para su funcionamiento normal,

así como también los distintos fármacos o preparados a explorar por otro set de tubuladuras asociado (nanomicelas y Dofetilide).

Fig. 3. A. Tubuladuras de Langendorff para retroperfusión coronaria. Dentro de este ítem, en A se pasan las soluciones controles y en B los fármacos a testear. **B.** Corazón aislado con electrodos y sensores acoplados para registros electromecánicos variados.



Con el corazón aislado se efectuaron **registros mecánicos y eléctricos** para evaluar función cardíaca. En el caso de los **registros mecánicos**, se implantó un dispositivo rígido en la base del músculo papilar, conectado a un hilo inextensible con un transductor de tensión. La señal obtenida fue amplificada (x 100) y filtrada (1-10 KHz) por un amplificador, y adquirida por una tarjeta convertora analógica digital de 16 bits (tarjeta MidiDigi-1A) utilizando el software de adquisición Axoscope 9.2. Los **registros eléctricos** fueron obtenidos colocando electrodos de plata clorada sobre la superficie miocárdica. Las señales fueron amplificadas (x 100) y filtradas (1- 10 KHz), para ser adquiridas por otro canal de la tarjeta convertora MiniDigi 1-A.

El análisis de los resultados se realizó por medio del software Clampfit (Molecular Devices-Axon Instruments) y SigmaPlot 11 (SYSTAT software). Para el análisis de las curvas dosis-respuesta para cada parámetro estudiado (amplitud de la contracción y duración del potencial de acción, por ejemplo), se le ajustó una ecuación de Hill del tipo $y = y_0 + a \cdot d^n / (IC_{50}^n + d^n)$, donde "d" es la dosis, "y" es la respuesta, "n" es el número de sitios promedio (subestimación) de impacto para la acción observada, e "IC50" es la



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

dosis media para lograr la respuesta máxima observable.

Para el **objetivo específico 1**, tras el aislamiento del corazón, se procedió a un tiempo de estabilización funcional con perfusión sólo con Tyrode 1.8 mM Ca²⁺ (ver A en Fig 3). Tras su estabilización eléctrica y mecánica, se cierra este y se permitió el pasaje de solución Tyrode con las diferentes concentraciones de los agentes a estudiar (DFT y NTFL). En tanto se realizan las manipulaciones, se registraron los cambios en la actividad electromecánica del corazón, que luego tras análisis, permitieron elaborar curvas dosis-respuesta. Las concentraciones usadas de Dofetilide (DFT), para evaluar las curvas dosis-respuesta en situación control fueron (0, 0.2, 1, 4, 8 y 12 μ M). Se aplicó en Tyrode 1.8 mM Ca²⁺ hasta observar dosis de saturación de los efectos mecánicos y eléctricos. Para las nanomicelas constituidas por glicerofosfolípidos denominadas NTFL (Nutritional Therapeutic Factor Lipids), se hicieron también curvas dosis-respuesta con el fin de saber en qué rango el corazón es más sensible a sus efectos. Las dosis óptimas ocurren en el rango 0.01-0.03%.

Para los **objetivos específicos 2 y 3**, se agregó, además de DFT, nanomicelas ultrasonicadas de glicerofosfolípidos de membrana a una concentración óptima (0.01-0.03%), para evaluar si las nanomicelas aplicadas antes o después del DFT, pueden disminuir el bloqueo de hERG y por tanto alterar las curvas dosis-respuesta obtenidas, respecto a aquellas obtenidas con DFT solo. La ultrasonicación es necesaria para que los glicerofosfolípidos formen nanomicelas de hasta 220 nanómetros capaces de adherirse a las membranas y ejercer sus efectos allí. Por otro lado, al ser tan pequeñas se evita la agregación de las mismas.

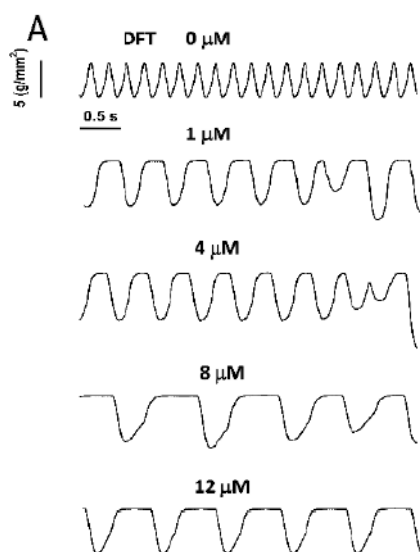
Para el **objetivo específico 2**, se procedió al agregado de soluciones lipídicas de NTFL 0.01 mM previo al suministro de las concentraciones crecientes de DFT a la solución de perfusión, con el objetivo de evaluar el efecto preventivo de las nanomicelas en el SQTl adquirido por DFT. Para ello, se realizaron curvas dosis-respuesta como en el objetivo 1, pero ahora con aplicación previa de 0.01% NTFL ultrasonicado. Esto evalúa el efecto preventivo de NTFL en

SQTL adquirido provocado por bloqueo de hERG.

Respecto al objetivo específico 3, se administraron soluciones de DFT saturantes al corazón aislado, en iguales condiciones fisiológicas que en los casos anteriores, para provocar y observar SQTL adquirido. Luego, se perfundió NTFL ultrasonificado en presencia de DFT saturante y se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para evaluar ahora un posible efecto terapéutico de NTFL ultrasonificado en SQTL adquirido provocado por bloqueo de hERG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con respecto al objetivo 1:



B

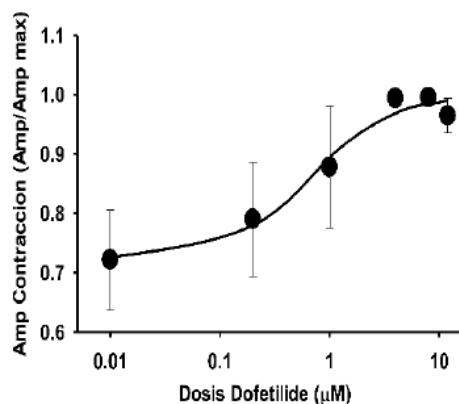


Fig 4. Curva Dosis-Respuesta de Contracción vs. Dosis de Dofetilide (DFT).

A. Registros de contracciones cardíacas ante concentraciones crecientes de DFT.

B. Curva Dosis-Respuesta de la amplitud de contracción normalizada en función de la concentración extracelular de DFT en escala semilogarítmica. La línea llena representa el mejor ajuste de una ecuación de Hill a los datos obtenidos. La dosis media es cercana a 1 μM y "n" algo mayor a 1.

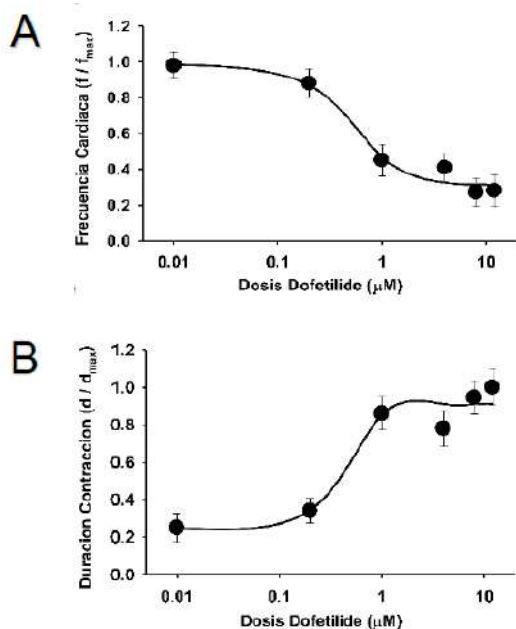


Fig. 5. Curva Dosis-Respuesta de la frecuencia cardíaca y duración del potencial de acción o contracción vs. dosis extracelular de DFT. **A.** Curva de frecuencia cardíaca normalizada a dosis cercana a 0. La línea sólida representa el mejor ajuste de una ecuación de Hill. La dosis media es menor a 1 y "n" cercano a 1. **B.** Duración de la contracción, o del potencial de acción, normalizada a valores máximos en función de la concentración de DFT extracelular. La línea sólida representa el mejor ajuste de una ecuación de Hill. La dosis media es menor a 1 y "n" cercano a 1.

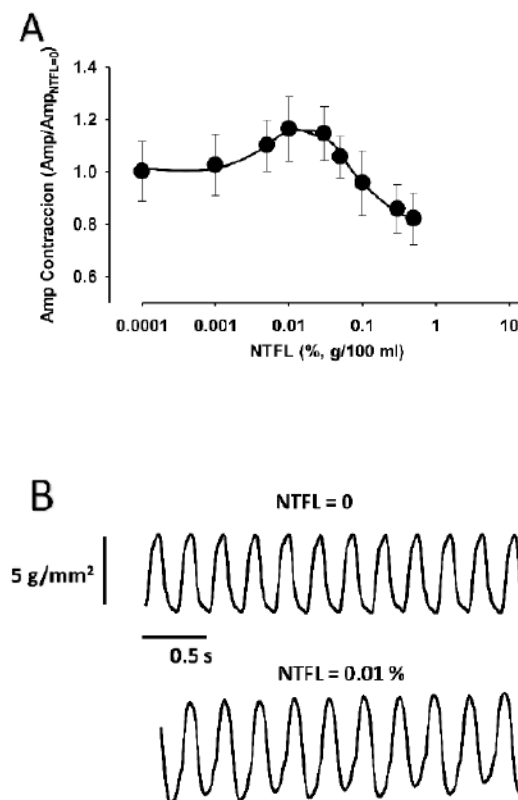


Fig. 6 Curva Dosis-Respuesta de la amplitud de la contracción cardíaca en función de la concentración del principio activo de las nanomicelas (NTFL). **A.** Curva Dosis-Respuesta de amplitud de contracción vs. Dosis de DFT. La curva es bifásica. Las líneas representan el ajuste de una ecuación de Hill a la fase ascendente o a la fase descendente. La fase descendente final donde hay un efecto inotrópico negativo probablemente se deba a coalescencia de nanomicelas que se vuelven más grandes y más concentradas en tanto aumenta la concentración de NTFL. La fase inicial

tiene un efecto inotrópico positivo (n=7).
B. Registros en situación control y con NTFL ultrasonicado en dosis en el pico de la campana.

Con respecto al objetivo 2:

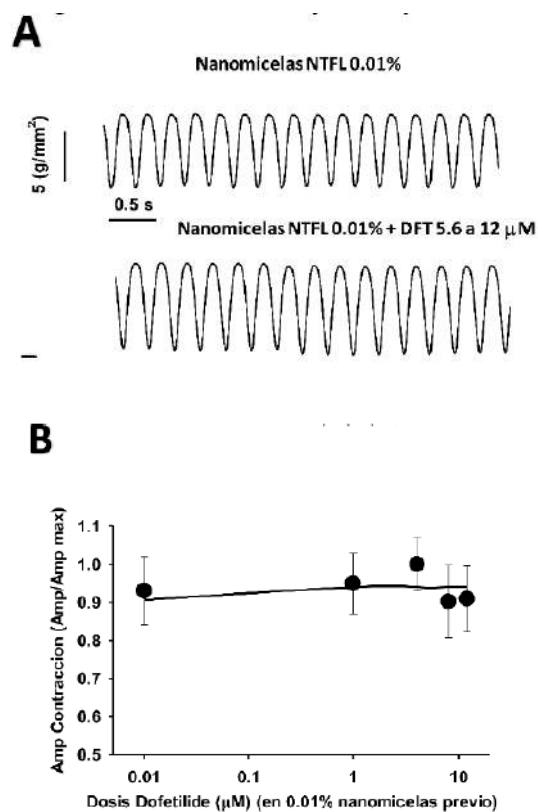


Fig. 7 Acción preventiva de las nanomicelas ultrasonicadas de NTFL. **A** Registros de contracciones cardíacas en nanomicelas al 0.01% y luego de agregar una dosis máxima de DFT (entre 5.6 y 12 µM). **B.** Curva Dosis-Respuesta de la Amplitud de concentración vs. La concentración extracelular de DFT,

cuando el corazón se expuso previamente a NTFL ultrasonicado (n=3).

Con respecto al objetivo específico

3:

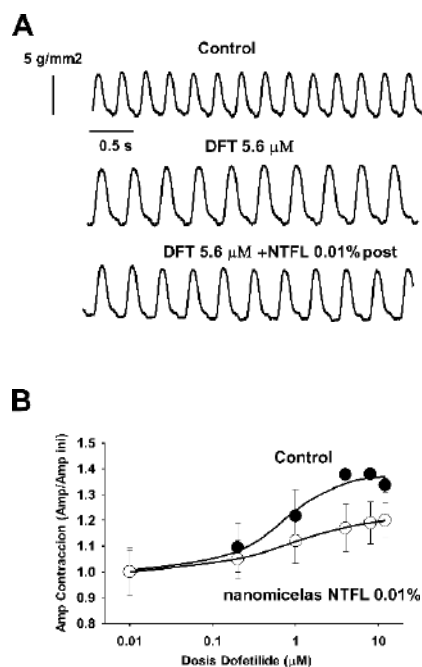


Fig. 8 Acción terapéutica de las nanomicelas ultrasonicadas de NTFL. **A.** Registros de contracciones cardíacas en control, DFT máximo y luego en DFT con nanomicelas al 0.01%. **B.** Curva Dosis-Respuesta de la Amplitud de concentración vs. La concentración extracelular de DFT, cuando el corazón se expuso posteriormente a NTFL ultrasonicado (n=3). Si bien el efecto es menos prominente que el



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



preventivo, hay también acción terapéutica.

disminuir la duración de la contracción cardíaca.

CONCLUSIONES.

Con respecto al objetivo 1, se observó que a dosis crecientes del fármaco modelo Dofetilide aumenta la duración de la contracción cardíaca, observándose también disminución de la frecuencia.

Al suministrar nanomicelas hasta 0,01% se registró un aumento en la amplitud de la contracción cardíaca, evidenciando un rol inotrópico positivo.

Con respecto al objetivo 2, con la administración preventiva de las nanomicelas, se registró que no hubo cambios significativos en la amplitud y duración de las contracciones, sugiriendo que la aplicación previa de nanomicelas logra evitar el bloqueo de hERG por Dofetilide.

Respecto al objetivo 3, la aplicación terapéutica, concluye que, si bien el efecto es menos prominente que en el ensayo preventivo, hay efecto evidenciable de la aplicación de nanomicelas al corazón previamente perfundido con Dofetilide. Se logra aumentar la frecuencia cardíaca y

BIBLIOGRAFÍA.

Arrhythmias - Long QT Syndrome | NHLBI, NIH. (2021). Retrieved June 26, 2022, from <https://www.nhlbi.nih.gov/health/long-qt-syndrome>

Best CH, Taylor NB, Dvorkin MA, Cardinali DP, Iermoli RH, A. C. D. (2010). *Best & Taylor, Bases fisiológicas de la práctica médica.*

Boron W, B. E. (2017). *Fisiología Médica* (3rd ed.). ELSEVIER CASTELLANO.

Camm, A. J., Janse, M. J., Roden, D. M., Rosen, M. R., Cinca, J., & Cobbe, S. M. (2000). Congenital and acquired long QT syndrome. *European Heart Journal*, 21, 1232–1237. <https://doi.org/10.1053/euhj.2000.2222>

Cingolani H, H. A. (2000). *Fisiología Humana de Houssay.*

Ferreira G, Costa C, Bassaiztegy V, Santos M, Cardozo R, Montes J, et al. (2018). No Title. Incubation of human sperm with micelles made from glycerophospholipid mixtures increases sperm motility and resistance to oxidative stress. *Ploss*



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

- One, 13(6).
- Gonzalo Ferreira de Mattos, Carlos Costa, Florencia Savio, M. A. and G. (n.d.). Lead poisoning: acute exposure of the heart to lead ions promotes changes in cardiac function and Cav1.2 ion channels. *Biophysics*, 807–825.
- Höcht C, Opezzo JAW, T. C. (2004). Intervalo QT prolongado inducido por fármacos desde el punto de vista de un farmacólogo. *Revista Argentina de Cardiología*, 72(6), 474–480.
- Kallergis, E. M., Goudis, C. A., Simantirakis, E. N., Kochiadakis, G. E., & Vardas, P. E. (2012). The scientificWorldJOURNAL Review Article Mechanisms, Risk Factors, and Management of Acquired Long QT Syndrome: A Comprehensive Review. *The Scientific World Journal*, 2012.
<https://doi.org/10.1100/2012/212178>
- Kramer DB, Z. P. (2011). Long-QT syndrome. *Cardiology in Review*, 19, 217–225.
- Lanzotti ME, C. N. (1983). *Síndrome de QT Largo Adquirido . " Torsade de Pointes "*.
- Litwin JS, Kleiman RB, G. I. (2008). Acquired (drug-induced) long QT syndrome. In: *Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention*. Springer London, 705–718.
- Nicolson, G. (2016). Membrane Lipid Replacement: Clinical Studies Using a Natural Medicine Approach to Restoring Membrane Function and Improving Health. *Int J Clin Med*, 07(02), 133–143.
- Nicolson, G., & ME, A. (2014). E. Lipid Replacement Therapy: A natural medicine approach to replacing damaged lipids in cellular membranes and organelles and restoring function. *Biochim Biophys Acta*, 1838(6), 1657–1679. Retrieved from
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.010>
- Nicolson GL, Ferreira G, Settineri R, Ellithorpe RR, Breeding P, A. M. (2018). Mitochondrial dysfunction and chronic disease: Treatment with membrane lipid replacement and other natural supplements. In: *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics*. Springer International Publishing, 499–522.
- Nicolson GL, Rosenblatt S, Ferreira de Mattos G, Settineri R, Breeding PC, Ellithorpe RR, et al. (2016). Clinical Uses of Membrane Lipid



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

- Replacement Supplements in Restoring Membrane Function and Reducing Fatigue. *Discoveries*.
- Nicolson GL, Settineri R, Ferreira G, B. P. (2018). . Reduction of Pain, Fatigue, Gastrointestinal and Other Symptoms and Improvement in Quality of Life Indicators in Fibromyalgia Patients with Membrane Lipid Replacement Glycerolphospholipids and Controlled-Release Caffeine. *Int J Clin Med.*, 09(07), 600–619.
- Presidencia de la República. Mides. (2015). *Reporte Uruguay 2015*. 73–89. Retrieved from http://observatoriosocial.mides.gub.uy/Nuevo_Test/midesv2/adjContenidos/adjcont455.pdf
- Roukoz H, S. W. (2007). Dofetilide: A new class III antiarrhythmic agent. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*, 5(1), 9–19.
- Saliba, W. (2001). Dofetilide (Tikosyn): A new drug to control atrial fibrillation. *Cleve Clin J Med.*, 68(4), 353–363.
- Schwartz PJ, Crotti L, I. R. (2012). Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5(4), 868–877. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.962019>
- Turker I, Ai T, Itoh H, H. M. (2017). Drug-induced fatal arrhythmias: Acquired long QT and Brugada syndromes. *Pharmacol Ther*, 176, 48–59.
- Vandenberg, J. I., Perry, M. D., Perrin, M. J., Mann, S. A., Ke, Y., Hill, A. P. (2012). hERG K CHANNELS: STRUCTURE, FUNCTION, AND CLINICAL SIGNIFICANCE. *Physiol Rev*, 92, 1393–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2011>.-The
- Wang, Y., Guo, J., Perissinotti, L. L., Lees-Miller, J., Teng, G., Durdagi, S., ... Noskov, S. Y. (2016). *Role of the pH in state-dependent blockade of hERG currents*. <https://doi.org/10.1038/srep32536>
- Weerapura M, Hébert TE, N. S. (2002). Dofetilide block involves interactions with open and inactivated states of HERG channels. *Pflugers Arch Eur J Physiol.*, 443(4), 520–531.
- Zhang M, Liu J, T. G. (2004). Gating charges in the activation and inactivation processes of the hERG channel. *J Gen Physiol.*, 124(6), 703–718.



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



50
AÑOS

FINANCIAMIENTO.

Este proyecto se desarrolló en el marco del programa de apoyo a la investigación estudiantil y fue cubierta por los fondos de dicho programa.

AGRADECIMIENTOS.

Programa CSIC PAIE y Bioterio de Facultad de Medicina.

Exploración de las emociones de agrado y desagrado de niños a través de las respuestas de ERD/ERS en las oscilaciones del electroencefalograma



C.23. Biofísica

Exploración de las emociones de agrado y desagrado de niños a través de las respuestas de ERD/ERS en las oscilaciones del electroencefalograma

Tagashira, Celia Elina^{1,2}.

¹Laboratorio de Investigaciones en Neurociencias y Tecnologías Aplicadas (LINTEC), Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología (FACET), Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Tucumán, Argentina.

²Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Tucumán, Argentina.

Resumen

El procesamiento neurocognitivo de las emociones evocadas por estímulos visuales (basado en la presentación de imágenes afectivas) podría involucrar estructuras internas del cerebro. En la actualidad, numerosos estudios sugieren la posibilidad de estudiar la dinámica de tal procesamiento a partir de técnicas no invasivas, tal como la electroencefalografía. El objetivo de este estudio es analizar la dinámica temporal de las oscilaciones cerebrales evocadas por estados emocionales placenteros y no placenteros, en sujetos menores de edad. Para ello, se registraron señales de electroencefalografía durante la

presentación de imágenes afectivas, para posteriormente ser analizadas a través de estimaciones de desincronización en la banda beta (14 – 32Hz) y gama baja (32 – 45Hz) del electroencefalograma (EEG). Los resultados muestran que el procesamiento emocional se encontraría relacionado a patrones específicos de conectividad funcional y muestran la existencia y lateralización hemisférica de las diferencias entre respuestas emocionales para valencias emocionales positivas y negativas.

Palabras clave — Procesamiento emocional, ERD/ERS, señales de EEG.



Introducción

La emoción es considerada por diversos autores como un sistema adaptativo de múltiples componentes cuya arquitectura funcional ha evolucionado a lo largo de la filogenia, desde un modelo muy primitivo relacionado con la supervivencia a esquemas conductuales de gran complejidad integrados al sistema cognitivo [1]. Dicha evolución permitió mediar entre la amplia gama de comportamientos adaptativos necesarios para un organismo que lucha por sobrevivir en el mundo físico [2]. Considerando esta función adaptativa, Lang [3] define a las emociones como predisposiciones para la acción que surgen a partir de la activación de circuitos cerebrales ante estímulos relevantes para el individuo.

Los estímulos visuales constituyen un método efectivo para generar respuestas emocionales que se ven reflejadas en diversos cambios de naturaleza fisiológica. Uno de los instrumentos más utilizados en la investigación para generar estados emocionales es el Sistema Internacional de Imágenes Afectivas (International Affective Picture System, IAPS), el cual es un banco de imágenes y fotografías estandarizadas cuyos contenidos representan un amplio espectro de la vida cotidiana (comida, deportes, naturaleza, sexo, rostros, familia,

accidentes, animales, entre otros). El mismo ha sido utilizado para medir respuestas emocionales en poblaciones sanas y patológicas [4].

La respuesta emocional ante estímulos visuales puede medirse a través de registros fisiológicos. Entre las técnicas de neuroimagen, el electroencefalograma (EEG) ha demostrado que puede proporcionar características informativas en las respuestas a los estados emocionales, caracterizándose por ofrecer excelente resolución temporal [2]. Actualmente, a pesar del escaso conocimiento preciso de las estructuras anatómicas/funcionales que subyacen a las emociones, existen fuertes evidencias experimentales de que estas podrían involucrar estructuras internas del cerebro. Está claro que el monitoreo de la actividad electrofisiológica de tales estructuras es difícil realizar con técnicas no invasivas, como lo es la electroencefalografía. Sin embargo, las investigaciones actuales plantean la hipótesis de que debido a las conexiones anatómicas entre las estructuras internas del cerebro y la corteza, sería posible evaluar indirectamente la dinámica de los procesos relacionados a las emociones a través de técnicas no invasivas. En este contexto, es donde planteamos esta investigación.



Así mismo, también se especula, en que la complejidad del procesamiento de las emociones (en el sentido de la repetibilidad entre sujetos o de las estructuras anatómicas/funcionales involucradas) depende de la experiencia de vida del sujeto, costumbres, cultura, educación, y otros. Por lo tanto, habría una fuerte dependencia entre la complejidad del procesamiento de la información emocional y la edad del sujeto. En este campo existen especialmente estudios realizados en adultos, el conocimiento de la conectividad cerebral y la neurobiología en niños de desarrollo neurotípico es fundamental para caracterizar perfiles de conectividad funcional en trastornos del neurodesarrollo y la comprensión de sus consecuencias funcionales.

Objetivo

Este trabajo pretende estudiar la dinámica temporal de las oscilaciones cerebrales de sujetos menores de edad, evocadas por el grado emocional informado al momento de visualizar imágenes afectivas, a partir del análisis de señales electroencefalográficas.

Materiales y Métodos

Participantes

Participaron en el estudio quince sujetos (edad media de 10 ± 1.6 años, nueve

mujeres, seis varones). Ningún participante presentó antecedentes de afecciones neurológicas o psiquiátricas, ninguno presentó dependencia crónica de medicamentos, el estado de la visión fue normal o corregida, este último mediante el uso de anteojos. Tanto a los sujetos experimentales, como a los padres/tutores, se les informó sobre los objetivos y diseño del estudio, proporcionando, estos últimos, un consentimiento escrito para la participación de los menores.

Estímulo y validación

Se preseleccionó un subconjunto de estímulos estandarizados (144 imágenes en total) del IAPS [5]. El mismo estaba constituido por imágenes agradables y desagradables, que fueron puntuadas por cada sujeto en una escala de 9 a 1, de acuerdo a su valencia afectiva y presentadas en color, con igual luminancia y contraste.

Los estímulos IAPS preseleccionados se clasificaron en cuatro grupos de acuerdo con la puntuación IAPS, a saber, imágenes muy agradables ($7 < \text{puntuación} \leq 9$), imágenes agradables ($5 < \text{puntuación} \leq 7$), imágenes desagradables ($2 < \text{puntuación} \leq 5$) e imágenes muy desagradables ($1 < \text{puntuación} \leq 2$). Cada grupo estuvo compuesto por 36 imágenes. Los estímulos fueron presentados a cada sujeto sobre

una pantalla de 21 pulgadas, durante un período de 500 ms, seguido de una pantalla negra por otros 3500 ms, y así consecutivamente. El orden de aparición de los estímulos fue implementado de manera aleatoria. Tras esta metodología, fueron seleccionadas 80 imágenes, 40 correspondientes a imágenes positivas (puntuación > 5, IC = 95%), y la otra mitad, correspondientes a imágenes negativas (puntuación < 5; IC = 95%).

Experimento

La Fig. 1A resume la estructura en serie del estudio. Cada imagen fue presentada durante 500 ms, seguido de una pantalla negra por otros 3500 ms. La tarea de los participantes consistió en observar las imágenes y valorarla con una puntuación (de 1 a 9) de acuerdo a si le proporcionaba una sensación positiva o negativa.

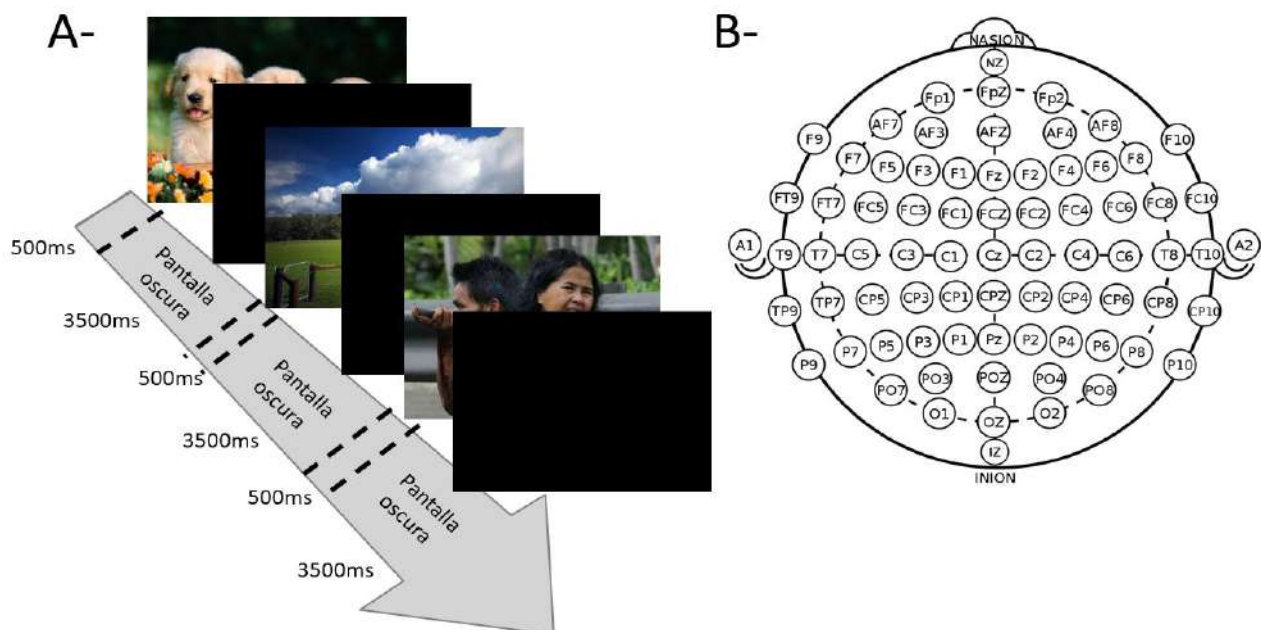


Fig. 1: A) Secuencia de presentación de las imágenes del Sistema Internacional de Imágenes Afectivas (IAPS). Las imágenes son clasificadas de acuerdo a un rango de 1 (imágenes muy desagradables) a 9 (imágenes agradables). Las imágenes aparecen aleatoriamente y solo una vez. B) Disposición de los electrodos de registros las señales de electroencefalografía (EEG) adquiridas.



Adquisición de las señales de EEG

Se instruyó a los sujetos a permanecer lo más inmóviles posibles durante la sesión de adquisición de datos, evitando parpadear durante la exposición de la imagen y tratando de mantener la mirada hacia el centro del monitor. Se registró las señales de EEG de manera continua a través de 64 canales ubicados de acuerdo al sistema internacional 10/20 (Fig. 1B) [6], y a una frecuencia de muestreo de 1000 Hz. Para ello se empleó un gorro para electroencefalografía y un sistema de adquisición de EEG NeuroScan SynAmps (Compumedics, Charlotte, NC, EE. UU.). Se mantuvo la impedancia de los electrodos de registro por debajo de 25 K Ω . En la adquisición se emplearon filtros pasa banda de 0.5 - 45 Hz. Todas las grabaciones se realizaron en una sala silenciosa con iluminación suave.

Se realizó un pre-procesamiento de los datos registrados, consistentes de una re-referenciación, para lo cual se empleó una referencia de promedio común (CAR), y la eliminación de los artefactos eléctricos por movimiento, parpadeo. Estos últimos fueron identificados como niveles de señal por encima de 75 μ V en los 5 electrodos frontales (FP1, FPZ, FP2, AF3 y AF4). Estos fueron elegidos debido a que resultaron los más afectados por los movimientos involuntarios. Esta etapa fue

realizada empleando el software Curry 7 (Compumedics, Charlotte, Carolina del Norte, EE. UU).

Procesamiento de las señales de EEG

En este trabajo hemos obtenido y comparado estimaciones de desincronización en el EEG, relacionadas a las emociones agradables y desagradables. El método aplicado para su obtención siguió los lineamientos metodológicos de Kalcher y Pfurtscheller [7], más específicamente, usando el método de varianza entre ensayos (inter-trial variance method). Se presentaron los resultados para cada uno de los canales de EEG analizados, en el intervalo de -500 a 1500 ms (en $t = 0$ ms se presenta la imagen).

El periodo de referencia fue de -500 a 0 ms. Las bandas de energía analizadas fueron bandas beta (14 – 32Hz) y gama bajo (32 – 45 Hz). Se evaluó la diferencia cuantitativa entre emociones agradables y desagradables a través de la diferencia entre las medias de los valores de desincronización (ERD) normalizada por sus desviaciones estándares (D_n).

$$D_n = \frac{|\mu_1 - \mu_2|}{\sqrt{\sigma_1 \sigma_2}} \quad (1)$$

Donde μ_1 y μ_2 son los valores promedios de las ERD correspondientes a las

sensaciones positivas y negativas, respectivamente, mientras que σ_1 y σ_2 son sus desviaciones estándares. Estadísticamente, esta diferencia fue analizada usando la prueba T-test de Aspin-Welch para varianzas desiguales [8].

La Fig. 2 muestra esquemáticamente la línea de procesamiento empleada para la determinación de los valores de ERD.

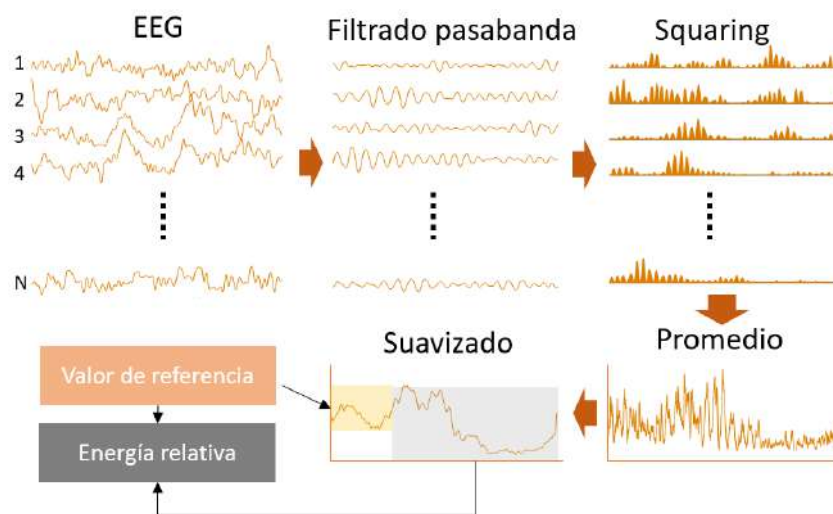


Fig. 2: Determinación de la ERD medida en términos de la energía relativa.

Resultados y discusión

La Fig. 3A muestra los valores promedios de ERD obtenidos en la banda beta, para las respuestas con valencias negativas (líneas azules) y para aquellas con valencias positivas (líneas rojas). Se calcularon tales promedios a partir de las pruebas realizadas por los 15 sujetos. En términos generales, se observan sincronizaciones (valores de ERD más negativos) para las respuestas con valencias positivas. Los resultados de la

prueba estadística, valores de significancias p (líneas continuas negras), revelan diferencias significativas ($p < 0.05$) en las localizaciones remarcadas con una sombra verde semitransparente. Cualitativamente se observa que las diferencias entre las respuestas con valencias positivas y negativas se lateralizan hacia la derecha de los sujetos. Sin embargo, existe también una leve lateralización hacia la izquierda.

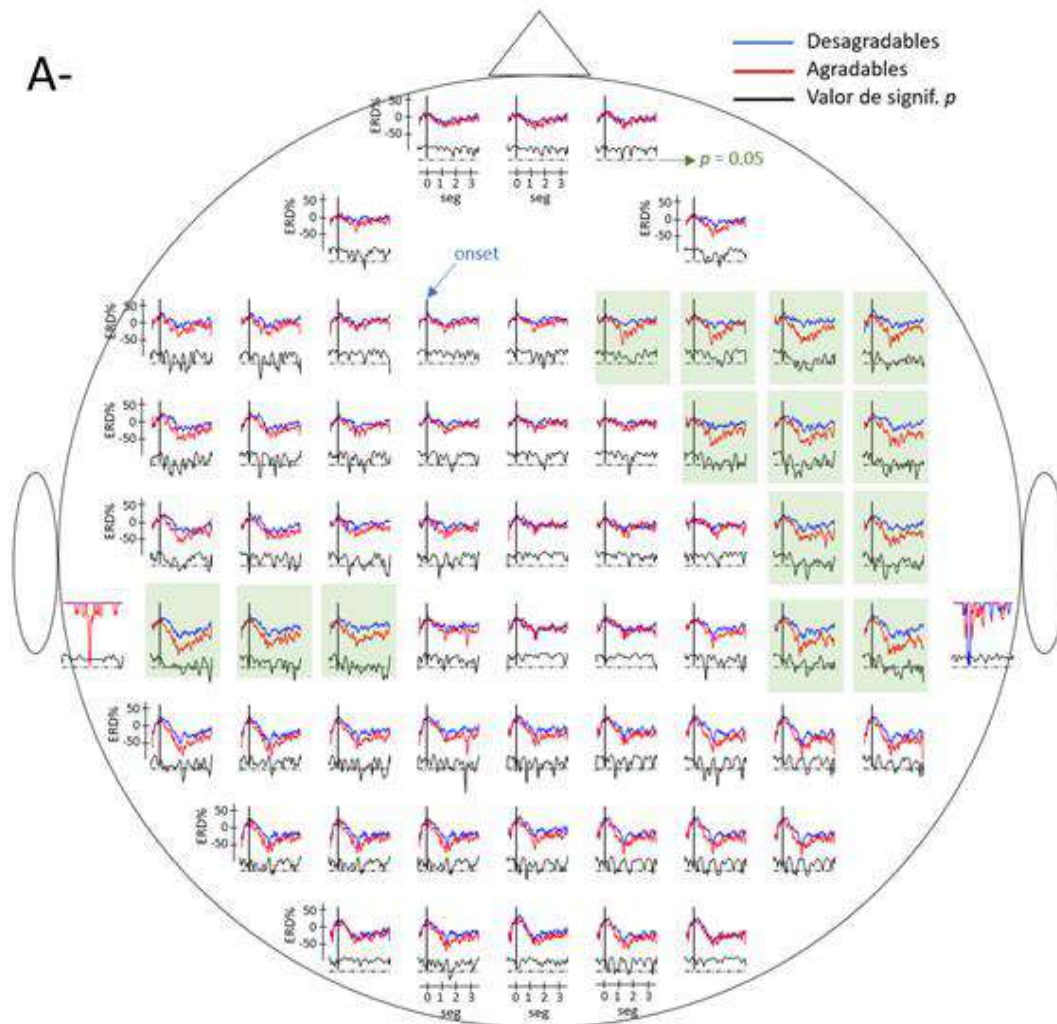


Fig. 3: A) Desincronización relacionada a eventos (ERD) en la banda beta (14 – 32Hz).

El sombreado verde semitransparente indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las ERD de las sensaciones positivas y aquellas pertenecientes a las sensaciones negativas.

La Fig. 3B muestra los valores promedios de ERD obtenidos en la banda gama. Estos resultados muestran que las diferencias entre las respuestas con valencias positivas y negativas se distribuyen simétricamente hacia ambos hemisferios.

Resulta interesante notar que en las áreas centrales de la corteza no existen diferencias significativas entre ambas situaciones.

En este trabajo se analizaron las diferencias evocadas en el perfil de



desincronización del EEG, en bandas beta y gama, producto de la valoración emocional (positivo o negativo) de imágenes afectivas realizadas por sujetos menores de edad. Los resultados mostrados aquí están en línea con los antecedentes bibliográficos relacionados, los cuales presumen la existencia de una variedad de respuestas neurofisiológicas involucradas en el procesamiento de la información emocional, como ser activaciones diferenciales en estructuras como: amígdala, hipocampo, giro parahipocampal, polos terminales, ínsula superior, circunvolución frontal inferior, entre otras; cambios en la potencia de EEG y variaciones en el flujo de sangre cerebral regional [9]. Tal procesamiento se encontraría relacionado a patrones específicos de conectividad funcional, pero dependientes de la gran variedad de respuestas emocionales inducidas [10].

En este contexto, se ha demostrado la existencia de sincronizaciones en las oscilaciones corticales cuando un estímulo evoca una sensación positiva y/o placentera [11]. Esta particularidad de sincronización se relacionaría directamente a una mayor conectividad funcional [12]. Aquí, las imágenes con valencia positiva, efectivamente generaron mayor sincronización en las bandas beta y gama, lo cual sugiere que este estímulo evocaría patrones de conectividad de agrupamiento más elevados. Las respuestas emocionales evocadas por las imágenes de valencia negativa, se ven afectadas por una menor, o ninguna, sincronización en las oscilaciones del EEG. Esta menor sincronización podría relacionarse a un estado de alerta y vigilancia del sujeto, generado ante una situación considerada por el mismo como amenaza.

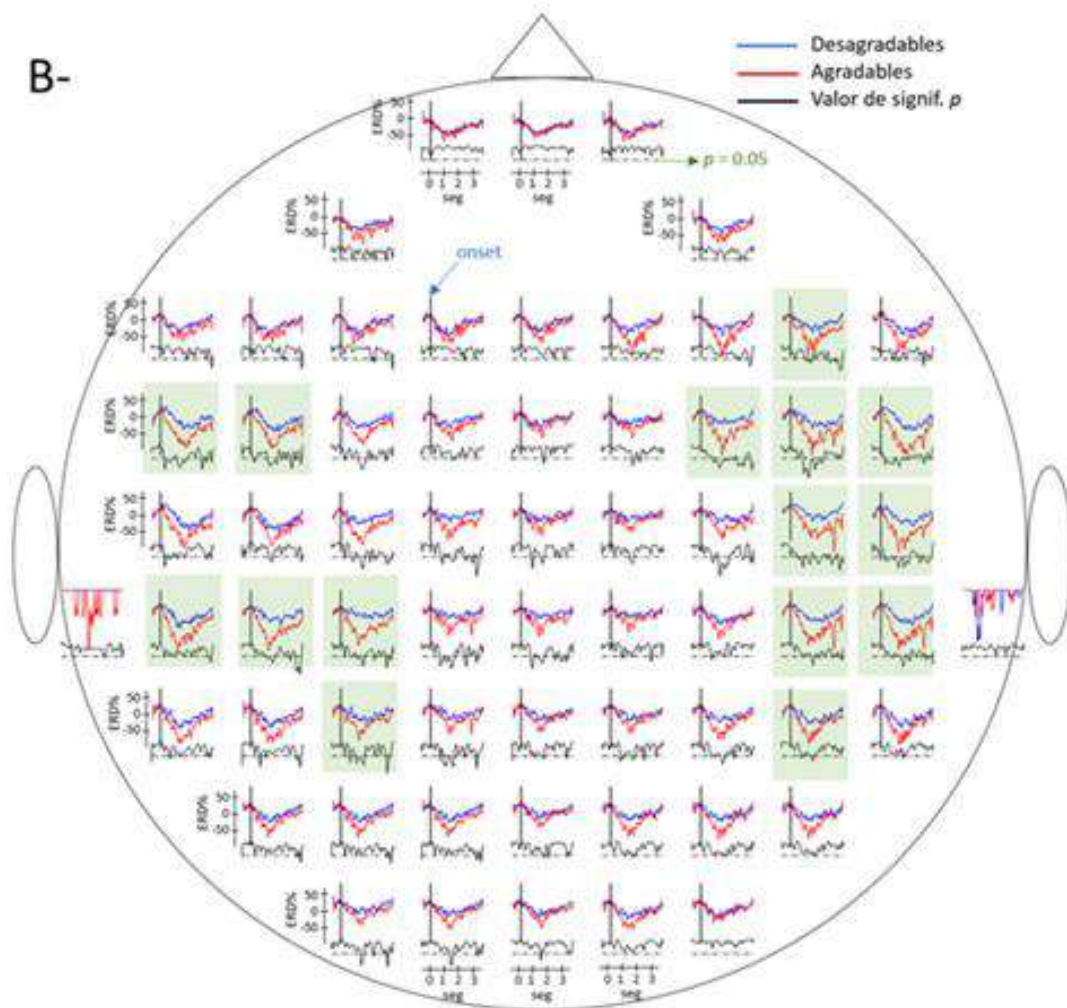


Fig. 3: B) Desincronización relacionada a eventos (ERD) en la banda gama (32 – 64Hz).

El sombreado verde semitransparente indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las ERD de las sensaciones positivas y aquellas pertenecientes a las sensaciones negativas.

Conclusiones

A pesar de las limitaciones que las técnicas no-invasivas, tal como la electroencefalografía, presentan a la hora de estudiar procesos cognitivos que relacionan múltiples estructuras internas del cerebro, es importante destacar la

resolución temporal a través de la cual es posible analizar los procesos emocionales en el cerebro. Los resultados preliminares que se muestran aquí no solo revelan la existencia y lateralización de las diferencias entre respuestas emocionales positivas vs las negativas, sino que también sugiere un alto grado de



repetibilidad entre sujetos menores (dado por la significancia de las pruebas estadísticas). En estudios similares, realizados en sujetos adultos y con las mismas técnicas de análisis, las diferencias no resultaron significativas. Lo cual hace sospechar que las emociones evocadas por las imágenes afectivas desencadenan procesos altamente variables y dependientes de la experiencia, costumbre, cultura, entre otras, del sujeto (datos aún no publicados). Sin embargo, los patrones de conectividad cortical han demostrado ser características relevantes, estables y específicas del procesamiento emocional [12].

Los mayores desafíos, en esta área de investigación, podrían estar relacionado con el desarrollo de nuevas metodologías capaces de explorar la dinámica de las redes cerebrales espaciotemporales con una resolución en el rango de los milisegundos. Por otro lado, los análisis de conectividad y teoría de grafos, podrían ser útiles para definir patrones de redes cerebrales y cuantificar las propiedades morfológicas de las redes corticales evocadas por el procesamiento cognitivo. Es probable que esta cuantificación mejore aún más, ya que regularmente se describen nuevas medidas gráficas, pero el verdadero desafío es crear modelos que puedan combinar las características

espaciales (fMRI) y temporales (EEG) de las respuestas cerebrales simultáneamente. Además, es de gran interés la búsqueda de nuevas metodologías que sean capaces de revelar redes funcionales a nivel de ensayo único. Todos estos métodos podrían aplicarse al análisis de todo el cerebro y ayudar a abordar una gran diversidad de investigaciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Universidad Nacional de Tucumán (UNT), instituciones que financiaron y permitieron llevar adelante este trabajo. Al Laboratorio de Investigación en Neurociencias y Tecnología Aplicada (LINTEC) por los instrumentos de medición, y al Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, España, donde se realizaron los registros.

Referencias

- [1] G. Gainotti, “Emotions and the Right Hemisphere: Can New Data Clarify Old Models?,” *Neurosci. a Rev. J. bringing Neurobiol. Neurol. psychiatry*, vol. 25, no. 3, pp. 258–270, Jun. 2019, doi: 10.1177/1073858418785342.



- [2] M. D. Grima Murcia, J. Sorinas, M. A. Lopez-Gordo, J. M. Ferrández, and E. Fernández, “Temporal Dynamics of Human Emotions: An Study Combining Images and Music BT - Natural and Artificial Computation for Biomedicine and Neuroscience,” 2017, pp. 245–253.
- [3] P. J. Lang, “The emotion probe. Studies of motivation and attention.,” *Am. Psychol.*, vol. 50, no. 5, pp. 372–385, May 1995, doi: 10.1037//0003-066x.50.5.372.
- [4] C. Gantiva *et al.*, “Inducción de estados afectivos a través de imágenes. Segunda validación colombiana del Sistema Internacional de Imágenes Afectivas (IAPS),” *Rev. Latinoam. Psicol.*, vol. 51, Oct. 2019, doi: 10.14349/rlp.2019.v51.n2.5.
- [5] M. M. Bradley and P. J. Lang, “International Affective Picture System BT - Encyclopedia of Personality and Individual Differences,” V. Zeigler-Hill and T. K. Shackelford, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–4.
- [6] G. H. Klem, H. O. Lüders, H. H. Jasper, and C. Elger, “The twenty electrode system of the International Federation. The International Federation of Clinical Neurophysiology.,” *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.*, vol. 52, pp. 3–6, 1999.
- [7] J. Kalcher and G. Pfurtscheller, “Discrimination between phase-locked and non-phase-locked event-related EEG activity,” *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, vol. 94, no. 5, pp. 381–384, May 1995, doi: 10.1016/0013-4694(95)00040-6.
- [8] J. Algina, “Aspin–Welch Test,” 2005.
- [9] S. Koelsch *et al.* “Investigating emotion with music: An fMRI study.” *Human Brain Mapping*, vol 27, no 3, pp. 239–250, Mar 2006.
- [10] I. Daly *et al.*, “Neural correlates of emotional responses to music: an EEG study.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 573, pp. 52–57, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.neulet.2014.05.003.
- [11] J. Bhattacharya and H. Petsche, “Phase synchrony analysis of EEG during music perception reveals changes in functional connectivity due to musical expertise,” *Signal Processing*, vol. 85, no. 11, pp. 2161–2177, Nov. 2005, doi: 10.1016/J.SIGPRO.2005.07.007.
- [12] G. Alba, A. González, and J. González, “Modificaciones durante



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



AÑOS

el envejecimiento de la sincronización electroencefalográfica (EEG) cortical bajo estimulación visual," *Eur. J. Investig. Heal. Psychol. Educ.*, vol. 6, Apr. 2016, doi: 10.1989/ejihpe.v6i1.145.

- [12] F. Farfán, M. Grima-Murcia, V. Caruana, M. Ortiz, M. Lopez-Gordo, A. Bernabeu-Araoz, J. Ferrandez and E. Fernandez, "Functional

networks for processing complex images: towards a better understanding of spatio-temporal dynamics of pleasant and unpleasant emotions," *XXII Congreso Argentino De Bioingeniería y XI Jornadas De Ingeniería Clínica*. 4 al 6 de marzo de 2020, Ciudad de Piriápolis, Uruguay.

Obtención de una formulación liposomal ultradeformable con potencial aplicación para la administración transdérmica de fármacos



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

C.23. Biofísica

Obtención de una formulación liposomal ultradeformable con potencial aplicación para la administración transdérmica de fármacos

Autor: Sabatie, Alejandro Enrique; alejandrosabatie@hotmail.com.ar

Co-autor: Hermet, Melisa; hermet.melisa@biol.unlp.edu.ar

Profesora guía: Fait, María Elisa; fait.marielisa@biol.unlp.edu.ar

Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el empleo de un tensioactivo derivado de arginina (N^{ϵ} -benzoil-L-arginina decilamida o Bz-Arg-NHC₁₀) como activador de borde para la obtención de liposomas ultradeformables (UD).

Bz-Arg-NHC₁₀ fue obtenido mediante biocatálisis empleando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador y purificado por cromatografía de intercambio catiónico. Para la preparación de los liposomas (LUV) se utilizó fosfatidilcolina de soja (SPC) y 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀. La formulación obtenida fue caracterizada en relación a su ultradeformabilidad y la evaluación de parámetros biofísicos, como el tamaño de las vesículas, su potencial Z y polidispersidad, comparándose los resultados con los correspondientes para una formulación de SPC solamente. Asimismo, las interacciones entre Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC en las membranas de los liposomas fueron estudiadas mediante el empleo de sondas fluorescentes (ANS, DPH y Laurdan). Los experimentos probaron la capacidad de Bz-Arg-NHC₁₀ para actuar como activador de borde, aumentando la elasticidad de las nanovesículas de SPC y la fluidez de sus membranas, permitiendo su clasificación como liposomas UD. Los estudios con sondas fluorescentes evidenciaron que el tensioactivo interactúa con SPC tanto a través de uniones electrostáticas como hidrofóbicas, condiciéndose con la naturaleza anfílica de ambas moléculas.

La evidencia recopilada sugiere que Bz-Arg-NHC₁₀ podría emplearse para la formulación de liposomas UD con potencial aplicación en el área de la salud y la cosmeceútica, como el desarrollo de nuevos sistemas de administración transdérmica.

Palabras clave: liposomas, surfactante derivado de arginina, activador de borde.



Introducción

Entre las estrategias para la administración de fármacos, la vía transdérmica involucra la administración controlada de moléculas con actividad farmacológica a través de la piel, de manera de obtener un efecto sistémico o local. La administración transdérmica de fármacos (ATF) constituye una buena alternativa para aquellos pacientes que no pueden tomar medicación vía oral, que es la más frecuentemente empleada. Además, presenta numerosas ventajas como una amplia superficie de aplicación, un mejor control de los niveles en sangre del fármaco, una reducción en la incidencia de la toxicidad sistémica, y la ausencia de metabolismo primario hepático (Rastogi & Yadav, 2012). Por otro lado, la mayoría de las dificultades que presenta la ATF se relacionan con la impermeabilidad de la piel, entre las cuales se encuentran la incompatibilidad con fármacos iónicos y la administración de altas dosis (Ghume *et al.*, 2020).

La permeabilidad de la piel varía en una misma persona de un sitio a otro y según la edad del individuo (Rougier *et al.*, 1988), lo cual aumenta el desafío para el desarrollo de sistemas de ATF eficientes. La función de barrera de la piel se debe principalmente a la organización estructural del estrato córneo (SC), la que

se puede explicar a través de un sistema modelo de *ladrillos* y *mortero*, donde los *ladrillos* representan a los corneocitos queratinizados (en promedio de 15 a 20 capas) y el *mortero* a la matriz extracelular, compuesta de lípidos (ceramidas, colesterol y ácidos grasos) y corneodesmosomas. Esta matriz extracelular sería responsable de la mayor limitación a la permeación de la mayoría de las moléculas de interés, debido al alto grado de ordenamiento y entrecruzamiento de las múltiples capas lamelares que forman sus lípidos. Estas multicapas se organizan en dominios de fase gel y presentan en su composición lípidos con largas colas hidrocarbonadas saturadas (altamente ordenadas y entrecruzadas), formando microrruturas intercelulares a través de las que puede ocurrir la difusión.

Los liposomas ultradeformables (UD) están compuestos por fosfolípidos y una molécula que funciona como activador de borde. Son ampliamente empleados en la ATF debido a su eficiencia de encapsulamiento (Jong *et al.*, 2021; Kalim *et al.*, 2021), y a que son capaces de atravesar poros de hasta 1/5 de su tamaño, gracias a la elasticidad de sus membranas y su capacidad de alterar la composición de su membrana localmente y de manera reversible (Ferreira *et al.*, 2015).

Los activadores de borde son moléculas anfífilas, generalmente surfactantes

(como el Tween 20, Tween 60, Span 65, Span 80 y el colato de sodio). En general, estas moléculas presentan una elevada toxicidad y su uso puede derivar en consecuencias negativas para el medio ambiente, planteándose la necesidad del desarrollo de moléculas tensioactivas menos citotóxicas y ecoamigables, basadas en estructuras anfífilas naturales. Entre ellas, los tensioactivos catiónicos derivados de arginina constituyen una alternativa interesante, ya que además presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, lo que las convierte en aditivos de interés como preservantes o antisépticos en formulaciones farmacéuticas y alimenticias (Pinazo *et al.*, 2016). Para la síntesis y obtención de esta clase de tensioactivos, el empleo de catalizadores biológicos representa una alternativa atractiva a los métodos químicos tradicionales (Schmid *et al.*, 2001).

La papaína, una endopeptidasa cisteínica obtenida a partir del látex de frutos de *Carica papaya*, es una de las enzimas con mayor aplicación en la obtención de derivados peptídicos, incluyendo tensioactivos derivados de aminoácidos (Fait *et al.*, 2012). Nuestro grupo de trabajo ha reportado el uso de esta enzima inmovilizada por adsorción sobre poliamida para la síntesis de un surfactante derivado de arginina

(N^ε-benzoil-L-arginina decilamida o Bz-Arg-NHC₁₀), con eficiencias de reacción mayores al 80% (Fait *et al.*, 2015).

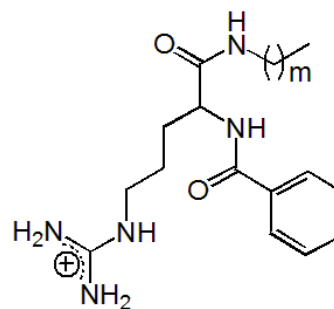


Fig. 1 Estructura química de Bz-Arg-NHC₁₀, con m=9.

Objetivos

1. Emplear Bz-Arg-NHC₁₀ como activador de borde en la obtención de liposomas ultradeformables utilizando fosfatidilcolina de soja como fosfolípido.
2. Caracterizar la formulación obtenida en relación a su ultradeformabilidad, estabilidad coloidal y evaluación de parámetros biofísicos, como el tamaño de las vesículas, su potencial Z y polidispersidad.
3. Estudiar las interacciones entre el surfactante y SPC mediante el empleo de sondas fluorescentes.



Materiales y Métodos

Reactivos

1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-[6-(Dimetilamino)naftalen-2-il]dodecan-1-ona (Laurdan) fueron obtenidos de Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). El lípido utilizado para la preparación de los liposomas (fosfatidilcolina de soja, SPC) fue donado por Phospholipid/Natterman, Alemania. Bz-Arg-NHC₁₀ fue sintetizado en nuestro laboratorio según lo descrito por Fait *et al.* (2015). El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fueron de calidad analítica o superior.

Preparación de liposomas de SPC conteniendo Bz-Arg-NHC₁₀

Se obtuvieron liposomas unilamelares grandes (LUV) de SPC conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ (SPC:Bz-Arg-NHC₁₀). Para ello se preparó un stock de SPC 10 mg.ml⁻¹ en CHCl₃/MeOH 1:1 y uno de Bz-Arg-NHC₁₀ 1 mg.ml⁻¹ en MeOH. A continuación, se prepararon liposomas multilamelares (MLV) empleando el método de hidratación del film lipídico, resuspendiendo las cantidades correspondientes de cada stock en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4, 0,9% p/v de NaCl, de manera de alcanzar la proporción deseada. Para la obtención de los LUV, se sonicaron los MLV durante 20

min y se extruyeron 19 veces utilizando un extrusor de mesada (LiposoFast, Avestin) con membranas de policarbonato de 100 nm de diámetro de poro.

Los liposomas de SPC sin el surfactante fueron preparados de forma análoga y utilizados como control para los experimentos que se detallan a continuación.

Determinación del tamaño y potencial Z

El tamaño medio de las vesículas, el índice de polidispersidad (Pdl) y el potencial Z de las suspensiones de liposomas con y sin el surfactante se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y por análisis de dispersión de la luz de fase (PALS) respectivamente, empleando un equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Reino Unido).

Evaluación de la ultradeformabilidad (UD)

Se evaluó el grado de deformabilidad de las vesículas según Van Den Bergh *et al.* (2001). Para ello se midió el flujo de penetración de 2 ml de las suspensiones liposomales (10 mg.ml⁻¹) a través de una membrana doble de nitrocelulosa de 50 nm a una presión externa de 0,8 MPa, utilizando un extrusor Thermobarrel (Northern Lipids, Burnaby, Canadá). El



volumen extruido se recolectó cada 1 min durante un periodo total de 15 min. Para cada fracción se determinó el volumen y la cantidad de fosfolípidos mediante un microensayo colorimétrico de fosfatos (Böttcher *et al.* 1961). Para el cálculo de la elasticidad de las membranas de los liposomas, se utilizó la Ec.1.

$$D = J \times \left(\frac{r_v}{r_p}\right)^2 \quad (1)$$

donde D es la elasticidad de la vesícula, J el flujo de fosfolípidos (calculado como el área bajo la curva del gráfico de porcentaje de fosfolípidos en función del tiempo), r_v el diámetro de la vesícula luego de realizar el ensayo (medido por DLS), y r_p el tamaño de poro de la membrana (50 nm).

Análisis de la estabilidad coloidal

Se comparó el tamaño medio de las vesículas, PDI y potencial Z de las suspensiones de liposomas con y sin el surfactante para analizar la estabilidad coloidal de ambas formulaciones. Estas determinaciones se realizaron en intervalos de entre 15 y 30 días, durante un periodo total de 90 días de almacenamiento en oscuridad a 4°C. Los resultados fueron expresados como la media \pm SD de tres medidas independientes.

Estudios con ANS

Las interacciones electrostáticas entre Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC fueron evaluadas utilizando la sonda ANS, según la metodología descrita por Joondan *et al.* (2014). Para ello se preparó un stock de ANS 0,06 mM en DMSO, y suspensiones de LUV de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ a concentraciones finales de SPC de 1×10^{-3} y 2×10^{-5} M. Durante el ensayo, alícuotas de 600 μ l de las formulaciones liposomales fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes de ANS (entre 1×10^{-7} y 1×10^{-6} M). Para ello se añadió sucesivamente 1 μ l del stock de ANS y se incubaron las muestras durante 2 min a temperatura ambiente luego de cada agregado. A continuación, se determinó la intensidad de fluorescencia a 480 nm (λ_{ex} = 380 nm) utilizando un equipo RF-1501 (Shimadzu, Japón). Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

A partir de los gráficos de intensidad de fluorescencia vs. concentración de ANS (IF vs. C_{ANS}) se calcularon los parámetros de unión para cada sistema según se detalla a continuación. En primer lugar, se determinaron los coeficientes de emisión de los sistemas binario SPC:ANS (A_b) y ternario SPC:Bz-Arg-NHC₁₀:ANS (A_t) a partir de las pendientes de las curvas obtenidas para las formulaciones preparadas con una concentración de SPC



igual a 1×10^{-3} M. Para ambos sistemas, la concentración de ANS unido al fosfolípido (C_b) se calculó partir de los datos correspondientes a las suspensiones con SPC 2×10^{-5} M según la siguiente ecuación:

$$C_b = \frac{F_b - F_0}{A_x - A_0} \quad (2)$$

donde F_b y F_0 son la intensidad de fluorescencia de las soluciones con y sin SPC respectivamente, A_x es el coeficiente de emisión para el sistema correspondiente (A_b o A_t) y A_0 es el coeficiente de emisión para el ANS libre (calculado a partir de la pendiente de la curva de IF vs. C_{ANS} para la titulación con ANS de una solución de buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4, 0,9% p/v de NaCl, en ausencia de liposomas).

La constante y la capacidad de unión entre el ANS y SPC fueron calculadas empleando la ecuación de *Scatchard* (Ec. 3), asumiendo igual fuerza de enlace en todos los puntos de unión.

$$\frac{V}{[P]} = n \times K - V \times K \quad (3)$$

donde V es el número de moles unidos de ANS por mol de SPC, $[P]$ es la concentración de ANS libre, n es la capacidad de unión (el máximo valor de V), y K es la constante de unión. A partir de los gráficos $V/[P]$ vs. V se obtuvieron los valores de K y n como la pendiente e

intersección con el eje x de las regresiones lineales, respectivamente.

Estudios con DPH

Las interacciones hidrofóbicas entre Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC fueron evaluadas utilizando la sonda DPH (Joondan *et al.*, 2014). Se preparó un stock de DPH 1×10^{-4} M en THF, y suspensiones de LUV de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ a concentraciones finales de SPC de 1×10^{-3} y 2×10^{-5} M. Durante el ensayo, alícuotas de 250 μ l de las formulaciones de los LUV se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de DPH (entre 5×10^{-8} y 5×10^{-6} M) a temperatura ambiente, en oscuridad durante 1 h. Pasado este tiempo se midió la intensidad de fluorescencia a 440 nm ($\lambda_{ex} = 368$ nm) a 24°C en un lector de placas con control de temperatura Infinite M200 PRO (Tecan, Austria). Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

Con los datos obtenidos, se graficaron las curvas de IF vs. concentración de DPH (IF vs. C_{DPH}). A partir de estas gráficas se calcularon los parámetros de unión para cada sistema procediendo de manera análoga a lo descrito para ANS. En este caso, la fracción de DPH unido a SPC (X_b) se calculó de la siguiente manera:

$$X_b = \frac{I_A}{I_B} \quad (4)$$



donde I_A e I_B representan la intensidad de fluorescencia de las soluciones de SPC 2×10^{-5} y 1×10^{-3} M, respectivamente.

Estudios con Laurdan

El efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ en las interacciones de la interfase hidrofílica-hidrofóbica de la bicapa lipídica de SPC en los liposomas fue evaluado utilizando la sonda fluorescente Laurdan (Harris *et al.*, 2002). Para ello, se prepararon suspensiones de LUV de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ a concentraciones finales de SPC de 0,2 mM y un stock 0,18 mM de Laurdan en DMSO. Durante el ensayo, se incubaron 600 μ l de las formulaciones liposomales en presencia de la sonda (a una relación sonda/lípido de 1,5:1000) durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se registró el espectro de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 350$ nm) utilizando un espectrofluorómetro RF-1501 (Shimadzu, Japón). Todas las medidas fueron realizadas al menos por triplicado. Con los datos obtenidos se calculó la polarización generalizada (GP) para cada formulación, empleando la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (5)$$

donde I_{440} e I_{490} son las intensidades de fluorescencia a 440 y 490 nm, respectivamente. Los valores de GP

obtenidos para la formulación de SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ fueron contrastados con aquellos calculados para los liposomas de SPC mediante un análisis de varianza (ANOVA, *one-way analysis of variance*) y el *postest de Tukey*, utilizando el software InfoStat. P-values < 0,05 fueron considerados como significativos.

Resultados y Discusión

Evaluación de la ultradeformabilidad de la formulación obtenida

Existen dos factores determinantes que afectan la profundidad de penetración de una nanovesícula a través del SC intacto: su elasticidad o ultradeformabilidad y su tamaño. La ultradeformabilidad resulta del módulo de Young reducido de las bicapas lipídicas de los liposomas, un parámetro que caracteriza el comportamiento elástico de las membranas y que se reduce en aproximadamente un orden de magnitud respecto de aquel para las vesículas no deformables (Higa *et al.*, 2016).

Se estudió la deformabilidad de las nanovesículas de SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ con una concentración teórica de fosfolípidos igual 10 mg.ml⁻¹. Los resultados fueron comparados con los obtenidos para liposomas control de SPC sin el surfactante. La **Fig. 1** muestra las curvas de flujo de fosfolípidos a través de dos

membranas apiladas de diámetro de poro de 50 nm en función del tiempo.

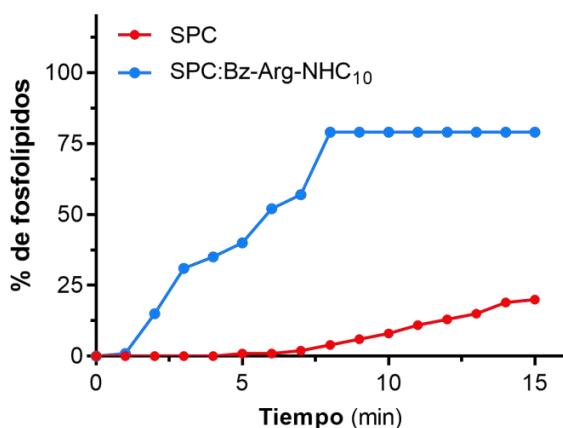


Fig. 1 Flujo de fosfolípidos a través de dos membranas de 50 nm a una presión de 0,8 MPa en función del tiempo para las formulaciones de SPC con y sin el agregado de un 20 mol% del surfactante Bz-Arg-NHC₁₀.

Para cada formulación se evaluó la elasticidad de los LUV a través de la determinación del valor de deformabilidad (D), calculado a partir del flujo de penetración a través de la barrera de permeabilidad (J). Los valores obtenidos fueron de 6563 y 657 % PL.min⁻¹ para las formulaciones de SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC, respectivamente (**Tabla 1**).

En particular, el valor de D hallado para los liposomas de SPC coincide con el reportado previamente para una formulación equivalente, y se corresponde al de liposomas no deformables (Perez *et al.*, 2016). En el caso de los LUV conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ (relación molar 1:0,25), el valor de D calculado resultó 10 veces mayor que el de

la formulación convencional. Este valor es comparable al de una preparación de nanovesículas de SPC con un 28,6 mol% (relación molar 1:0,4) del tensioactivo no iónico Tween 80, los cuales mostraron un comportamiento característico de los liposomas ultradeformables (Perez *et al.*, 2016).

Tabla 1 Parámetros de evaluación de la deformabilidad de las formulaciones liposomales (PL: fosfolípidos).

Parámetro	Formulación	
	SPC	SPC:Bz-Arg-NHC ₁₀
J (% PL.min ⁻¹)	90	987,5
r_v (nm)	135,1	128,9
r_p (nm)	50	50
D (% PL.min ⁻¹)	657	6563
Reducción del tamaño (%)	1,07	1,01

J : flujo de fosfolípidos (calculado como el área bajo la curva del gráfico de porcentaje de fosfolípidos en función del tiempo); r_v : el diámetro de la vesícula luego de realizar el ensayo; r_p : el tamaño de poro de la membrana, D : es la elasticidad de la vesícula.

El estudio llevado a cabo por Perez y colaboradores (2016) también ha reportado la evaluación de la deformabilidad de liposomas de SPC conteniendo un 23 mol% de colato de sodio (NaChol, relación molar 1:0,3). Para estas vesículas se ha observado un aumento de 5 veces el valor de D respecto de aquel registrado para los liposomas no deformables, y fueron reportados como liposomas UD.



En este contexto, los resultados obtenidos sugieren que Bz-Arg-NHC₁₀ funcionaría como activador de borde tan eficientemente como el Tween 80 o el NaChol, modificando el empaquetamiento de los fosfolípidos en la bicapa de la membrana de los liposomas y aumentando así su elasticidad.

Análisis de la estabilidad coloidal

Se ha descrito que los liposomas UD intactos pueden atravesar poros de un diámetro aproximadamente tres veces menor que su tamaño (Trotta *et al.*, 2002). Teniendo esto en cuenta, y considerando que el diámetro de los poros presentes en la matriz lipídica del SC puede abrirse como máximo hasta 20-40 nm sin causar un daño importante en la barrera de la piel (Cevc *et al.*, 1998; Ogunsola *et al.*, 2012; Trotta *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2003), solo aquellas liposomas UD con un tamaño cercano a los 120 nm tienen posibilidades de atravesar esta capa de la piel. Por lo tanto, resulta importante que el tamaño de los liposomas diseñados se mantenga cercano a este valor durante su almacenamiento.

En este contexto, se evaluó la estabilidad coloidal de las vesículas de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ en suspensión para un período total de almacenamiento de 90 días en oscuridad a 4°C. Con este fin, se determinó su tamaño, Pdl y potencial Z en intervalos de entre 15 y 30 días (**Tabla 2**). De acuerdo con estos resultados, los liposomas de SPC serían estables almacenados durante al menos 60 días en estas condiciones, lo que se deduce por el valor constante en sus propiedades coloidales durante dicho período. En el caso de la formulación conteniendo el Bz-Arg-NHC₁₀, para el mismo tiempo de almacenamiento, se observó un aumento tanto del tamaño de las vesículas como de su Pdl, sugiriendo una menor estabilidad coloidal de esta formulación. En este caso, los parámetros evaluados evidenciaron que la formulación de SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ sería estable durante solo 30 días de almacenamiento en las condiciones ensayadas. A pesar de que se registró un leve aumento del tamaño de los LUV durante este tiempo, su valor se mantuvo en la escala de tamaños de referencia para este tipo de vesículas.

Tabla 2 Estabilidad coloidal de las formulaciones liposomales tras 90 días de almacenamiento en oscuridad a 4°C

Tiempo (días)	Formulaciones					
	SPC			SPC:Bz-Arg-NHC ₁₀		
	Tamaño (nm)	Pdl	Pot. Z (mV)	Tamaño (nm)	Pdl	Pot. Z (mV)
0	138,2 ± 4,3	0,12 ± 0,03	-5,3 ± 0,1	140,9 ± 5,6	0,13 ± 0,01	-5,0 ± 0,3
15	132,4 ± 6,6	0,11 ± 0,01	-5,1 ± 0,3	156,3 ± 7,8	0,13 ± 0,01	-5,1 ± 0,3
30	141,9 ± 10,3	0,13 ± 0,03	-5,7 ± 0,3	165,8 ± 15,3	0,17 ± 0,03	-5,3 ± 0,3
60	140,3 ± 5,5	0,25 ± 0,02	-5,0 ± 0,5	621,3 ± 123,5	0,56 ± 0,13	-5,3 ± 0,3
90	355,2 ± 17,8	0,45 ± 0,02	ND	856,4 ± 42,8	0,67 ± 0,03	-5,0 ± 0,3

Pdl: el índice de polidispersidad; **Pot. Z:** el potencial Zeta.

Evaluación de las interacciones electrostáticas

El ANS es una sonda molecular fluorescente empleada para el estudio y comparación de las interacciones electrostáticas entre lípidos y otras moléculas, incluyendo surfactantes derivados de aminoácidos (Joondan *et al.*, 2014, 2015, 2021). Al encontrarse libre en solución acuosa, esta sonda posee un máximo de emisión de fluorescencia a 545 nm con una baja intensidad de emisión. Sin embargo, al disolverse en solventes no polares o al unirse a macromoléculas, la intensidad de la emisión de fluorescencia aumenta, observándose un corrimiento del máximo del espectro de emisión hacia alrededor de los 480 nm (Stryer 1968). En el caso de los liposomas, se considera que este aumento en la fluorescencia se debe principalmente a la disminución en la polaridad del entorno de la sonda al incorporarse en la bicapa lipídica.

Se realizaron ensayos de unión de ANS a los liposomas de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ de manera de caracterizar las interacciones electrostáticas entre el fosfolípido y el surfactante. Se construyeron los gráficos de *Scatchard* (**Fig. 2**), los cuales muestran la relación entre la concentración de sonda unida y el total de sitios de unión para la sonda disponibles. A partir de estos gráficos se obtuvieron los parámetros de unión n y K . El primero tiene en cuenta la capacidad de unión de la sonda al fosfolípido, mientras que el segundo está relacionado con la afinidad entre ambas moléculas y se define como la inversa de su constante de disociación. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 3**.

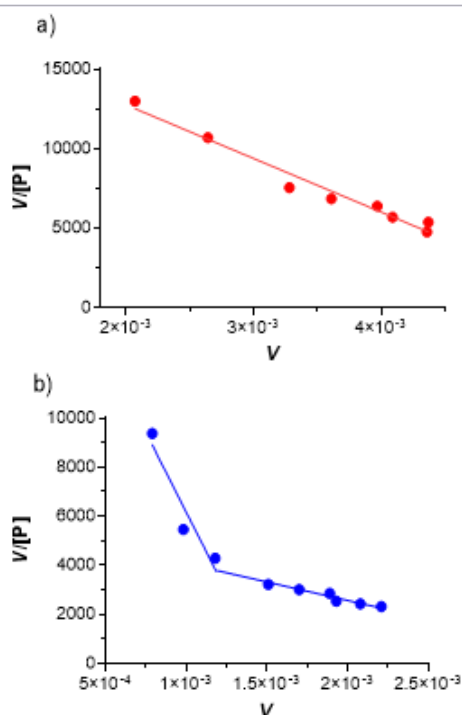


Fig. 2 Gráficos de Scatchard para la unión de ANS a SPC en liposomas de (a) SPC y (b) SPC con el agregado de un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀. v : número de moles de ANS unidos por mol de SPC; $[P]$: concentración de ANS libre.

La relación entre los coeficientes de emisión A_t y A_b refleja el aumento de la intensidad de la emisión de fluorescencia del ANS unido a SPC en presencia de Bz-Arg-NHC₁₀ respecto del sistema SPC:ANS. Por lo tanto, este valor se relaciona directamente con la fuerza de interacción entre el tensioactivo y el

fosfolípido: un valor igual a 1 indica poca interacción entre ambas moléculas, mientras que valores mayores evidencian la existencia de uniones electrostáticas. En este caso, la relación A_t/A_b para los sistemas ternario y binario estudiados es igual a 1,09. El valor superior a 1 sugiere la existencia de interacciones electrostáticas entre Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC, y se correlaciona con el aumento de la intensidad de la emisión de fluorescencia evidenciado para el ANS unido a SPC en presencia del tensioactivo (**Fig. 3**).

Otros estudios han demostrado que la adición de moléculas catiónicas capaces de interactuar con los lípidos de la membrana de un liposoma aumenta la intensidad de la emisión de fluorescencia del ANS (Joondan *et al.*, 2015). Este fenómeno se debería a la neutralización de la carga negativa del grupo fosfato para el par de moléculas fosfolípido-surfactante, favoreciendo la unión del ANS. Sin embargo, el valor de n calculado para ANS fue menor en el caso de los liposomas de SPC:Bz-Arg-NHC₁₀.

Tabla 3 Parámetros de unión de ANS a SPC para las formulaciones de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀.

Formulación	A_x	K (M ⁻¹)	K_1 (M ⁻¹)	K_2 (M ⁻¹)	n
SPC	$3,22 \times 10^7$	$3,37 \times 10^6$	-	-	0,00579
SPC:Bz-Arg-NHC ₁₀	$3,51 \times 10^7$	-	$1,30 \times 10^7$	$1,36 \times 10^6$	0,00390

A_x : el coeficiente de emisión para el sistema correspondiente; K : la constante de unión; K_1 : la constante de unión correspondiente a la regresión lineal de mayor pendiente; K_2 : la constante de unión correspondiente a la regresión lineal de menor pendiente; n : la capacidad de unión.

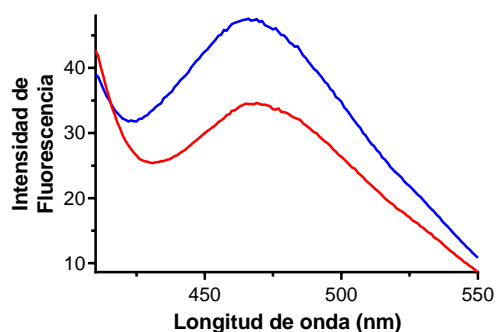


Fig. 3 Espectros de emisión de fluorescencia para ANS (1×10^{-7} M) en presencia de liposomas de SPC (rojo) y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ (azul), ambos a una concentración de fosfolípidos igual a 1×10^{-3} M.

Joondan y colaboradores (2014) han descrito el estudio de los parámetros de unión del ANS a liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). El valor de K obtenido para la unión de ANS a SPC fue del mismo orden que el observado para DPPC (2×10^6 M⁻¹). Este comportamiento es esperable considerando que la unión entre el ANS y los fosfolípidos ocurre a través de interacciones electrostáticas entre el grupo sulfonato (cargado negativamente) de la sonda y el nitrógeno cuaternario (con carga positiva) de la porción colina del fosfolípido, presente tanto en las moléculas de SPC como de DPPC (Joondan *et al.*, 2014). En su trabajo, los investigadores además han estudiado el efecto de la presencia de surfactantes catiónicos derivados de fenilalanina y tirosina sobre los parámetros antes mencionados. Los valores de K reportados para la unión de ANS a DPPC en presencia de los hidroclouros de L-

fenilalanina decil éster y L-tirosina decil éster (2×10^7 y 3×10^7 M⁻¹, respectivamente) fueron del orden de la constante de unión primaria (K_1) de ANS a SPC en presencia de Bz-Arg-NHC₁₀. La curva de *Scatchard* para el sistema SPC:Bz-Arg-NHC₁₀:ANS evidencia un comportamiento lineal bifásico (**Fig. 2b**). El cambio en la pendiente de la recta $V/[P]$ vs. V es indicativo de la inducción de una unión secundaria entre la sonda y el lípido en presencia del tensioactivo, corroborando la existencia de interacciones electrostáticas entre las regiones polares de SPC y Bz-Arg-NHC₁₀ (Ma *et al.*, 1985).

Análisis de las interacciones hidrofóbicas

El DPH es otra sonda fluorescente utilizada frecuentemente para analizar la polaridad del medio circundante a su sitio de unión. Al igual que el ANS, el DPH es una molécula no fluorescente cuando se encuentra en un entorno polar, mientras que al incorporarse en un entorno hidrofóbico, como en el interior de la bicapa lipídica, emite una fuerte señal de fluorescencia a 440 nm (Santhosh *et al.*, 2013). En el caso de los liposomas o membranas biológicas, en presencia de compuestos que sean capaces de interactuar con los fosfolípidos en su región no polar, se observará el *quenching* o disminución de la señal de fluorescencia

debido a la competencia entre dichas moléculas y el DPH por los sitios de unión (Joondan *et al.*, 2015).

Teniendo esto en cuenta, se realizaron estudios de unión de DPH a liposomas de SPC preparados con y sin el agregado de Bz-Arg-NHC₁₀, de manera de evaluar las interacciones hidrofóbicas entre el fosfolípido y el surfactante. Los parámetros de unión (**Tabla 4**) fueron obtenidos a partir de los gráficos de *Scatchard* (**Fig. 4**) y los resultados para los sistemas binario (SPC:DPH) y ternario (SPC:Bz-Arg-NHC₁₀:DPH).

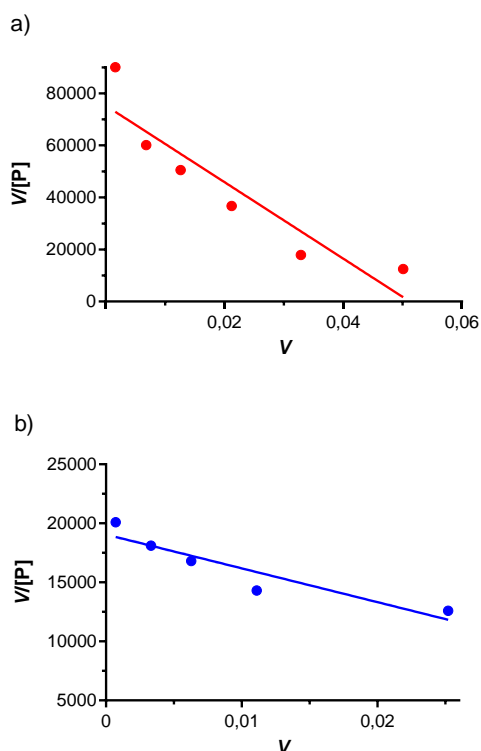


Fig. 4 Gráfico de *Scatchard* para la unión entre DPH y SPC en (a) ausencia y (b) presencia de un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀. *V*: número de moles unidos de DPH por mol de SPC; *[P]*: concentración de DPH libre.

El valor de la constante de unión (*K*) de DPH obtenido para SPC fue del mismo orden que el reportado previamente para DPPC ($3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), sugiriendo una unión hidrofóbica fuerte entre la sonda y el fosfolípido (Joondan *et al.*, 2014).

Tabla 4 Parámetros de unión de DPH a SPC obtenidos para las formulaciones liposomales de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀.

Formulación	<i>K</i> (M^{-1})	<i>n</i>
SPC	$1,47 \times 10^6$	0,051
SPC:Bz-Arg-NHC ₁₀	$2,87 \times 10^5$	0,066

K: la constante de unión; *n*: la capacidad de unión.

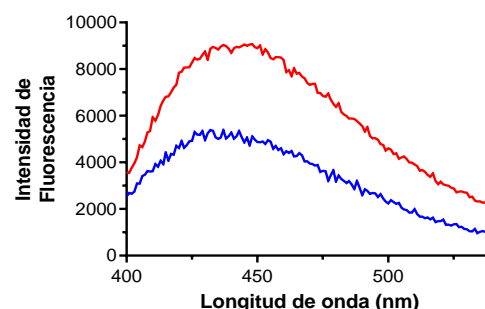


Fig. 5 Espectros de emisión de fluorescencia para DPH ($2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$) en presencia de liposomas de SPC (rojo) y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ (azul), ambos a una concentración de fosfolípidos igual a $1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Los experimentos llevados a cabo revelaron que la incorporación de Bz-Arg-NHC₁₀ en las membranas de los liposomas de SPC provocó una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia del DPH, como se observa en los espectros de la **Fig. 5**. La disminución de la fluorescencia observada en el caso de los liposomas de



SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ sugiere el desplazamiento de las moléculas de DPH, probablemente debido a la interacción entre surfactante y los fosfolípidos en las cercanías de los sitios de unión de la sonda.

Estos resultados coinciden con los informados por Joondan y colaboradores (2014) para tensioactivos derivados de fenilalanina y tirosina, con una cadena hidrocarbonada de longitud equivalente a la de Bz-Arg-NHC₁₀. En sus investigaciones, los valores de K reportados para DPH y DPPC en presencia de estos compuestos ($6,13 \times 10^{-4}$ y $7,47 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, respectivamente) también evidenciaron una disminución respecto de la constante de unión para DPPC, sugiriendo una fuerte interacción hidrofóbica entre las moléculas de los surfactantes y el fosfolípido. Esta disminución también fue registrada en el caso de SPC en presencia de Bz-Arg-NHC₁₀ (**Tabla 4**), corroborando lo observado al analizar el *quenching* de la fluorescencia y estableciendo bases sólidas para afirmar la existencia de interacciones hidrofóbicas entre ambas moléculas.

Efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre los valores de GP del Laurdan

El Laurdan es una molécula perteneciente a la familia de las sondas fluorescentes sensibles a la polaridad del

entorno. La misma es utilizada para detectar cambios en las propiedades de fase de las membranas y diferencias en el orden de los fosfolípidos. La evaluación de los cambios en la fluidez de las membranas es posible debido a la sensibilidad de la sonda a los efectos de relajación dipolar del solvente.

La distribución de las moléculas del Laurdan en una membrana es homogénea, acomodándose de forma indistinta tanto en la fase gel (más ordenada y con un entorno más rígido) como en la fase líquido-cristalina (más fluida). Sin embargo, las propiedades fluorescentes de la sonda varían de acuerdo con su entorno. Es así como, dependiendo de cuál de las fases sea la predominante en una membrana, se observará un corrimiento en el máximo del espectro de emisión de fluorescencia de la sonda. Cuando las moléculas se ubiquen en fase gel, al excitar el fluoróforo a 350 nm, la longitud de onda de emisión máxima se encontrará alrededor de los 440 nm; mientras que en fase líquido-cristalina, el máximo de emisión estará cerca de los 490 nm (Parasassi *et al.*, 1991).

Los cambios en el espectro de emisión de fluorescencia del Laurdan pueden ser cuantificados mediante el cálculo de la *polarización generalizada* o GP (Parasassi *et al.*, 1991). El valor de GP puede variar entre -1 (exposición total al solvente) y +1 (sin efecto del solvente), siendo mayor

cuando se observa una menor relajación dipolar, lo que indica un entorno más rígido (Sanchez *et al.*, 2012). En este sentido, se han demostrado valores característicos de GP tanto para la fase gel ($GP = 0,6$) como para la fase líquido-cristalina ($GP = -0,2$) (Parasassi *et al.*, 1991).

Considerando lo anterior, se calcularon los GP para el Laurdan incorporado en los liposomas de SPC y SPC:Bz-Arg-NHC₁₀ (Fig. 6). Los valores obtenidos fueron de $0,226 \pm 0,017$ y $0,179 \pm 0,009$, respectivamente. La disminución del GP observada en el caso de los liposomas conteniendo a Bz-Arg-NHC₁₀ puede relacionarse con una mayor movilidad y/o penetración de las moléculas de agua en la región polar de la bicapa lipídica de los liposomas, sugiriendo que en este caso el Laurdan se ubicaría en un entorno menos ordenado. De esta manera, Bz-Arg-NHC₁₀ contribuiría a la desorganización de la membrana de los liposomas, alterando el empaquetamiento de los fosfolípidos, pero sin modificar el estado de fase, ya que los valores de GP para ambas formulaciones fueron intermedios a los característicos para cada fase.

Se ha reportado previamente la preparación de liposomas de SPC conteniendo NaChol como activador de borde (Calienni *et al.*, 2018). En este caso, el valor de GP calculado fue de $-0,188 \pm 0,003$, sugiriendo que la presencia de este

activador de borde tiene un efecto aun mayor que Bz-Arg-NHC₁₀ en la fluidez de las membranas de los liposomas, que en este caso se encontrarían en un entorno menos ordenado.

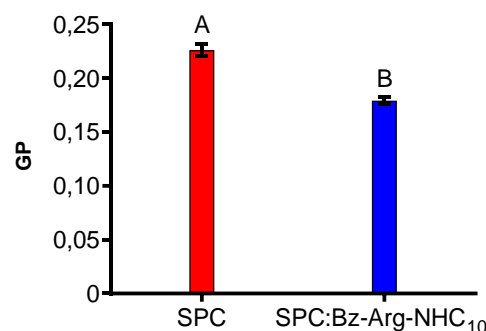


Fig. 6 Efecto de la incorporación de un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre los valores de polarización generalizada (GP) del Laurdan en liposomas de SPC. Los valores se expresan como la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Conclusiones

La administración de principios activos a través de la piel constituye una estrategia terapéutica de creciente interés. Los liposomas han sido empleados exitosamente como sistemas de administración tópica, dérmica y transdérmica. Su composición, similar a la de las membranas celulares, es la responsable de la baja toxicidad y buena tolerabilidad de estas nanovesículas. Sin embargo, los liposomas clásicos no son capaces de penetrar en las capas más profundas de la piel y permanecen en las



regiones más superficiales del SC. Para superar esta barrera de permeabilidad, se ha recurrido al uso de moléculas conocidas como activadores de borde que alteran la elasticidad de los liposomas y favorecen su permeación a través de las distintas capas de la piel.

El trabajo aquí presentado ha probado la capacidad de Bz-Arg-NHC₁₀, un surfactante catiónico derivado de arginina, de actuar como activador de borde. Los resultados de los experimentos realizados evidenciaron que el agregado de un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ a liposomas de SPC se traduce en un aumento en su elasticidad, permitiendo su clasificación como liposomas ultradeformables. Lo que indicaría que estos liposomas serían capaces de atravesar poros de tamaño mucho menor que su propio diámetro, presentándolos así como potenciales herramientas para la administración transdérmica de fármacos.

Los estudios con sondas fluorescentes llevados a cabo evidenciaron que Bz-Arg-NHC₁₀ interacciona con los fosfolípidos tanto a través de uniones electrostáticas como hidrofóbicas. Mientras que las interacciones iónicas ocurrirían a través del grupo guanidinio cargado positivamente de la arginina y el grupo fosfato con carga negativa de la región polar del fosfolípido, las interacciones hidrofóbicas se darían principalmente entre los residuos de ácidos

grasos de SPC y la cadena hidrocarbonada y el grupo benzoilo del tensioactivo. Estos resultados se condicen con la naturaleza anfifílica de ambas moléculas. La **Fig. 7** muestra un esquema de la inserción de Bz-Arg-NHC₁₀ en una monocapa de la membrana de liposomas formados por SPC. Estudios anteriores han descripto que la presencia del grupo benzoilo en la molécula del surfactante le otorgaría a la misma una marcada hidrofobicidad, lo que favorece su interacción y penetración a través de las membranas biológicas, y representa un impedimento estérico para el establecimiento de las interacciones electrostáticas (Hermet *et al.*, 2021). Podría sugerirse entonces que las principales fuerzas que estabilizan la unión entre Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC en las membranas de los liposomas serían las hidrofóbicas, orientando las moléculas de manera tal que se favorecen las uniones electrostáticas entre las regiones polares del tensioactivo y el fosfolípido. Estas últimas neutralizarían la carga negativa de la región polar de las moléculas de SPC, alterando las propiedades fisicoquímicas y la actividad superficial de los fosfolípidos (Ma *et al.*, 1985). Finalmente, estos cambios se verían reflejados en el aumento de la fluidez de las membranas de los liposomas conteniendo el surfactante, corroborado mediante la determinación del valor *GP*

para el Laurdan, y contribuirían al aumento de la deformabilidad de las vesículas.

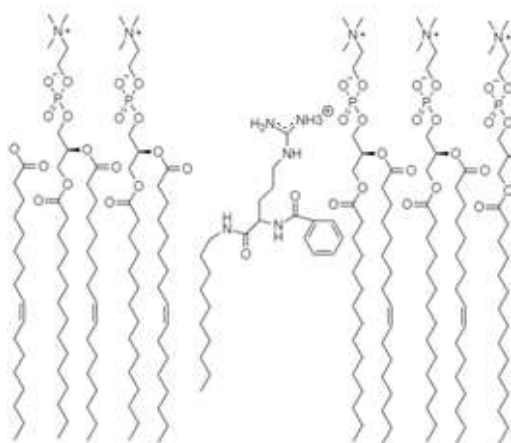


Fig. 7 Esquema representando la interacción entre Bz-Arg-NHC₁₀ y SPC en una monocapa de SPC de la membrana de los liposomas.

La evidencia recopilada en este trabajo sugiere que el surfactante Bz-Arg-NHC₁₀ podría emplearse en el desarrollo de nuevos sistemas de administración transdérmica, específicamente a través de su empleo como activador de borde en liposomas ultradeformables.

Bibliografía

- Böttcher, C. J. F., Van gent, C. M., & Pries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta*, 24(C), 203–204. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(61\)80041-X](https://doi.org/10.1016/0003-2670(61)80041-X)
- Calienni, M. N., Temprana, C. F., Prieto, M. J., Paolino, D., Fresta, M., Tekinay, A. B., del

Valle Alonso, S., & Montanari, J. (2018). Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: Skin penetration, in vitro, and in vivo toxicological evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(3), 496–514. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0469-1>

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A., & Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1368(2), 201–215. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00177-6)

Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., & Morcelle del Valle, S. R. (2012). Producción de un agente antimicrobiano con potencial actividad tensioactiva mediante el empleo de tecnologías amigables con el medio ambiente. *Augmdomus*, 4, 49–61.

Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S., Lorenzo, J., & Morcelle, S. R. (2015). Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47(7), 1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>

Ferreira, H., Ribeiro, A., Silva, R., & Cavaco-Paulo, A. (2015). Deformable Liposomes for the Transdermal Delivery of Piroxicam. *Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research*, 04(04), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2325-9604.1000139>

Ghume, V. K., Golhar, A. R., Merkar, A. N., Dokhe, M. D., & Parjane, S. K. (2020). Transdermal Drug Delivery System: A



- Review. *American Journal of PharmTech Research*, 10(2), 33–47.
<https://doi.org/10.46624/ajptr.2020.v10.i2.004>
- Harris, F. M., Best, K. B., & Bell, J. D. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1565(1), 123–128.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00514-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00514-X)
- Henning, M. F. (2009). *Caracterización de la interacción de lipopolisacáridos bacterianos con proteínas y membranas* [Universidad Nacional de La Plata].
<https://doi.org/10.35537/10915/2689>
- Hermet, M., Elisa Fait, M., Vazquez, R. F., Mate, S., Daza Millone, M. A., Elena Vela, M., García, M. T., Morcelle, S. R., & Bakas, L. (2021). Interaction of cationic surfactants with DPPC membranes: effect of a novel N α -benzoylated arginine-based compound. *Amino Acids*, 53(4), 609–619.
<https://doi.org/10.1007/s00726-021-02964-2>
- Higa, L. H., Arnal, L., Vermeulen, M., Perez, A. P., Schilreff, P., Mundiña-Weilenmann, C., Yantorno, O., Vela, M. E., Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2016). Ultradeformable archaeosomes for needle free nanovaccination with leishmania braziliensis antigens. *PLoS ONE*, 11(3), 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150185>
- Jong, A. A., Nangare-Patil, P., Patil, S. S., Vakhariya, R. R., & Mohite, S. K. (2021). Transfersomes: A Peculiar and Promising Technique for Transdermal Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine*, 6(4), 67–82.
<https://doi.org/10.47760/ijpsm.2021.v06i04.006>
- Joondan, N., Caumul, P., Akerman, M., & Jhaumeer-Laulloo, S. (2015). Synthesis, micellisation and interaction of novel quaternary ammonium compounds derived from L-Phenylalanine with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine as model membrane in relation to their antibacterial activity, and their selectivity over human. *Bioorganic Chemistry*, 58, 117–129.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.01.001>
- Joondan, N., Caumul, P., Jackson, G., & Jhaumeer Laulloo, S. (2021). Novel quaternary ammonium compounds derived from aromatic and cyclic amino acids: Synthesis, physicochemical studies and biological evaluation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 235(October 2020), 105051.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105051>
- Joondan, N., Jhaumeer-Laulloo, S., & Caumul, P. (2014). A study of the antibacterial activity of L-Phenylalanine and L-Tyrosine esters in relation to their CMCs and their interactions with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC as model membrane. *Microbiological Research*, 169(9–10), 675–685.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.010>
- Kalim, M., Tyagi, P. S., & Upadhyay, S. (2021). A Review on Transfersomal Drug Delivery System. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 12(3), 34–41.
- Ma, J. Y. C., Ma, J. K. H., & Weber, K. C. (1985). Fluorescence studies of the binding of



- amphiphilic amines with phospholipids. *Journal of Lipid Research*, 26(6), 735–744. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)34331-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)34331-5)
- Ogunsola, O. A., Kraeling, M. E., Zhong, S., Pochan, D. J., Bronaugh, R. L., & Raghavan, S. R. (2012). Structural analysis of “flexible” liposome formulations: New insights into the skin-penetrating ability of soft nanostructures. *Soft Matter*, 8(40), 10226–10232. <https://doi.org/10.1039/c2sm26614h>
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., & Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 60(1), 179–189. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82041-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0)
- Perez, A. P., Altube, M. J., Schilreff, P., Apezteguia, G., Celes, F. S., Zacchino, S., de Oliveira, C. I., Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2016). Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.003>
- Pinazo, A., Manresa, M. A., Marques, A. M., Bustelo, M., Espuny, M. J., & Pérez, L. (2016). Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 17–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>
- Rastogi, V., & Yadav, P. (2012). Transdermal drug delivery system: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 6(3), 161–170. <https://doi.org/10.4103/0973-8398.104828>
- Rougier, A., Lotte, C., Corcuff, P., & Maibach, H. (1988). Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age, and sex in man. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 39(1), 15–26.
- Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., & Gratton, E. (2012). Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), 7314–7319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118288109>
- Santhosh, P. B., Velikonja, A., Perutkova, Š., Gongadze, E., Kulkarni, M., Genova, J., Eleršič, K., Iglič, A., Kralj-Iglič, V., & Ulrih, N. P. (2013). Influence of nanoparticle-membrane electrostatic interactions on membrane fluidity and bending elasticity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 178(December), 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.009>
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258–268. <https://doi.org/10.1038/35051736>
- Stryer, L. (1968). Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science*, 162(3853), 526–533. <https://doi.org/10.1126/science.162.3853.526>
- Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F., & Gallarate, M. (2002). Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

International Journal of Pharmaceutics,
241(2), 319–327.

[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00266-1)

Van Den Bergh, B. A. I., Wertz, P. W., Junginger, H. E., & Bouwstra, J. A. (2001). Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. *International Journal of Pharmaceutics*, 217(1–2), 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00576-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00576-2)

Verma, D. D., Verma, S., Blume, G., & Fahr, A. (2003). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: A skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(3), 271–277. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00021-3)

Processamento e caracterização microestrutural de alumínio deformado plasticamente :
Análise do incremento de nanoplacas de grafeno por forjamento de dobras acumulativas.



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

Ciência e Engenharia de Materiais

Processamento e caracterização microestrutural de alumínio deformado plasticamente: Análise do incremento de nanoplacas de grafeno por forjamento de dobras acumulativas.

Autor: Adorno, Luciane; lucianerodriguesadorno@gmail.com

Co-autor(es): Hodecker, Weliton; weliton.hodecker@ufsc.br

Professor: Rocha, Márcio; Marcio.rocha@ufsc.br

Universidade Federal de Santa Catarina

Resumo

Os nanocompósitos de matriz metálica têm atraído atenção pela sua alta relação resistência/peso, dureza e resistência ao desgaste. Dentro de uma vasta gama de materiais, o alumínio e suas ligas têm destaque por apresentar facilidade de aplicação, por ser econômico e versátil e, portanto, utilizado para a produção de compósitos com diferentes elementos de reforço. Aqui destaca-se o grafeno, o qual vem sendo utilizado como reforço devido ao seu peso leve e baixo coeficiente de expansão térmica. Para a produção dos nanocompósitos de alumínio-grafeno, diversas técnicas são adotadas, sendo que neste trabalho buscou-se avaliar o comportamento do alumínio e a inserção de nanoplacas de grafeno pelo processo de forjamento por dobras acumulativas para a formação de materiais com grande dispersão e refino microestrutural. Foram aplicadas até 30 etapas de conformação (dobras) com tratamentos de recozimentos intermediários de 200°C/ 1 hora, resultando em múltiplas camadas com 2 vol % de reforço adicionado. As amostras produzidas apresentaram uma microestrutura com intercamadas coesas e caldeadas. A resistência mecânica aumentou com o aumento do número de dobras, resultado de uma melhor dispersão das partículas de grafeno melhor dispersas na matriz, como também do conseqüente refino da estrutura pela deformação aplicada.

Palavras-chave: Nanocompósitos, ligas, deformação plástica severa.



Introdução:

O compósito é um material multifásico produzido artificialmente, onde as fases que o constituem são quimicamente diferentes e separadas por uma distinta interface. O material formado exibe uma proporção relevante das propriedades das fases que o constituem, de tal forma que são obtidas melhores combinações das propriedades (Callister Jr, 2000). De maneira geral, grande parte dos compósitos são formados por duas fases, sendo a primeira contínua e com maior fração volumétrica na mistura, chamada de matriz, e a segunda que é chamada de fase dispersa.

Relacionado a nanotecnologia, a mesma faz referência a compreensão, exploração e controle de sistemas e materiais com propriedades modificadas devido à escala nanométrica, sendo essa escala definida pela presença de ao menos uma dimensão física característica entre 1 e 100 nm.

Um crescente interesse vem surgindo em relação aos estudos que englobam a nanotecnologia, principalmente no que tange aos nanocompósitos. Nesse sentido, os nanocompósitos são classificados de forma prática como uma nova classe de materiais compósitos, onde possuem pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica.

Um grande destaque vem sendo atribuído aos nanocompósitos de matriz metálica, visto que, devido à alta resistência a fadiga, fluência, estabilidade dimensional e aumento da tensão de escoamento sem grande comprometimento da ductilidade, vem sendo muito utilizado em uma gama de aplicações, que envolvem desde os setores automobilísticos, aeroespaciais de microeletrônica e biomédicos. (TJONG, 2013).

Sobre a fabricação dos nanocompósitos, o alumínio e suas ligas tem recebido significativa atenção e vem sendo muito utilizado, mesmo sendo um material relativamente mole, apresenta elevada resistência por peso específico, apresenta boa estabilidade química e tem grande destaque o compósito com matriz de alumínio reforçado com grafeno, onde consegue cobrir amplas características metalúrgicas superiores que são exigidas nas indústrias. (Sabirov, 2013).

O grafeno é uma das formas alotrópicas do carbono, que apresenta hibridização sp^2 e a espessura de apenas um átomo, os átomos de um elemento como o carbono podem se unir de diversas formas geométricas, formando diferentes substâncias, isso é o que chamamos de alotropia). O grafeno quando inserido como um reforço de matriz metálica, atribui

propriedades mecânicas superiores aos metais comuns.

Existem diversas formas de processamento que são desenvolvidas com o intuito de inserir o reforço de grafeno na matriz metálica. A combinação da fabricação dos nanocompósitos com a deformação plástica severa permite o reforço da matriz, entre os processos de deformação plástica severa, pode-se citar alguns que foram desenvolvidos com o intuito de obtenção de uma granulação ultrafina, como extrusão por canal angular, torção de alta pressão, colagem por pressão cumulativa, colagem cumulativa de rolos e forjamento multidirecional (Khodabakhshi, 2018).

O forjamento por dobras acumulativas é um novo processo de deformação plástica severa que foi introduzido por (Khodabakhshi, 2018), que pode ser trabalhado em conjunto com outros processos e mantém-se como um método promissor pela sua eficácia para produzir estruturas metálicas em camadas e por ser um método simples e barato. O princípio de seu funcionamento é baseado na dobra repetitiva para formar a ligação entre as camadas, onde entre elas são distribuídas agentes de reforço e depois são pressionadas sendo assim conformadas mecanicamente, como resultado temos um número de camadas extremamente elevado e a presença de um

material com grãos refinados e com dispersão homogênea das nanopartículas de agentes de reforço entre as camadas (Khodabakhshi, 2018).

Podemos ter alguns empecilhos durante o processo de fabricação, onde pode-se destacar como um problema o surgimento de fases indesejáveis ao inserir o reforço de grafeno na matriz de alumínio, que podem comprometer as propriedades mecânicas, como no caso do surgimento de carbeto de alumínio.

Isso pode ser evidenciado devido a defeitos na morfologia na estrutura do grafeno, pelas elevadas temperaturas e também pela energia mecânica no processo, que pode promover a ligação entre os componentes devido a geração da energia livre. (BARTOLUCCI,2011).

Outro problema que pode vir a ser evidenciado é devido a tendência de aglomeração que os materiais a base de carbono possuem, nesse sentido, podem comprometer na dispersão de forma homogênea dos agentes de reforço.

Diante do exposto, o presente trabalho visou estudar a rota de deformação plástica severa, a partir do novo método de forjamento por dobras acumulativas.

Objetivo geral

O objetivo desse projeto foi estudar o novo método de forjamento por dobras acumulativas baseado no processo de deformação plástica severa, visando analisar o incremento de nanoplacas de grafeno na matriz de alumínio.

Objetivos específicos

- Estudar a rota de deformação plástica pelo forjamento de dobras acumulativas para a fabricação de nanocompósitos de alumínio e grafeno;
- Estudar a dispersão do grafeno inserido na matriz metálica e o efeito da fração volumétrica de agente de reforço adicionado;
- Estudar o efeito da intensidade da deformação imposta no processamento das amostras e seu efeito sobre as propriedades mecânicas;
- Estudar as alterações nas propriedades mecânicas ao comparar amostras monolíticas e amostras com reforço.

Materiais e Métodos

Para a preparação das amostras, folhas de alumínio AA1050 com 0,3mm de espessura foram utilizadas. Elas foram lixadas para remover impurezas (óxidos superficiais) e aumentar a interação entre as camadas no

momento da conformação, e limpas em banho ultrassônico com álcool etílico por 15 minutos para eliminar os resíduos. Para aumentar a capacidade de deformação plástica, as amostras foram recozidas após cada dobra em um forno mufla em 200° C por 1 hora. Estas folhas foram então cortadas em tiras com as dimensões (20x15x0,2)mm e dobradas ao meio, tendo sido aplicadas até 30 dobras.

As amostras dobradas foram deformadas sob compressão (deformação aplicada igual a 50% da espessura inicial) em uma prensa hidráulica com capacidade de até 30 toneladas. Para cada etapa de dobramento, as amostras eram novamente recozidas, lixadas e limpas no banho ultrassônico com álcool etílico. A partir desse ponto, todo o processo foi repetido, onde as amostras são dobradas e as camadas anteriores são duplicadas.

Amostras foram preparadas com a adição de nanoplacas de grafeno (XCSciences - xGnP H5 – espessura média ~15nm e área superficial de 50 a 80 m²/g), aplicadas sobre a superfície das folhas de alumínio na forma de uma solução preparada a base de acetona 99% de pureza com a mistura do grafeno por agitação magnética por 3 horas, seguida de agitação em banho ultrassônico aquecido a 60°C/3 horas. Foram cortadas 15 tiras de alumínio com as dimensões de

(20x15x0,2)mm, que foram aquecidas sobre uma base aquecida, onde foi despejada a solução com o grafeno com uma pipeta graduada e pipetador.

As amostras foram então pesadas e dobradas. O agente de reforço foi introduzido apenas entre as primeiras sete etapas de dobramento. Os mesmos passos feitos nas amostras sem a adição de grafeno foram seguidos, aplicando-se até 20 ciclos de deformação.

A avaliação do processo de dobra e do caldeamento entre as camadas, e da dispersão do grafeno foi realizada, as amostras foram preparadas para avaliação metalográfica. Para tanto, as amostras foram seccionadas perpendicularmente na direção da espessura e embutidas. Foram lixadas com lixas de carbetto de silício de #80, #120, #220, #320, #600 e, #1200 mesh. O polimento foi realizado com pasta de diamante de granulometria 1 μ m. O ataque químico foi feito com 1% de HF nas amostras monolíticas e com 1% de NaOH nas amostras com reforço.

As análises microestruturais foram feitas no microscópio óptico (Leica/Axiovert A1) com câmera digital acoplada. Para a avaliação das propriedades mecânicas, foram realizadas medidas de dureza com micro-indentação Vickers (Shimadzu), com carga de 100 gf por 15 segundos.

Resultados e discussão

As amostras produzidas, após cada etapa de deformação aplicada, apresentaram em cada camada deformações equivalentes à 50% da sua espessura inicial, sendo este incremento mantido constante a cada nova dobra introduzida. Com o aumento do número de dobras, há um aumento exponencial do número de camadas produzidas no compósito, o que promove uma grande redução de sua espessura, como também um significativo aumento de defeitos cristalinos.

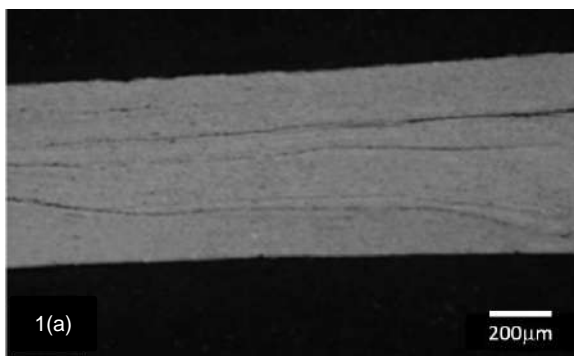
Destaca-se aqui que também com este aumento, houve uma gradativa melhoria do efeito do caldeamento, ou seja, da união entre camadas dobradas. As amostras nos estágios iniciais de dobra apresentaram significativa redução de espessura e logo no primeiro ciclo de forjamento foi possível obter uma boa adesão entre as camadas, sem o aparecimento de trincas.

Na Figura 1 (a) é apresentada a microestrutura da amostra após 30 ciclos de conformação sem reforço, e a indicação das várias camadas deformadas podem ser analisadas.

Na figura 1 (b) da amostra após a aplicação de 16 ciclos, pode-se observar a presença do grafeno, o qual ainda se apresenta

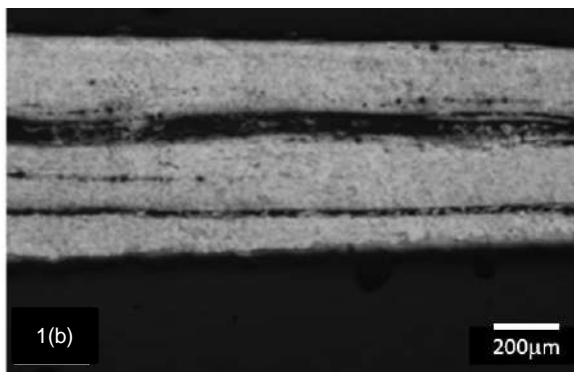
concentrado entre as camadas, com distribuição heterogênea.

Figura 1(a)-Microestrutura da amostra de alumínio após a aplicação de 30 ciclos de dobramento sem a adição de grafeno. Sem ataque.



Fonte: (Autor, 2021)

Figura 1(b) – Microestrutura da amostra de alumínio após a aplicação de. Sem ataque.



Fonte: (Autor, 2021)

Foi observado que com o aumento do número de ciclos de deformação, por exemplo de 10 para 30 dobras aplicadas, houve redução do número de defeitos como porosidades e

trincas, principalmente para as amostras sem alumínio.

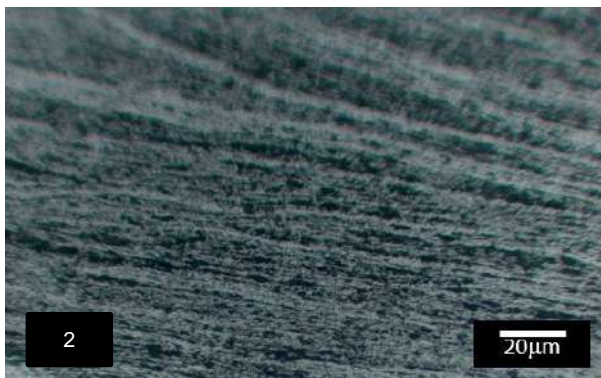
Já com a inserção de grafeno, houve uma maior dificuldade para a coesão entre as camadas, sendo estas obtidas somente a partir de uma maior intensidade de deformação. Isto deve-se possivelmente à melhor distribuição do grafeno entre as camadas e, a possibilidade assim de um maior contato da matriz de alumínio entre as camadas.

Também, deve-se apontar que o aumento da quantidade de deformação leva também a um gradativo rompimento das camadas de óxidos superficiais (Al_2O_3) presentes nas folhas iniciais de alumínio e, que agora encontram-se internamente ao material. Isto também contribuiu para a maior coesão das camadas (caldeamento).

Na Figura 2 pode ser observada a micrografia da amostra com grafeno após 20 ciclos de dobramento, onde nota-se o apontado acima, indicando a distribuição do grafeno ao longo das camadas deformadas. Pode ainda ser observado um aumento na dispersão do grafeno pela matriz, o que constitui ponto desejado já que uma maior distribuição do grafeno tende a contribuir de forma mais intensa com o aumento de resistência do compósito.

Na Figura 3 são indicadas em maior ampliação a distribuição do grafeno na matriz após 16 ciclos de dobragem.

Figura 2 – Microestrutura da amostra de alumínio com grafeno após a aplicação de 20 ciclos de dobramento. Ataque com solução de NaOH.



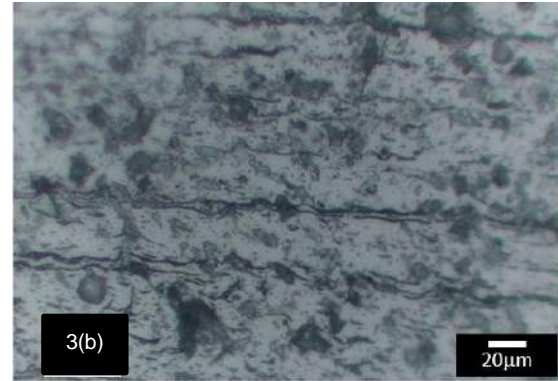
Fonte: (Autor, 2022)

Figura 3 (a) – Microestrutura da amostra de alumínio com grafeno após a aplicação de 16 ciclos de dobramento-500x. Ataque com solução de NaOH.



Fonte: (Autor, 2022)

Figura 3 (b) – Microestrutura da amostra de alumínio com grafeno após a aplicação de 16 ciclos de dobramento-1000x. Ataque com solução de NaOH.



Fonte: (Autor, 2022)

Com o aumento do número de dobras há um gradativo aumento da intensidade da deformação, implicando em camadas severamente deformadas e com alta intensidade de defeitos cristalinos, o que pode ser aumentado pela presença do grafeno. O refinamento de grão no processo de forjamento por dobras acumulativas, onde com a deformação plástica severa, tem-se um significativo aumento da densidade de discordâncias e para haver uma redução da magnitude do defeito da energia superficial, as discordâncias tendem a mudar a sua configuração por deslizamentos.

Uma redução da energia de deformação total do sistema ocorre pela formação de uma estrutura celular com células quase livres de deslocamentos, sendo delimitadas por paredes ricas em deslocamentos. Seguindo com o processo, o



ângulo de desorientação das paredes das células de deslocamento irá aumentar e as células se desenvolverão em subgrãos.

Em seguimento, tem-se uma fragmentação sob intensa deformação plástica severa, resultando assim em grãos mais refinados/nanogrãos equiaxiais de alto ângulo (Khodabakhshi, 2018). Isto, com a intercalação do recozimento contribui para ativar o processo de recristalização da microestrutura do alumínio e, como consequência, produz um intenso refino dos grãos (Padilha, 2000), inclusive com o desenvolvimento de nanogrãos. O aumento do nível de deformação irá reduzir a energia de ativação necessária para o início do processo e, portanto, menores temperaturas aplicadas já contribuiriam para a recristalização dos grãos.

A contribuição deste efeito foi observada na preparação das amostras, onde àquelas que não passaram pelo ciclo intercalado de recozimento de baixa temperatura (200°C) apresentaram grande dificuldades de coesão entre camadas, mesmo para àquelas com maior número de deformações aplicadas. Aponta-se aqui que as amostras com recozimento a partir de 10 ciclos de dobramento já apresentavam grande coesão entre suas camadas. Deve-se ser apontado que a aplicação do recozimento contribui também para a redução das tensões

geradas pelas deformações impostas, como também um restauro da própria capacidade de deformação das camadas.

A dispersão de nanoplacas sobre os micro-mecanismos de formação de nanogrãos pelo forjamento de dobras acumulativas pode ainda ser explicada ao se considerar a alta relação específica existente entre a superfície e o volume de nanoplacas de reforço. Estas estão agrupadas no início do processo pelas interações de Van der Waals que podem deteriorar a ligação entre as nanoplacas de grafeno e a matriz metálica. Todavia, ao realizar o processo de forjamento por dobras acumulativas por um elevado número de ciclos, os aglomerados de nanoplacas podem ser quebrados pela deformação plástica severa, obtendo-se uma distribuição mais homogênea na matriz de alumínio (Amirkhanlou, 2013).

Quanto à variação de dureza, as amostras sem deformação e sem grafeno apresentaram dureza em torno de 17HV, enquanto que as deformadas com até 30 ciclos foram obtidas durezas de até 100HV. Esse significativo aumento é decorrente dos efeitos já comentados acima e indica de forma clara a contribuição do processo de dobras acumulativas no aumento de resistência do material próximo a 6 vezes o seu valor inicial.

A amostra de alumínio com a inserção de 2 vol% de grafeno e 17 ciclos de deformação apresentou dureza em torno de 53HV. A observação de uma menor dureza em relação as amostras sem a adição do grafeno deve-se possivelmente a não completa distribuição das partículas do reforço pela matriz, cabendo ainda a continuidade dos trabalhos no sentido de otimizar o processo, principalmente no incremento do número de deformações impostas no compósito produzido.

Com os resultados verificou-se que os valores de dureza apresentaram certa proximidade, e o aumento de dureza relaciona-se não somente com a quantidade de ciclos realizado, mas também pelo efeito do alto teor de reforço adicionado.

O maior valor médio de dureza dos nanocompósitos foi encontrado na amostra com o maior número de deformações impostas, ou seja, essa amostra foi submetida a um maior número de ciclos, o que reforça a interferência e o efeito do maior número de camadas formado. Nesse ínterim, a partir dos resultados, é possível perceber que a dureza das amostras processadas aumentou com o aumento do número de dobras e aumentou ligeiramente nos nanocompósitos.

Conclusões

Nesse trabalho o estudo do forjamento por dobras acumulativas foi analisado como um viável para a fabricação de nanocompósitos de alumínio e grafeno em camadas com um alto teor de agente de reforço. Esse processo permite a formação de um material com múltiplas camadas de material metálico e com a fase nanométrica de reforço, além disso, gerando amostras monolíticas com melhores propriedades mecânicas.

As amostras foram produzidas sem a adição de grafeno foram conformadas com até 30 ciclos de dobramento, enquanto que já com a adição de grafeno, houve dificuldades na coesão entre as camadas, tendo sido aplicados até 20 ciclos de conformação. Todavia, todas amostras resultaram em elevado número de camadas e severa deformação, isso contribuiu para o endurecimento e dispersão do grafeno na matriz de alumínio.

A dureza das amostras aumentou devido ao aumento do número de dobras. Por fim, embora a adição de grafeno pelo forjamento por dobras acumulativas tenha resultado em um aumento na sua resistência mecânica, ainda há a necessidade de um maior estudo do mecanismo de dispersão na matriz metálica, de modo a aumentar a contribuição do reforço ao compósito.



Referências bibliográficas

Amirkhanlou, S. (n.d.). [Review of Homogeneous and ultrafine-grained metal matrix nanocomposite achieved by accumulative press bonding as a novel severe plastic deformation process]. Scripta Materialia, 40–43. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2014.12.007>

Bartolucci, S. F. (2011, October 15). [Review of Graphene–aluminum nanocomposites]. Materials Science and Engineering A, 7933–7937. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.msea.2011.07.043>

Callister Jr, W. D. (2000). Materials Science and Engineering - An Introduction (5th ed.). Anti-Corrosion Methods and Materials, 47(1). <https://doi.org/10.1108/acmm.2000.12847aae.001>

Khodabakhshi, F. (2018, January 4). [Review of Accumulative fold-forging (AFF) as a novel severe plastic deformation process to fabricate a high strength ultra-fine grained layered aluminum alloy structure]. Materials Characterization, 229–239. Retrieved from

<https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.12.023>

Materials de engenharia: Microestrutura e propriedades - 2aED.(2007) - Angelo Fernando Padilha - Livro. (n.d.). In www.travessa.com.br. Retrieved August 1, 2022, from <https://www.travessa.com.br/materiais-de-engenharia-microestrutura-e-propriedades-2-ed-2007/artigo/2aaa4be8-e6f3-496b-8c69-7f74ec5fe466>

Sabirov, I. (2013, January 10). [Review of Nanostructured aluminium alloys produced by severe plastic deformation: New horizons in development]. Materials Science and Engineering: A, 1–24. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.msea.2012.09.020>

Tjong, C. S. (2013, July 25). [Review of Recent progress in the development and properties of novel metal matrix nanocomposites reinforced with carbon nanotubes and graphene nanosheets]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 281–350. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.08.001>

Estudio de la nucleación y post nucleación de la heteroestructura 2d bi3-grafeno.



C.24. Ciencias e ingeniería de materiales.

ESTUDIO DE LA NUCLEACIÓN Y POST-NUCLEACIÓN DE LA HETEROESTRUCTURA 2D Bil₃-GRAFENO.

Autor: *Maidana, Camila;*
cami.mdls@gmail.com

Co-autor(es): *Bentos Pereira, Heinkel;*
yandinoca@gmail.com; *Fornaro, Laura;*
lfornaro@gmail.com; *Noguera, Ana Lia;*
analianoquera@gmail.com; *Olivera,*
Alvaro; alvarobq@gmail.com

Profesor/a guía: *Fornaro, Laura;*
lfornaro@gmail.com

Centro Universitario Regional Este,
Universidad de la República, Uruguay.

Resumen

El presente trabajo busca estudiar la nucleación, post-nucleación y crecimiento cristalino de yoduro de bismuto (BiI₃) de la heteroestructura 2D BiI₃-grafeno, por el método Deposición Física de Vapor (PVD). Las deposiciones por PVD de BiI₃ se realizaron sobre sustratos de grafeno y sobre grillas de TEM con recubrimiento de grafeno para su posterior caracterización por Difracción de Rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM)

respectivamente. Se evaluaron la influencia de diferentes parámetros experimentales, tales como: tiempo de deposición, temperaturas de fuente y sustrato, presión inicial, entre otros. Como resultados de este trabajo, se obtuvieron depósitos de entidades pre-núcleos, algunas amorfas, otras cristalinas, estables aún bajo el haz de TEM, que permitieron observar a través de estos y otros núcleos obtenidos, que la nucleación del BiI₃ sobre grafeno no sigue la teoría clásica de nucleación ni la teoría de crecimiento posterior de los núcleos. En este sentido, se logró observar un mecanismo de crecimiento post-nucleación de BiI₃ sobre el grafeno, donde dos entidades se orientan y luego se unen por “oriented attachment”, indicando un mecanismo que no cumple con la teoría clásica de crecimiento posterior de los núcleos.

Los resultados de este trabajo pueden ser una valiosa contribución al desarrollo de una teoría general para la nucleación no clásica en varios sistemas, así como también en materiales 2D y heteroestructuras de Van der Waals y sus aplicaciones.

Palabras clave: Nucleación, Heteroestructura BiI₃-Grafeno, Deposición Física de Vapor.



1. Introducción.

El comienzo del estudio de la nucleación data desde comienzos del siglo XX (Gibbs, J. W., 1874); siendo la nucleación, la coalescencia y el crecimiento posterior de capas cristalinas de los temas más estudiados en Ciencia y Tecnología de Materiales en las últimas décadas (Ibach, H., 2006), tanto en sus aspectos termodinámicos (Sato, K.; Furukawa, Y.; and Nakajima, K.; 2001) como cinéticos (Alvrami, M., 1939), debido a que se han observado en estas estructuras, interesantes propiedades eléctricas, ópticas, mecánicas, entre otras (Rogers, J. A., Lagally, M. G. and Nuzzo, R. G., 2011).

Debido a que los primeros núcleos que se obtienen son de tamaño nanométrico, no fue hasta el desarrollo de equipos de suficiente resolución espacial que se los pudo observar y estudiar. Como consecuencia de ello, por mucho tiempo el estudio de estos temas fue sólo teórico o teórico y correlacionado con experimentos de etapas posteriores a la nucleación, como es el caso de la observación de clusters, producto de los núcleos con crecimiento posterior, donde se dedujeron mecanismos de nucleación por extrapolación de estos resultados. Por lo que, en ese entonces mediante el estudio

teórico del crecimiento de cristales y películas cristalinas, surge la denominada “Teoría Clásica de Nucleación”, CNT (Dimo, K., Butterworth-Heinemann, 2000) (Kashchiev, C., 2000).

A medida que fueron surgiendo equipos de observación a escala nanométrica, como microscopio electrónico de barrido (SEM), microscopio electrónico de transmisión (TEM), microscopio de fuerzas atómicas (AFM), microscopio electrónico de efecto túnel (STM), se logró dar paso al estudio de los núcleos en sus primeras etapas y su evolución con el tiempo. A partir de esto, surgieron una gran cantidad de estudios que relacionaron teorías termodinámicas y cinéticas con las correspondientes observaciones (Michely, T. y Krug, J., 2004). En lo que a esto respecta, se han reportado evidencias experimentales, que comprueban la existencia de otras entidades “pre-núcleos” que dan lugar posteriormente a la formación de los núcleos cristalinos propiamente dichos, lo cual dio origen a las llamadas “Teorías No-Clásicas de Nucleación” (Gebauer, D. and Cölfen, H., 2011) (De Yoreo, J. J. and Sommerdijk, N.A.J.M., 2016). De esta manera, se desprende de esta teoría, que la nucleación puede darse a partir del agregado de “clusters pre-núcleos” que da paso en primer lugar a la formación de nanopartículas, y que en etapas



posteriores, mediante procesos como coalescencia o acoplamiento orientado, dan lugar al crecimiento (De Yoreo, J.J., 2013) (Fornaro, L., 2019).

Con respecto a los métodos de crecimiento, existen muchos métodos que permiten el crecimiento de cristales con diversas características, dependiendo del uso posterior al que se quiera llegar. En el caso de este trabajo en particular, la selección del método de crecimiento por deposición física de vapor (PVD) se dio debido a que este ofrece más control sobre las propiedades físicas en comparación con otros métodos, permite crecer cristales en bulk, films de diversos espesores y a su vez cristales con diferentes hábitos (Chernov, A. A., 1984), lo cual favorece las condiciones experimentales que se buscan en este trabajo.

El yoduro de bismuto presenta valores adecuados de las propiedades necesarias para el crecimiento de films por deposición física de vapor, no presenta cambios polimórficos entre su punto de fusión y a temperatura ambiente, lo que simplifica el proceso de sublimación (Kim, J. H. and Blairs, J., 1990). Dos estructuras han sido determinadas experimentalmente para este compuesto: hexagonal y romboédrica. Cada átomo de bismuto está octaédricamente coordinado con seis

átomos de yodo, y cada capa estructural consiste de capas de I-Bi-I, las capas están unidas entre sí por enlaces de van der Waals (Dmitriev, Y., Bennett, P., Cirignano, L., Klugerman, M. and K. Shah, 1999). Es un semiconductor compuesto, perteneciente al grupo de los llamados “haluros de metales pesados”, que son conocidos por sus interesantes propiedades y aplicaciones, principalmente en el campo de la imagenología de radiaciones (Fornaro, L., 2013).

Además, avances del “Grupo de Desarrollo de Materiales y Estudios Ambientales” (GDMEA) perteneciente al Departamento de Desarrollo Tecnológico de la Universidad de la República, permitieron llegar a que la orientación de las láminas depende de las condiciones de crecimiento; para BiI_3 la anisotropía determina láminas con su eje c cristalográfico paralelo o perpendicular al sustrato (Cuña, A., 2004). Como la orientación dio las mejores propiedades en imagenología (Fornaro, L., 2004), se buscó la mayor posible y luego, capas monocristalinas del orden de 50-100 μm sobre sustratos amorfos (Fornaro, L., 2004). Luego se estudió la nucleación de HgI_2 y BiI_3 por PVD sobre sustratos amorfos, obteniendo “clusters” de núcleos de etapas posteriores de crecimiento (Noguera, A., 2008). Se avanzó en síntesis



y caracterización de nanopartículas cristalinas de esos compuestos (Fornaro, L., 2005). Se buscaron núcleos nanométricos, construyendo un sistema para estudiar fenómenos por Deposición Física de Vapor, que fue el usado para la realización de este trabajo.

En los últimos años, el GDMEA obtuvo interesantes resultados primarios sobre nucleación no-clásica, la existencia de precursores amorfos a la nucleación, y el “attachment” de nanopartículas en el crecimiento de capas por PVD de BiI_3 sobre sustratos amorfos y cristalinos. Sobre los sustratos amorfos, los resultados primarios mostraron que, en las condiciones adecuadas, la nucleación por PVD sigue un camino no-clásico, dando una fase amorfa metaestable con entidades de 2-3nm, resistentes al haz de TEM sufriendo rápidas transformaciones entre estructuras ordenadas/desordenadas. Estas entidades son una fase metaestable intermedia, no son cristalinas y su fase no es la de un cristal “bulk”, como predice la Teoría Clásica de Nucleación, concluyendo que son entidades pre-nucleación no-clásicas (Ferreira, D., 2019).

Los resultados obtenidos por el grupo concuerdan con los de otros autores sobre nucleación no-clásica, contribuyen al desarrollo de una teoría general de los

mecanismos de la nucleación de todo tipo de sistemas y son valiosas para obtener láminas epitaxiales de BiI_3 y compuestos similares, con beneficios para varias aplicaciones tecnológicas. Por lo mencionado anteriormente, estos antecedentes son el punto de partida para este trabajo, donde se pretende continuar, extender y profundizar en la temática de Ciencia y Desarrollo de Materiales, en este caso en la heteroestructura 2D BiI_3 sobre grafeno – grafeno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Contribuir a la búsqueda de una teoría general de nucleación no clásica de cristales y de las primeras etapas del crecimiento cristalino post-nucleación, aplicada al desarrollo de materiales 2D.

2.2. Objetivos específicos:

- Obtención de pre-núcleos y núcleos de BiI_3 sobre sustratos de grafeno por PVD, variando las condiciones experimentales, para obtener nucleaciones adecuadas que permitan continuar en etapas posteriores.
- Estudiar el crecimiento post-nucleación de BiI_3 sobre grafeno por PVD.

- Estudiar la incidencia y el control de la orientación cristalina de BiI_3 en la pre y post-nucleación sobre grafeno.

3. Materiales y métodos

Para poder cumplir con el objetivo de este trabajo, se escogió como método de crecimiento, la deposición física de vapor (PVD); para ello se utilizó un sistema diseñado especialmente para alcanzar condiciones experimentales que mejoren el desarrollo de este trabajo (*Figura 1*), como un vacío que permita trabajar en condiciones de presión del orden de $1\text{E}-08$ mBar, así como el control de temperatura de fuente y de sustrato, y tiempo.



Figura 1: Sistema de crecimiento por PVD.

El BiI_3 (Aldrich, 99,9% de pureza) utilizado fue depositado sobre sustratos de grafeno de $5\times 5\text{mm}$ para poder realizar caracterizaciones posteriores con Difracción de Rayos X (XRD), también se utilizaron sustratos grillas de TEM (Ted Pella Inc.) con una monocapa de grafeno y grillas con 3-5 capas de grafeno, para caracterizaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM), Fast Fourier Transform (FFT), difracción de electrones de área selecta (SAED), espectroscopía de dispersión de energía (EDS).

En el transcurso de este trabajo, fueron evaluadas la influencia de diferentes parámetros experimentales, con el fin de optimizar las condiciones de trabajo para la obtención de primeros núcleos a escala

nanométrica, estos fueron: tiempo de deposición, la temperatura de fuente y sustrato, presión inicial de trabajo, atmósfera inerte con Argón de alta pureza 99,999%, realizando o no purga con dicho gas al finalizar la deposición, tipo de grillas de TEM utilizadas.

En la Tabla 1 se muestran las condiciones de cada experimento realizado.

E	Bil ₃ (mg)	D (mm)	T _s (°C)	T _f (°C)	P _i (mBar)	t (s)	S	P. Ar
1	420	15	39,9	268	4E-6	120	S	Si
2	320	15	40	263	5E-6	120	G	Si M
3	431	15	40	260	4E-6	10	G	Si M
4	390	15	40	255	6E-6	10	G	No M
5	331	15	40	254	3E-6	20	G	No M
6	458	15	40	265	9E-7	10	G	No M
7	421	15	35	262	9E-7	10	G	No M
8	452	15	30	266	1E-6	10	G	No M
9	452	15	30	266	1E-6	10	G	No
10	332	15	30	265	1E-6	10	G	Si

Tabla 1: Condiciones experimentales correspondientes a cada deposición realizada. E: experimento. D: distancia fuente sustrato; T_s: Temperatura de sustrato; T_f: Temperatura de fuente; P_i:

Presión inicial; t: tiempo de sublimación; S: sustrato utilizado; GM: grilla TEM monocapa de grafeno; G: Grilla 3-5 capas de Grafeno; P. Ar: Purga con Argón al final de la sublimación.

4. Resultados y discusión

Mediante imágenes de HR-TEM, diagramas FFT, SAED y composición de las muestras por EDS, de los diferentes experimentos realizados sobre grillas de TEM, se obtuvieron los resultados que se mencionan a continuación.

Se lograron observar entidades pre-núcleos, algunas amorfas y otras cristalinas las cuales permanecían aún bajo el haz de TEM, la Figura 2 muestra estos pre-núcleos así como sus transformadas de Fourier (FFT).

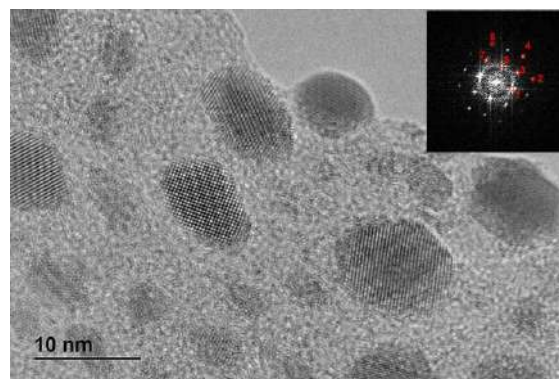


Figura 2: Imágenes de HR-TEM de los pre-núcleos de una muestra representativa, con sus FFTs.

Además, se logró visualizar la transformación de un pre-núcleo amorfo en cristalino y luego nuevamente en amorfo (Figura 3).

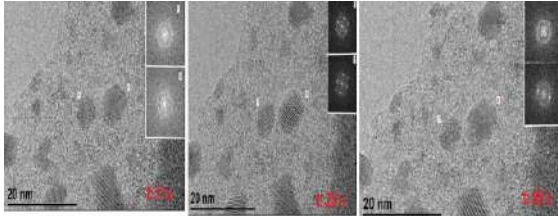


Figura 3: Snapshot 4de un video mostrando la transformación amorfa-cristalina-amorfa de los pre-núcleos. t: tiempo.

En la Figura 4 se muestran núcleos de mayor tamaño que los pre-núcleos, y sus FFT, que indican la fase romboédrica del BiI_3 , con los planos $(0\ 0\ 1)$ paralelos al sustrato, siendo esa la orientación preponderante.

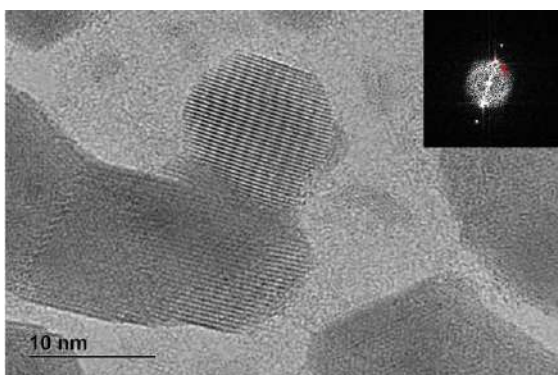


Figura 4. Imágenes de HR-TEM de los

núcleos de una muestra representativa con sus FFTs.

Del estudio de las imágenes y de los FFT de las Figuras 2, 3 y 4, de esos y muchos otros pre-núcleos y núcleos obtenidos, surge que, la nucleación de BiI_3 sobre grafeno no sigue la teoría clásica de nucleación, ni la teoría clásica del crecimiento posterior de los núcleos críticos. Se han reportado resultados de este tipo para otros sistemas (De Yoreo, J.J., 2013). También surge que la nucleación se da en la fase romboédrica del BiI_3 , y mayoritariamente con la orientación $(0\ 0\ 1)$. Estas últimas características coinciden con lo concluido a partir del estudio de Grazing Incidence X-Ray Diffraction (GIXRD) que se detalla más adelante.

En la Figura 5 se muestra un espectro de dispersión de energía (EDS), representativo de los varios obtenidos, que comprueba que las partículas estudiadas son de BiI_3 , verificando la ausencia de otros compuestos.

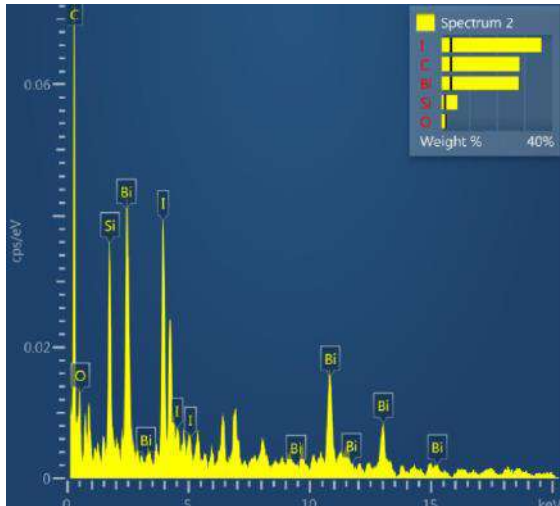


Figura 5: EDS de una nanopartícula representativa.

En la Figura 6 se muestran capturas de video donde se logró observar un mecanismo de crecimiento post-nucleación de BiI_3 sobre grafeno. Allí se muestra cómo dos entidades se orientan y luego se unen por “oriented attachment”, lo que indica que se da un mecanismo de crecimiento que no cumple con la teoría clásica del crecimiento posterior de los núcleos. Este mecanismo también ha sido reportado como nucleación no-clásica post nucleación (De Yoreo, J.J., 2013).

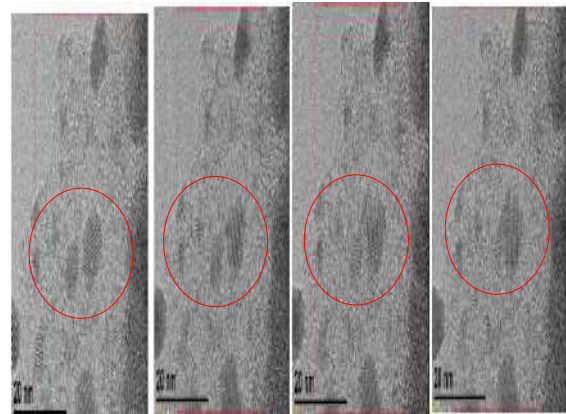


Figura 6: Capturas de video mostrando la unión de dos nanocrisales por “oriented attachment”.

Por otro lado, en lo que respecta al depósito de pre-núcleos y núcleos de BiI_3 sobre sustratos de grafeno por PVD y el crecimiento inmediato posterior de los pre-núcleos y núcleos, mediante la caracterización por Grazing Incidence X-Ray Diffraction (GIXRD) para ver la orientación y fase de las entidades, y por X-Ray Reflectometry (XRR) para estudiar espesor, densidad y rugosidad de las láminas, se obtuvieron los siguientes resultados mencionados a continuación y expresado en las Figuras 7 y 8 respectivamente.

De la Figura 7 se puede concluir que la lámina obtenida corresponde a la fase romboédrica del yoduro de bismuto, por la coincidencia de la posición y la intensidad de los picos de difracción con la ficha Código de referencia 00-048-1795 de la

base de datos PDF4+ 2021. También se puede concluir, por la muy alta intensidad del pico en 12.8° (003), en especial para ángulos de incidencia mayores (5°), que la lámina está orientada con su eje c perpendicular al sustrato, con muy alto coeficiente de textura correspondiente a los planos ($00l$).

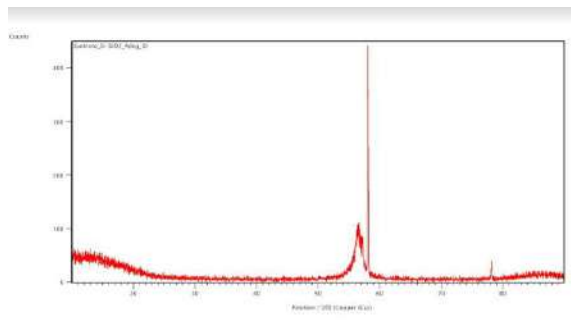
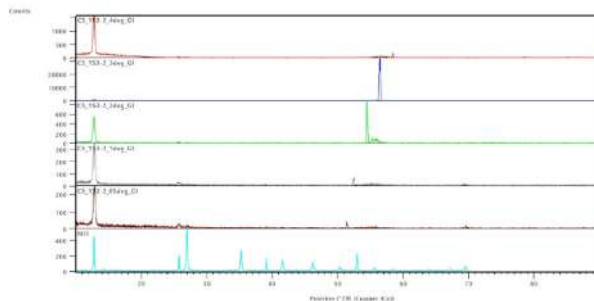
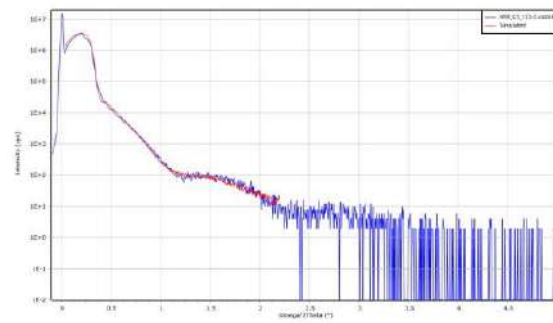


Figura 7: Diagramas de GIXRD de 1 a 5° obtenidos para una muestra representativa, comparados con el diagrama de BiI_3 en polvo y con el del sustrato, utilizando radiación $CuK\alpha$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$).

En la Figura 8 se muestran los resultados de la determinación de los parámetros de la lámina de la Figura 7, que resulta tener una densidad de 6.0 g/cm^3 , un espesor de 34.6 nm y una rugosidad de 6.0 nm . La densidad obtenida es la del BiI_3 en “bulk” (5.8 g/cm^3). Dado su espesor, y que las celdas cristalinas tienen su eje c perpendicular al sustrato ($c=20.72 \text{ \AA}$), se puede estimar que la lámina tiene aproximadamente 16 capas de BiI_3 . La rugosidad de 6.0 nm de la lámina su implica discontinuidades del orden de 3-4 capas de BiI_3 .



C:\XRD Data\Camila\Marzo2022\C5_153-2.aprjxl

Layer Descr.	Density (g/cm ³)	Thick. (nm)	Rough. (nm)
3, -, BiI3 [DensityOnly]	6.034	34.6184	5.9981
2, -, Graphene [DensityOnly]	2.458	1.812	0.9587
1, -, SiO2 [DensityOnly]	1.477	210.5029	0.3492

Figura 8: Reflectometría de la lámina de la Figura 7.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que este trabajo aporta algunas contribuciones en lo que refiere a la búsqueda de una teoría general de



nucleación no clásica. Esto se debe a que se lograron obtener pre-núcleos de BiI_3 sobre grafeno por PVD, del orden de los nanómetros y donde las nanopartículas cristalinas mostraron seguir una vía no-clásica para formar estructuras más grandes: “oriented attachment”.

Además, se logró avanzar en el estudio de la influencia de diferentes condiciones experimentales referidas a morfología y tamaño de los núcleos obtenidos, en busca de obtener nucleaciones más adecuadas para el crecimiento posterior de BiI_3 , estudiando su coalescencia, buscando llegar a una lámina monocristalina.

6. Referencias Bibliográficas

- Aguiar, I., Kropger, S. and Fornaro, L. (2009). Bismuth tri-iodide polycrystalline films for X-ray direct and digital imagers Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A vol. 610, 332-334.
- Aguiar, I. (2008). “Desarrollo de sensores de BiI_3 para imagenología de radiaciones a temperatura ambiente”, Tesis de Maestría, Facultad de Química, Montevideo.
- Aguiar, I., Fornaro, L. (2012). “Bismuth tri-iodide nanoparticles

synthesized from octadecene suspension”. Materials Research Society Symposia Proceedings, v.: 1409.

- Alvrani, M. (1939), *Kinetics of Phase Change. I General Theory*.
- Chernov, A. A. (1984). “Modern Crystallography III” *Crystal Growth*. Springer Series on Solid State Science, vol. 36, publicado por Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Cuña, A., Aguiar, I., Gancharov, A., Pérez, M., Fornaro, L., (2004). Correlation between growth orientation and growth temperature for bismuth tri-iodide films, *Crystal Research and Technology*, 39, 10, 899-905.
- Cuña, A., et al., (2004). *Crystal Research and Technology*, 39, 10, 899-905.
- Cuña, A., Saucedo, E., Noguera, A., Aguiar, I., Rodríguez, M., Fornaro, L., (2003). “Purification Of Bismuth Tri-iodide As Material For Radiation Detector Purposes”,



*IEEE Nuclear Science Symposium
Conference Record, R8-25.*

- Cuña, A., Noguera, A., Saucedo, E., Fornaro, L., (2004). “Growth of Bismuth tri-iodide platelets by physical vapor deposition method”, *Crystal Research and Technology*, 39, 10, 912-919.
- De Yoreo, J. J. and Sommerdijk, N.A.J.M. (2016). Investigating Materials formation with liquid-phase and cryogenic TEM. *Nature Reviews Materials*, Article number 16035.
- De Yoreo, J. J. (2013). More than one pathway. *Nature Materials*, Vol 12, 284-285.
- Dimo, K., Butterworth-Heinemann (2000). “*Nucleation Basic Theories with applications*”. Oxford.
- Dmitriev, Y., Bennett, P., Cirignano, L., Klugerman, M. and K. Shah, (1999). “*Bismuth Iodide Crystals as a Detector Material: Some Optical and Electrical Properties*”. SPIE, vol. 3766, pp.521-529.
- Ferreira, D. (2019). Tesis de Maestría : “Preparación y caracterización de monocapas bidimensionales de BiI_3 ”.
- Fornaro, L. (Julio-Agosto, 2019). *Pre-nucleation and particle attachment of bismuth tri-iodide onto graphene substrates*. 9th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-19) Keystone, Colorado, USA.
- Fornaro, L. (2013). “*State of the art of the heavy metal iodides as photoconductors for digital imaging*”, *Journal of Crystal Growth*, v.: 371, p.: 155 – 162.
- Fornaro, L., Cuña, A., Noguera, A., Pérez, M., Mussio, L., (2004). “Growth of Bismuth Tri-iodide Platelets for Room Temperature X-ray Detection by the Vapor Transport Method”, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, v.: 51 5, p.: 2461 – 2465.
- Fornaro, L., Aguiar, I., Pérez Barthaburu, M. and Bentos Pereira, H. (2011). “Nanoparticles for heavy metal iodide films nucleation: mercuric iodide and bismuth tri-



- iodide cases”, *Crystal Research and Technology*, 46(12): p. 1317.
- Gibbs, J. W., Smith, A. W. (1874). On the equilibrium of heterogeneous substances: *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, vol. 3, Chapter V and Chapter IX, Tuttle, Morehouse and Taylor, New Haven, CT, pp. 108-48,343-524.
 - Ibach, H. (2006), *Physics of Surfaces and Interfaces*, Springer, p. 555-611.
 - Kashchiev, D. (2000). *Nucleation: Basic Theory with Applications*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
 - Kim. J. K. and Blairs, J (1990). *Sublimation Study of BiI3*. *Thermodynamics*, 22, pp 803-814
 - Longmans; Green and Co (1928), *The Collected Works of J. Willard Gibbs*, Vol I, New York.
 - Michely, T. y Krug, J. (2004), *Islands, Mounds and Atoms. Patterns and Processes in Crystal Growth Far from Equilibrium*. Springer; Softcover reprint of the original 1st ed.
 - Noguera, A., Pérez, M., Quagliata, E. and Fornaro, L. (2008). Phase, nucleation and coalescence of HgI₂ onto amorphous substrates, *Journal of Crystal Growth*, vol. 310, Issues 7-9, 1691-1696.
 - Noguera, A., et al. (2008). *Journal of Crystal Growth*, vol. 310, Issues 7-9, 1691-1696.
 - Rogers, J. A., Lagally, M. G. and Nuzzo, R. G. (2011), *Synthesis, assembly and applications of semiconductor nanomembranes*. *Nature*, 477(7362):45-53. Doi: 10.1038/nature10381.
 - Sato, K.; Furukawa, Y.; and Nakajima, K. (2001), *Advances in crystal growth research*.

Explorando disolventes verdes en síntesis orgánica y biocatálisis



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



30
AÑOS

C.25. Ciencia, tecnología e innovación

Explorando disolventes verdes en síntesis orgánica y biocatálisis

Autor: García, Mateo; mateogarciagarrone@gmail.com

Profesor/a guía: Aldabalde, Virginia; valdabal@fq.edu.uy

González, David; davidg65@gmail.com

Universidad de la República

Palabras clave: química verde, disolventes verdes, biomasa.

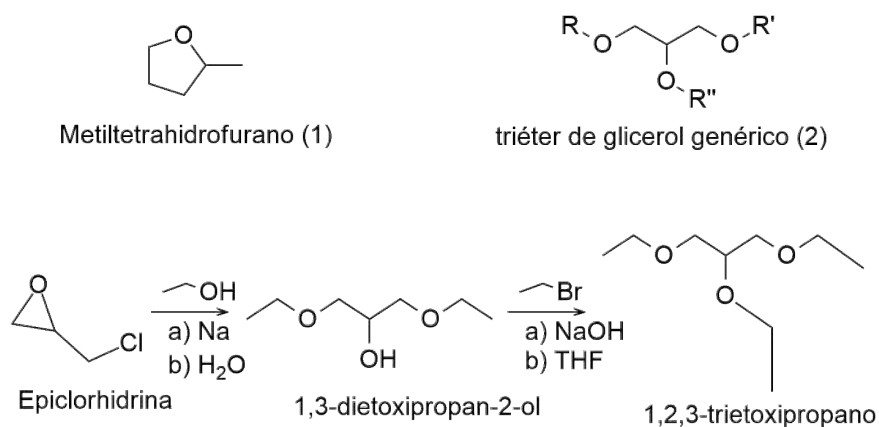
Resumen

La consolidación de los principios de química verde requiere la eliminación o sustitución de disolventes de alto impacto ambiental, tanto en las etapas de reacción como de purificación de compuestos químicos.

Entre los disolventes considerados verdes se encuentra agua, líquidos iónicos, mezclas de eutéctico profundo, y compuestos derivados de biomasa. Entre estos últimos nos interesan el metiltetrahidrofurano (1) derivado de azúcares y los éteres de glicerol (2). Estos últimos se destacan por ser derivados de la industria del biodiesel, por la posibilidad de modular las propiedades físicas variando el largo de la cadena carbonada, y porque además algunos de sus éteres han sido considerados para la captura de CO₂.

En la primera parte de este trabajo se busca sintetizar un triéter de glicerol, 1,2,3-trietoxipropano (1,2,3-TEP), mediante una estrategia de dos pasos utilizando epiclohidrina como material de partida con etanol y bromoetano como reactivos de eterificación.

Se comenzó realizando la síntesis de 1,2,3-TEP mediante dos pasos de reacción en one pot y en distintas cantidades, con el fin de obtener los mejores rendimientos de reacción. Hasta el momento, hemos obtenido el 1,2,3-TEP con un rendimiento global del 40%.



En segunda instancia se inició el estudio de distintas reacciones de Knoevenagel-Doebner de modelos aromáticos que forman parte de la lignina, utilizando como disolventes el 1,2,3-TEP y MeTHF. Este último es adquirido comercialmente, buscando en un futuro obtenerlo a partir de biomasa lignocelulósica. El fin de este estudio es reemplazar el THF que, de acuerdo con estudios previos de nuestro grupo, es un disolvente adecuado para la condensación de Knoevenagel-Doebner en la preparación de derivados de ácido cinámico.

Introducción

La consolidación de los principios de química verde en los procesos de fabricación requiere la eliminación o sustitución de disolventes de alto impacto ambiental tanto en las etapas de reacción como de purificación de compuestos químicos.¹

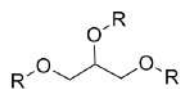
No es suficiente con lograr reacciones de alta eficiencia atómica en condiciones de reacción suaves, utilizando reactivos de bajo impacto ambiental, si el disolvente

que a menudo es el principal componente de la mezcla de reacción no se ajusta a los principios de la química verde.² Entre los disolventes considerados amigables o más aceptables desde este punto de vista se encuentran: agua, líquidos iónicos, mezclas de eutéctico profundo y compuestos derivados de biomasa. Entre estos últimos nos interesan el metiltetrahidrofurano (1) derivado de azúcares³ y los éteres de glicerol (2), Figura 1. Estos últimos destacan por ser derivados de la industria del biodiesel, por la posibilidad de modular

las propiedades físicas variando el largo de la cadena carbonada y porque además de su aplicación como disolvente algunos de sus éteres han sido considerados para la captura de CO₂.⁴



metiltetrahidrofurano (1)



éteres de glicerol (2)

Figura 1. Dos potenciales disolventes verdes

El metiltetrahidrofurano (MeTHF) puede por su polaridad reemplazar a disolventes como el tetrahidrofurano o el diclorometano, como medio de reacción o disolvente de extracción y también se lo ha considerado como aditivo oxigenado a combustibles fósiles y biodiesel, aunque su precio no es hoy competitivo.⁵ El MeTHF ha sido usado en síntesis asimétrica⁶, síntesis de polímeros⁷ y biocatálisis⁸. Su versatilidad y polaridad como disolvente de extracción lo hace adecuado para complementar estrategias convencionales reemplazando a los disolventes comunes utilizados durante la purificación de compuestos de síntesis. Menos explorados como disolventes de reacción son los éteres de glicerilo, los que tienen el atractivo agregado de que su polaridad y punto de ebullición son modulables variando el largo de cadena

de la unidad de alcohol que se conjuga con la glicerina, Figura 2.

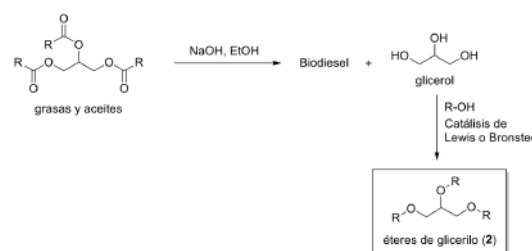


Figura 2. Éteres de glicerol como potencial subproducto de la fabricación de biodiesel

Objetivos

Este proyecto busca sustituir disolventes tradicionales actualmente utilizados en proyectos de síntesis orgánica y de biocatálisis que llevamos adelante en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, por disolventes de menor impacto ambiental. Para ello exploramos un disolvente relativamente más utilizado, MeTHF, y una opción más exploratoria (éteres de glicerilo).

En el primer estudio se busca reemplazar el THF que de acuerdo con estudios previos de nuestro grupo es un disolvente adecuado para la condensación de Knoevenagel-Doebner en la preparación de derivados de ácido cinámico, intermedios de la síntesis de modelos de lignina, utilizando MeTHF.

Paralelamente se estudiará el reemplazo del acetona y diclorometano en la síntesis del bromoepóxido **9** obtenido previamente de acuerdo con la siguiente secuencia quimioenzimática, Figura 3.

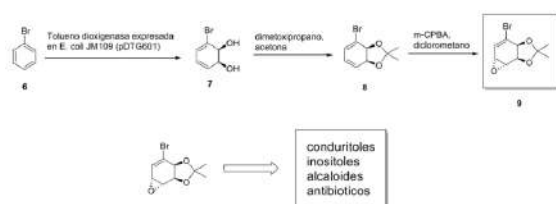


Figura 3. Síntesis del bromoepóxido **9** optimizada en el laboratorio de síntesis orgánica.

En la secuencia, bromobenceno (**6**) es convertido mediante dihidroxilación enzimática de arenos en el diol asimétrico **7** con alto exceso enantiomérico. El grupo diol es protegido para dar el acetónido **8** que posee una superficie cóncavo-convexa muy diferenciada y luego oxidado para dar el epóxido **9** con diastereoselectividad total. Este epóxido ha sido utilizado para la síntesis de muchos compuestos quirales oxigenados tanto por nuestro grupo como por otros en Norteamérica, Europa y Oceanía.^{9,10} Se trata de una secuencia muy eficiente que comienza con una etapa amigable con el medioambiente, pero las etapas dos y tres adolecen de inconvenientes derivados del uso de acetona, diclorometano y ácido metacloroperbenzoico (m-CPBA).

Nos proponemos estudiar el reemplazo de la epoxidación con m-CPBA por una oxidación quimioenzimática catalizada por lipasas,¹¹ y la sustitución de acetona y diclorometano por disolventes más amigables como MeTHF o éteres de glicerilo.

En la segunda parte de esta propuesta se busca incorporar un éter de glicerilo a la batería de disolventes para esta reacción. Estos compuestos a diferencia del MeTHF no están disponibles comercialmente en la cantidad necesaria a un precio razonable, por lo que se busca sintetizar una pequeña molécula de triéter de glicerol, 1,2,3-trietoxipropano (1,2,3- TEP).

Materiales y métodos

La síntesis de 1,2,3- TEP se realiza mediante una estrategia de dos pasos en one pot, utilizando epíclorhidrina (10) como material de partida con etanol y bromoetano como reactivos de eterificación, Figura 4.

Esta estrategia sintética se utiliza para contar con el disolvente en cantidades suficientes que nos permitan su evaluación en diferentes síntesis. En un futuro se pretende obtener dicho disolvente a partir de biomasa generada

en la producción de Biodiesel.

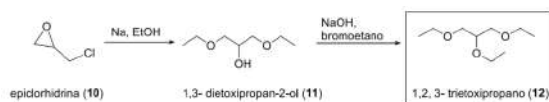


Figura 4. Preparación de 1,2,3-TEP a escala de laboratorio

Resultados y discusión

Se comenzó realizando la síntesis de 1,2,3-TEP mediante dos pasos de reacción en one pot y en distintas cantidades, con el fin de obtener los mejores rendimientos de reacción. Hasta el momento hemos obtenido el 1,2,3-TEP puro, con un rendimiento global del 40%.

Por otra parte se ha ensayado al MeTHF de origen comercial (Sigma-Aldrich: 2-Methyltetrahydrofuran, 1000 ml, cat#1082921000, USD 72).

Por un lado, hemos estudiado reacciones de Knoevenagel de compuestos aromáticos que modelan la lignina (Figura 5), y por otro lado se estudiará la síntesis de un epóxido asimétrico derivado de bromociclohexadienol.

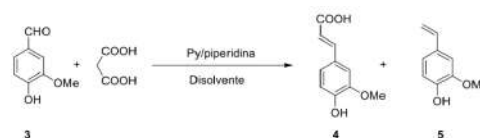


Figura 5. Reacciones de Knoevenagel-Doebner sobre modelos de lignina para la obtención de intermedios de síntesis para química fina

En el primer estudio buscamos reemplazar el THF que de acuerdo con estudios previos de nuestro grupo es un disolvente adecuado para la condensación de Knoevenagel-Doebner en la preparación de derivados de ácido cinámico, intermedios de la síntesis de modelos de lignina, utilizando MeTHF. Se ha estudiado la condensación de vainillina (**3**), entre otros benzaldehídos, con ácido malónico en condiciones básicas para dar ácido ferúlico (**4**). Este último es un compuesto de interés para la fabricación de filtros UV y como alternativa ambientalmente favorable al bisfenol A.¹² La condensación de Knoevenagel de estos compuestos suele formar además alquenos del tipo de **5** por descarboxilación del ácido ferúlico. Estos productos son indeseados por lo que es menester minimizar la formación de estos. En general estas reacciones requieren de una cantidad molar muy importante de piridina que a menudo funge como disolvente de la reacción con un exceso superior a 10 equivalentes. En la tesis doctoral de la Dra. Aldabalde se logró



reducir la cantidad de piridina a 1.1 equivalentes y reducir a trazas la formación del alqueno **5**,¹³ pero utilizando THF como disolvente lo que compromete el valor de la reacción en química sustentable. Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados sobre esta síntesis para disminuir el impacto ambiental, se basan en el uso de microondas y nuevos organocatalizadores o nanocatalizadores que mejoren el rendimiento de reacción, reduciendo el uso de altos valores de equivalentes de piridina.^{14,15} El uso de MeTHF y derivados de éteres de glicerilo, además de sumar un disolvente producido a partir de biomasa, posiblemente permita mejorar el rendimiento de la reacción por el mayor punto de ebullición de los disolventes comparado con THF.

Se han realizado distintos ensayos utilizando como solventes el MeTHF y 1,2,3- trietoxipropano (1,2,3- TEP) y diferentes benzaldehídos de partida.

Los resultados obtenidos hasta el momento han dado rendimientos menores a los ensayados en THF, por lo que continuamos realizando pruebas y ensayando nuevas condiciones de reacción permitidas por los nuevos disolventes.

Conclusiones

Continuamos estudiando posibles cambios en la síntesis de 1,2,3- TEP, así como también la realización de ésta a mayor escala, buscando mejorar los rendimientos obtenidos.

Por otro lado, podemos concluir la utilidad del MeTHF y 1,2,3- TEP como disolventes para la condensación de Knoevenagel-Doebner en la preparación de derivados de ácido cinámico, con rendimientos primarios bajos.

Bibliografía

1. Jessop, P. G. Searching for green solvents. *Green Chem.* **13**, 1391–1398 (2011).
2. Sheldon, R. A. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem.* **7**, 267–278 (2005).
3. Huber, G. W., Iborra, S. & Corma, A. Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering. *Chem. Rev.* **106**, 4044–4098 (2006).
4. Qian, S. *et al.* Synthesis and Properties of 1,2,3-Triethoxypropane: A Glycerol-Derived Green Solvent



- Candidate. *Ind. Eng. Chem. Res.* **59**, 20190–20200 (2020).
5. Elliott, D. C. & Frye, J. G. Hydrogenated 5-carbon compound and method of making, US Patent 5883266. (1999).
6. Pace, V., Hoyos, P., Castoldi, L., Domínguez De María, P. & Alcántara, A. R. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A biomass-derived solvent with broad application in organic chemistry. *ChemSusChem* **5**, 1369–1379 (2012).
7. Englezou, G. *et al.* 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) as a versatile green solvent for the synthesis of amphiphilic copolymers via ROP, FRP, and RAFT tandem polymerizations. *J. Polym. Sci.* **58**, 1571–1581 (2020).
8. Alcántara, A. R. & de María, P. D. Recent Advances on the Use of 2-methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) in Biotransformations. *Curr. Green Chem.* **5**, 86–103 (2018).
9. Bedard, K. & Hudlicky, T. Enzymatic dihydroxylation of aromatic compounds: Nature's unique reaction and its impact on the synthesis of natural products. in *Strategies and tactics in Organic Synthesis* (ed. Harmata, M.) en prensa. (2021).
10. Duchek, J., Adams, D. R. & Hudlicky, T. Chemoenzymatic synthesis of inositols, conuritols, and cyclitol analogues. *Chem. Rev.* **111**, 4223–4258 (2011).
11. Haitz, F. *et al.* Chemo-Enzymatic Epoxidation of Lallelantia Iberica Seed Oil: Process Development and Economic-Ecological Evaluation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **185**, 13–33 (2018).
12. Janvier, M. *et al.* Syringaresinol: A Renewable and Safer Alternative to Bisphenol A for Epoxy-Amine Resins. *ChemSusChem* **10**, 738–746 (2017).
13. Virginia Aldabalde. Recuperación de productos químicos de alto valor agregado a partir de lignina y kraft. Preparación de modelos de lignina y estructuras relacionadas. con potencial sintético. (Universidad de la República, 2015).
14. van Schijndel, J., Canalle, L. A., Molendijk, D. & Meuldijk, J. The green Knoevenagel condensation: solvent-free condensation of benzaldehydes. *Green Chem. Lett. Rev.* **10**, 404–411 (2017).
15. Mouterde, L. M. M. & Allais, F. Microwave-Assisted Knoevenagel-Doebner Reaction: An Efficient Method for Naturally Occurring Phenolic Acids Synthesis. *Front. Chem.* **6**, 1–7 (2018).

Mecanismos de Deep Learning y Redes Neuronales para el
Reconocimiento Efectivo del Iris



C.25. Ciencia, tecnología e innovación

Mecanismos de Deep Learning y Redes Neuronales

Para el Reconocimiento Efectivo del Iris

Autor: Inda Kevin; indakevintsp@gmail.com

Profesor/a guía: Alvez Carlos Eduardo; carlos.alvez@uner.edu.ar

Universidad Nacional de Entre Ríos

Resumen

Los Sistemas de reconocimiento biométrico (SRB) permiten identificar de forma única a las personas a través de sus características fisiológicas o de comportamiento. Las tecnologías biométricas se están convirtiendo, por lo tanto, en la base de una amplia gama de sistemas de identificación y verificación. La utilización de las técnicas de Deep Learning (DL) en los SRB suponen un paso enorme en la evolución tecnológica. Los sistemas de reconocimiento de iris existentes afirman funcionar bien en condiciones ideales utilizando la configuración de imágenes desarrolladas para capturar imágenes de alta calidad, pero la tasa de reconocimiento puede disminuir sustancialmente cuando se utilizan datos no ideales, además del gran costo de procesamiento de los datos que

esto requiere. ¿Es posible desarrollar un SRB que a pesar de estas dificultades mencionadas siga conservando una alta tasa de efectividad y eficiencia en el reconocimiento del iris? El objetivo de esta investigación es analizar diferentes mecanismos de DL y redes neuronales aplicados en los SRB mediante iris, los cuales han logrado resultados exitosos en los últimos años. Además de establecer parámetros y mecanismos que permitan desarrollar una arquitectura de red neuronal para la segmentación del iris, que no pierda la efectividad y eficiencia bajo condiciones que no son ideales.

Introducción

Los sistemas biométricos están en constante evolución y prometen tecnologías que se pueden utilizar en sistemas automáticos para identificar y/o autenticar la identidad de una persona de



forma única y eficientemente. A diferencia de los sistemas de autenticación tradicionales, en la autenticación biométrica, no se tiene que recordar contraseñas ni existe la posibilidad de extraviar dispositivos (como con el uso de tarjetas o llaves). Hoy en día los sistemas de identificación de personas se han convertido en una necesidad para la sociedad. A medida que avanza la tecnología y la aplicación de la misma en entornos tanto de ocio o comodidad como de seguridad, la evolución en desarrollo biométrico es muy grande. Los sistemas de identificación o verificación tradicionales (tarjetas o claves) se han ido sustituyendo por sistemas automáticos de reconocimiento biométrico. Los sistemas de reconocimiento biométrico usan características fisiológicas o de comportamiento propias de cada individuo para identificarlo, es decir, se reconoce al usuario por lo que es en lugar de por lo que tiene o sabe. Los rasgos fisiológicos presentan una reducida variabilidad a lo largo del tiempo, pese a que su adquisición es más invasiva y requiere de la cooperación de los sujetos. Por el contrario, los rasgos de comportamiento resultan menos invasivos aunque la exactitud de la identificación es menor debido a la variabilidad de los patrones de comportamiento (Anil K. Jain, Ross y Prabhaka, 2004, p.1). Un sistema

biométrico es esencialmente un sistema de reconocimiento de patrones que opera adquiriendo datos biométricos de un individuo, extrayendo un conjunto de características de los datos adquiridos y comparando este conjunto de características con la plantilla establecida en la base de datos. Dependiendo del contexto de la aplicación, un sistema biométrico puede operar en modo de verificación o en modo de identificación. En el modo de verificación se realiza una comparación uno a uno y se utiliza normalmente para el reconocimiento positivo, donde el objetivo es evitar que varias personas utilicen la misma identidad. En el modo de identificación, el sistema reconoce a un individuo buscando una coincidencia en las plantillas de todos los usuarios en la base de datos. Por lo tanto, el sistema realiza una comparación de uno a muchos para establecer la identidad de un individuo sin que el sujeto tenga que reclamar una identidad. Cualquier rasgo fisiológico o de comportamiento humano puede servir como característica biométrica siempre que satisfaga los siguientes requisitos según (Prabhakar, Pankati y Jain, 2003, p.1):

Universalidad: Cada persona debe tener la característica que se desea medir.



Distintividad: Las personas deben ser diferenciadas en término de sus características.

Permanencia: La característica debe ser suficientemente invariable (con respecto al criterio de coincidencia) durante un período de tiempo.

Medible: La característica debe ser evaluable cuantitativamente.

Un sistema biométrico permite reconocer a una persona en base a un vector de características fisiológicas o conductuales específicas que posee la persona. Sin embargo, para un sistema biométrico práctico, también debemos considerar cuestiones de rendimiento y aceptabilidad. En otras palabras, un sistema práctico debe cumplir con los requisitos de precisión, velocidad y recursos, y debe ser inofensivo para los usuarios, aceptado por la población destinataria y suficientemente robusto para varios métodos y ataques fraudulentos. Entre todas las características físicas únicas, la biometría del iris se conoce como la más precisa y muy difícil de reproducir o replicar. En este sentido, el reconocimiento del iris se ha utilizado en muchas aplicaciones críticas, como el control de acceso en áreas, acceso a bases de datos, tarjetas de identificación nacionales. Varios estudios han demostrado que el rasgo del iris tiene

una serie de ventajas sobre otros rasgos biométricos (por ejemplo, cara, huella digital), que es comúnmente aceptado para su aplicación en alta confiabilidad y sistemas biométricos precisos. En primer lugar, el rasgo del iris representa la región anular del ojo que se encuentra entre la pupila negra y la esclerótica blanca como se puede identificar en la figura 1; esto lo hace completamente protegido de diversas condiciones ambientales. En segundo lugar, la textura del iris proporciona un grado muy alto de singularidad y aleatoriedad, por lo que es muy poco probable que dos patrones de iris sean iguales, incluso iris de gemelos idénticos, o de los ojos derecho e izquierdo de una persona individual. En tercer lugar, el rasgo del iris proporciona un alto grado de estabilidad durante la vida de una persona desde el año de edad hasta la muerte. Finalmente, se considera el rasgo biométrico más seguro contra métodos fraudulentos y ataques de suplantación de identidad. A pesar de las ventajas mencionadas, implementar un sistema de reconocimiento de iris es considerado un problema desafiante. Esto se debe principalmente al proceso de adquisición del iris, donde se puede adquirir partes irrelevantes como párpados, pestañas, pupilas y reflejos especulares que pueden influir en los resultados de segmentación y

reconocimiento del iris, que hacen que las condiciones no sean las ideales para la identificación del iris.

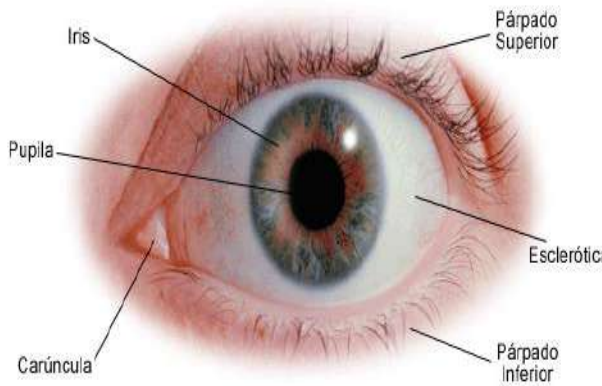


Figura 1: Partes del ojo humano

Objetivos

Los principales objetivos de este trabajo serán:

- Examinar las potencialidades de los mecanismos de DL y redes neuronales en biometría específicamente en el reconocimiento del iris.
- realizar un análisis comparativo de los mecanismos de DL, en base a los parámetros de efectividad, rendimiento y practicidad, evaluando trabajos relacionados al reconocimiento, normalización y segmentación del iris
- En base a b) realizar una propuesta de arquitectura de red neuronal para la segmentación del iris, efectiva y eficiente bajo condiciones no ideales.

Materiales y métodos

En relación a los métodos utilizados a lo largo de este proyecto, se realizó la comparación e investigación de diferentes algoritmos capaces de identificar y reconocer el iris de los seres humanos. Para esto se enumeran las principales técnicas de ML para comprender el funcionamiento de los algoritmos utilizados en DL. Luego se describe la arquitectura de la red neuronal propuesta basada en VGG16, que fue utilizada para las pruebas de segmentación del iris. Para la realización de las pruebas se utilizó la base de datos CASIA-Iris-Lamp.

Principales técnicas de Machine Learning

Para adentrarse en los algoritmos deep learning es fundamental identificar los algoritmos de Machine learning (ML) principales, que son la base de los utilizados en DL. Existen diferentes tipos y son aplicables dependiendo de la variedad de uso que le intentemos dar dentro del inmenso mundo de ML. Las principales funciones que de ML son las siguientes:

Clasificación: este es el problema de asignar una categoría a cada elemento. Por ejemplo, la clasificación de documentos consiste en asignar una categoría como política, negocios, deportes o clima para cada documento,



mientras que la clasificación de imágenes consiste de asignar a cada imagen una categoría como iris o no iris. El número de categorías en tales tareas es a menudo menos de unos pocos cientos, pero puede ser mucho mayor en algunas tareas difíciles e incluso ilimitadas como en la clasificación de texto, o reconocimiento de voz. SVM es un ejemplo de algoritmo de clasificación.

Regresión: este es el problema de predecir un valor real para cada elemento. Ejemplos de regresión incluyen la predicción de valores de acciones o de variaciones económicas variables. En la regresión, la penalización por una predicción incorrecta depende de la magnitud de la diferencia entre los valores verdaderos y predichos, en contraste con el problema de clasificación, donde generalmente no existe la noción de cercanía entre varias categorías.

Ranking: este es el problema de aprender a ordenar artículos de acuerdo con algún criterio. La búsqueda web, por ejemplo, devolver páginas web relevantes para una consulta de búsqueda, es el canónico ejemplo de clasificación. Muchos otros problemas de clasificación similares surgen en el contexto del diseño de extracción de información o sistemas de procesamiento de lenguaje natural.

Clustering (Agrupamiento): este es el problema de dividir un conjunto de

elementos en subconjuntos homogéneos. La agrupación a menudo se usa para analizar conjuntos de datos muy grandes. Por ejemplo, en el contexto del análisis de redes sociales, los algoritmos de agrupamiento intentan identificar comunidades naturales dentro de grandes grupos de personas.

Reducción de la dimensionalidad o aprendizaje múltiple: este problema consiste en transformar una representación inicial de elementos en una representación de menor dimensión preservando algunas propiedades de la representación inicial. Un ejemplo común implica el pre-procesamiento de imágenes digitales en tareas de visión por computadora. Además, ML se puede clasificar en aprendizaje automático clásico y aprendizaje profundo. Algoritmos como Árbol de decisión, SVM, regresión lineal y Naive Bayes pertenecen al aprendizaje automático clásico. El aprendizaje profundo aplica redes neuronales profundas (DNN) que utilizan múltiples capas de unidades de procesamiento no lineales para extracción y transformación de características. Los algoritmos típicos de aprendizaje profundo a menudo siguen alguna estructura de red neuronal ampliamente utilizada como las redes neuronales convolucionales (CNN), y redes neuronales recurrentes (RNN).



Tipos de Redes Neuronales

Los algoritmos de DL son aquellos que ejecutan datos a través de múltiples capas de redes neuronales. Algunos autores los mencionan como “La evolución de las Redes Neuronales” (Esteban Andrés García, Germán y Leandro Osella Massa, 2003). Aprovechando el abaratamiento de la tecnología y la mayor capacidad de ejecución, memoria y disco para explotar gran cantidad de datos en enormes redes neuronales. Estas pasan a la capa siguiente una representación simplificada de los datos analizados. Estos algoritmos aprenden progresivamente sobre el objeto o imagen que estudian. Los principales tipos de redes neuronales utilizadas para DL son:

Recurrent Neural Networks (RNN)

Las Redes Neuronales Recurrentes (RNN, por su sigla en inglés), son una familia de redes utilizadas para procesar datos secuenciales. Las RNN se especializan en procesar datos que se encuentran en forma de vector. En este tipo de redes, se permiten conexiones entre nodos de una misma capa, por lo que obtenemos redes neuronales con memoria. Las conexiones de una red recurrente pueden ser dirigidas, como sucede normalmente en las redes neuronales multicapa, aunque

también pueden ser bidireccionales. Básicamente, construyen una representación vectorial para cada token leyendo token por token y “recordando” información importante, cada uno de los cuales se utiliza para actualizar un estado oculto. Es decir, son redes con bucles que permiten que la información persista y son capaces de manejar datos secuenciales tales como secuencias de texto. Las RNN se llaman recurrentes porque realizan la misma tarea para cada elemento de una secuencia, y la salida depende de los cálculos previos.

Convolutional Neural Networks (CNN)

Las Redes neuronales convolucionales (Convolutional Neural Networks o CNN), son un tipo particular de red neuronal para procesar datos, inspirada en el funcionamiento de la corteza visual del cerebro. Al igual que las redes neuronales “convencionales”, reciben una entrada que transforman a través de una serie de capas de neuronas, pero en este caso, la entrada es una imagen representada en forma de matriz tridimensional - ancho, alto y profundidad de color- que contiene los valores numéricos de los píxeles. Las capas de neuronas también se organizan de manera tridimensional, y el resultado de las distintas transformaciones llevadas a cabo en la red es la clase, etiqueta o



categoría a la que pertenece dicha imagen. Como un ejemplo sencillo, es que a una red neuronal convolucional se le brinde una base de datos con emociones e imágenes de esas emociones, por lo que, si recibe una imagen, debería poder identificarla y etiquetarla. Si se dispone, por ejemplo, de una imagen con dimensiones de 640 x 640 píxeles, esta hace un total de 409.600 datos de entrada que estarán conectados a cada una de las neuronas de la primera capa. Esto produce un gran número de cálculos que ralentizará el proceso de entrenamiento. Para mitigar dicho problema se presentan las redes neuronales convolucionales, que están formadas por diferentes capas, donde las primeras capas se encargan de extraer características como los bordes o esquinas de una imagen. Una vez detectados, estos bordes son utilizados para detectar formas en las capas posteriores. Cuando se detectan las formas se procede a detectar las características de alto nivel como puede ser una rueda en una imagen donde aparece un auto. Las últimas capas están totalmente conectadas y son las encargadas de dar una predicción a partir de estas últimas características extraídas. Las redes neuronales convolucionales se componen de tres capas:

Capa convolucional: Esta capa aplica filtros convolucionales a la imagen con el

objetivo de encontrar qué característica del modelo aplica con más fuerza. Las neuronas en la primera capa convolucional no están conectadas a cada píxel de la imagen de entrada, sino a cada píxel de su campo receptivo. A su vez, cada neurona de la segunda capa convolucional se encuentra conectada sólo con un rectángulo de la capa superior. Esto le permite a la red concentrarse en conceptos más pequeños para luego ensamblarlos en conceptos más grandes para la siguiente capa convolucional y así hasta la última.

Esta capa funciona estableciendo una región de análisis (campo receptivo) que se mueve de lugar hasta haber pasado por toda la imagen. Por cada movimiento se realizan un conjunto de operaciones matemáticas para producir un único valor y se aplica la función de activación ReLU para introducir valores no lineales dentro del modelo.

Capa pooling: Esta capa se encarga de reducir las dimensiones del resultado obtenido de la capa convolucional (downsampling) para reducir el tiempo de procesamiento, es decir, una compresión de los datos. Al igual que antes, las neuronas de esta capa se conectan con un número limitado de neuronas de la capa previa que a su vez tienen un campo receptivo reducido (Géron, 2017). El algoritmo más utilizado es max-pooling y

su función principal es reducir el espacio del tamaño real de la representación de salida de las capas convolucionales y producir una forma limitada de la traducción.

Capa densa o fully-connected: Esta capa se denomina densa dado que todos los nodos están conectados entre imagen en base a los resultados de las capas anteriores.

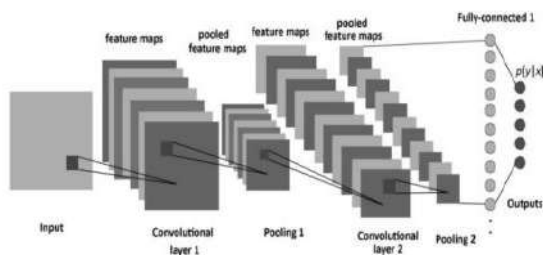


Figura 2: Arquitectura típica de una red neuronal convolucional.

Librerías y Frameworks

Habiendo comprendido los conceptos que comprenden el reconocimiento de imágenes y redes neuronales es necesario determinar qué herramientas se van a utilizar en este proyecto. En este apartado describiremos librerías y Frameworks más importantes para DL, en particular TensorFlow y Keras. TensorFlow es una biblioteca de código abierto para aprendizaje automático a

través de un rango de tareas, y desarrollado por Google para satisfacer sus necesidades de sistemas capaces de construir y entrenar redes neuronales para detectar y descifrar patrones y correlaciones, análogos al aprendizaje y razonamiento usados por los humanos. Mientras la implementación de referencia se ejecuta en dispositivos aislados, TensorFlow puede correr en múltiples CPUs y GPUs. TensorFlow está disponible en Linux de 64 bits, macOS, y plataformas móviles que incluyen Android e iOS. Los cálculos de TensorFlow están expresados como grafos de flujo de datos con estado (stateful dataflow graphs). El nombre TensorFlow deriva de las operaciones que tales redes neuronales realizan sobre arrays multidimensionales de datos. Estos arrays multidimensionales son referidos como "tensores".

Keras es una biblioteca para redes neuronales de alto nivel desarrollada para Python, que busca simplificar en gran medida su desarrollo. Permite ejecutarse en librerías como TensorFlow, Theano o CNTK. En 2017, Keras fue integrado en el código fuente de TensorFlow, permitiendo su desarrollo con un mayor nivel de abstracción.



Trabajos relacionados

En esta sección se describen diferentes artículos científicos que sirven para el análisis y la comparación de la arquitectura propuesta. El uso de la Red neuronal convolucional (CNN) para reconocimiento biométrico es el más adecuado para el reconocimiento de características en imágenes debido a su funcionamiento, el cual se detalló anteriormente.

En S. Minaee, A. Abdolrashidiy y Y. Wang, (2016). Propusieron un sistema de reconocimiento de iris en el que utilizaron el correspondiente VGG-Net para extraer las características profundas. Luego utilizaron un algoritmo SVM de clases múltiples para la clasificación. Probaron su sistema en dos bases de datos de iris, el conjunto de datos de iris IIT y el conjunto de datos CASIA 1000 Iris. Su experimento logró altos resultados con el reconocimiento de precisión del 99,4%.

En Minaee, Abdolrashidiy y Wang (2016). propusieron un algoritmo que utiliza una red convolucional llamada “dispersión” que ofrece una representación multicapa de la señal. Después de la extracción de las características de dispersión, utilizaron el análisis de componentes principales para disminuir la dimensionalidad de los datos y luego el reconocimiento realizado utilizando una máquina de vectores de

soporte de clases múltiples. Su algoritmo propuesto ha sido probado en tres conjuntos de datos faciales y ofrece una tasa de reconocimiento muy alta. En O. Oyedotun y A. Khashman(2017) propusieron un sistema para el diagnóstico del nevus del iris dependiendo de una red neuronal convolucional además de la red de creencias profundas. El nevus del iris se define como un crecimiento pigmentado localizado alrededor de la pupila o en la parte delantera del ojo. Utilizaron un sistema de arquitectura LeNet-5 para la CNN. Sus tasas de precisión son del 93,35% para CNN.

Resultados y discusión

Los sistemas de reconocimiento de iris existentes afirman funcionar bien en condiciones ideales utilizando la configuración de imágenes desarrolladas para capturar imágenes de alta calidad, pero la tasa de reconocimiento puede disminuir sustancialmente cuando se utilizan datos no ideales. Por lo tanto, antes expuesto, el sistema de reconocimiento de iris sigue siendo un problema abierto y el desempeño de los métodos más avanzados todavía tiene mucho margen de mejora. El reconocimiento del iris ha incrementado mucho su popularidad en los últimos años, especialmente en

diferentes campos relacionados con la seguridad. El éxito de cualquier sistema biométrico definido como un sistema de clasificación y reconocimiento principalmente depende de la eficiencia y robustez de las etapas de extracción y clasificación de características. Un paso crucial en los sistemas de reconocimiento del iris es la segmentación de la región del iris a partir de la imagen de entrada. Este paso se ha resuelto tradicionalmente mediante la segmentación diseñada manualmente. El sistema de reconocimiento de iris propuesto tiene etapas principales. Primero, segmentando la región requerida del iris, después de eso se normaliza para ser un patrón fijo en coordenadas polares. Entonces, las características extraídas de ese patrón pasan a ser reconocidas en la última etapa (S. Minaee et al. 2016). Vale la pena mencionar que muchos de los modelos de reconocimiento de iris clásicos realizan varios pasos de pre-procesamiento como detección, normalización y mejora del iris, como se muestra en la Figura 3. Luego extraen características de la imagen normalizada o mejorada. Muchos de los trabajos más recientes sobre reconocimiento de iris omiten la normalización y la mejora y, sin embargo, aún pueden lograr una precisión de reconocimiento muy alta. Una razón es la capacidad de los modelos

profundos para capturar características semánticas de alto nivel a partir de imágenes de iris originales, que son lo suficientemente discriminativas para funcionar bien en el reconocimiento del iris.

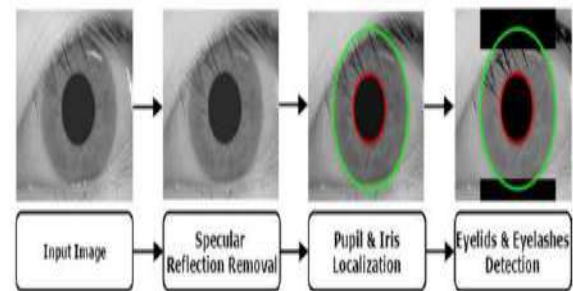


Figura 3: Etapas generales del procedimiento de localización del iris.

Localización de iris

La precisión en la localización de la región del iris juega un papel fundamental en la eficiencia y fiabilidad del sistema. De esta depende directamente de la calidad de la región del iris detectada. El procedimiento de localización del iris tiene como objetivo detectar los dos límites de la región del iris, el límite interno (pupila-iris) y el límite externo (iris-esclerótica). Sin embargo, la tarea se vuelve más difícil, cuando se cubren partes del iris por párpados y pestañas. Además, los cambios en las condiciones de iluminación durante el proceso de adquisición pueden afectar la

calidad de la región del iris extraída y luego afectar la localización del iris y el resultado del reconocimiento. En esta sección, se da una breve descripción del procedimiento de localización del iris. (Al-Waisy, Qahwaji, Ipson, Al-Fahdawi y Tarek, 2017) se propone un algoritmo eficiente y automático para detectar los límites internos y externos del iris.

Normalización del Iris

Una vez que se han detectado los límites del iris, se implementa la normalización del iris para producir un vector de característica de dimensión fija que permite la comparación entre dos imágenes del iris. La principal ventaja de la normalización del iris es eliminar las inconsistencias dimensionales que pueden ocurrir debido al estiramiento de la región del iris causado por la dilatación de la pupila con diferentes niveles de iluminación. Otras causas de las inconsistencias dimensionales incluyen: el cambio de la distancia de las imágenes, la distorsión elástica en la textura del iris que puede afectar el resultado de la coincidencia del iris y la rotación de la cámara o el ojo (Al-Waisy et al., 2017).

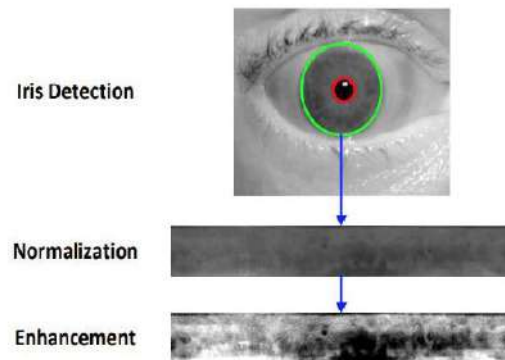


Figura 4: Ilustración de algunos de los pasos clave de pre-procesamiento para reconocimiento de iris.

En este documento se contribuye al reciente trabajo que pretende desarrollar modelos de aprendizaje profundo de la segmentación del iris y estudiar la utilidad de VGG-Net16. Los enfoques recientes para la segmentación del iris, que son de relevancia para este trabajo, consideran la segmentación del iris como un problema de clasificación, donde el objetivo es asignar cada píxel ya sea a la clase de iris o no iris, como se presenta en (Jalilian y Uhl, 2017). Para la segmentación del iris se propone entrenar una CNN basada en el modelo VGG-net16 anteriormente mencionado utilizando la librería Keras API de red neuronal de alto nivel y TensorFlow en la parte del backend y los mecanismos de localización y normalización del iris presentado. Tomamos el conjunto de imágenes



CASIA-Iris-Lamp para la realización de pruebas.

Arquitectura de la Red Neuronal

En base al análisis comparativo de los modelos de las arquitecturas de redes neuronales presentados en los artículos en la sección anterior, se obtiene la siguiente tabla.

Tabla 1:

Redes neuronales analizadas

Red Neuronal	Máxima precisión	Capas Convolucionales	Capas completamente conectadas
VGG16	99,4%.	13	3
LeNet-5	93,35%	3	2
AlexNet	98%	5	3

Tabla comparativa de las redes neuronales analizadas, teniendo en cuenta su precisión, cantidad de capas convolucionales y capas completamente conectadas.

Teniendo en cuenta la alta tasa de presión que obtiene la arquitectura VGG16 se propone una arquitectura general de esta. Ha demostrado que la profundidad de la red es un componente crítico para una buena actuación. El modelo VGG, o

VGGNet, que admite 16 capas también se conoce como VGG16. La red VGG está construida con filtros convolucionales muy pequeños. El VGG-16 consta de trece capas convolucionales y tres capas completamente conectadas. Las capas de entrada se establecen en una imagen RGB de tamaño 224x224. El valor RGB promedio se calcula para todas las imágenes, en la imagen del conjunto de entrenamiento, y luego la imagen se ingresa como una entrada a la red de convolución VGG. Se utiliza un filtro 3x3, y el paso de convolución es fijo. El número 16 en el nombre VGG se refiere al hecho de que es una red neuronal profunda de 16 capas. La simplicidad de arquitectura VGG16 resulta interesante ya que con solo mirarla refleja la uniformidad de la misma. Las VGGNets se basan en las características más esenciales de las redes neuronales convolucionales (CNN).

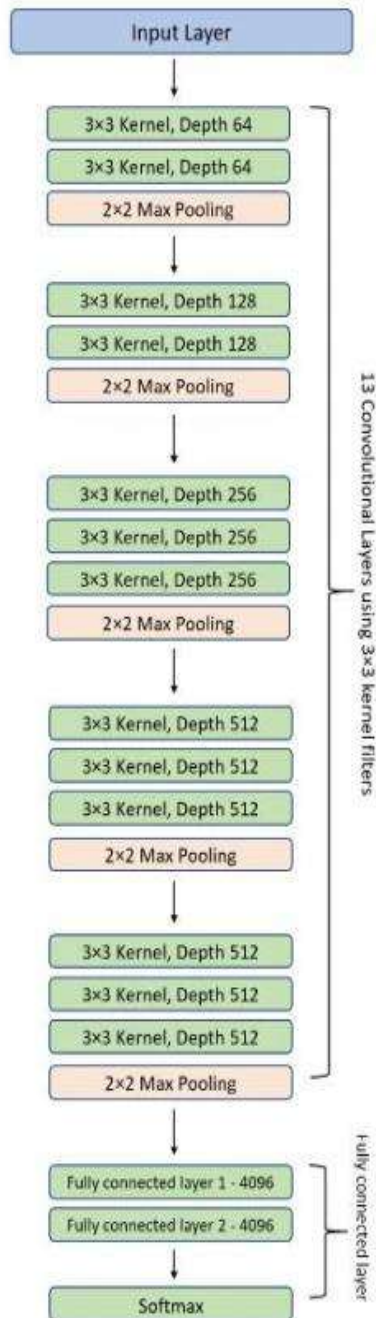


Figura 5: Arquitectura red neuronal VGG16.

Para la realización de las pruebas se tomó la base de datos CASIA-Iris-Lamp

mencionada anteriormente y la red neuronal VGG16 utilizando Tensorflow y Keras para su implementación. Los resultados de la segmentación y de la imagen se detallan a continuación:

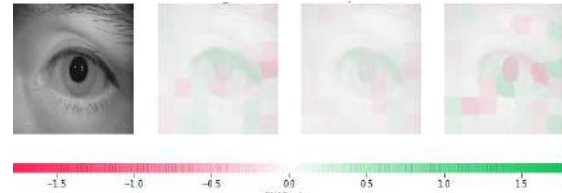


Figura 6: Capas de segmentación del iris
Fuente: Elaboración propia

Conclusiones

En este artículo se evaluaron diferentes mecanismos de DL y redes neuronales a través de un exhaustivo relevamiento bibliográfico. Se realizó un análisis comparativo de las diferentes metodologías utilizadas en los artículos mencionados y los modelos de redes neuronales utilizados para la segmentación del iris. Como resultado del análisis comparativo de esta investigación se determinó que las redes neuronales mencionadas funcionan con una alta tasa de precisión. Sin embargo, las CNN adolecen de un problema de eficiencia energética: comparadas con redes neuronales naturales, son tremendamente ineficientes, pues requieren más computación y más energía. Un cerebro



humano (órdenes de magnitud más complejo que cualquier CNN) consume la misma energía que una bombilla (12-25 W), mientras que el hardware requerido para ejecutar una CNN oscila entre los 500 W (una CNN básica ejecutada en un ordenador personal con una GPU), a varios megawattios (una CNN compleja en superordenador actual). Hay un aspecto fundamental que diferencia las CNN y las redes biológicas que contribuye a la ineficiencia: las unidades, (neuronas), no se comunican con valores continuos, sino que lo hacen de forma discreta, en impulsos electroquímicos. Solo cuando una neurona es activada, las que están conectadas a ella reciben este impulso (a diferencia de una CNN, en la que información pasa de una capa a otra independientemente del valor en sí). Las redes neuronales de impulso (Spiking Neural Networks o SNN en inglés) son modelos que utilizan esta forma de comunicación. Además, también se acercan más al realismo biológico en los siguientes aspectos: Concepto de tiempo en lugar de introducir input en el modelo, procesar las unidades y obtener output, las SNN son simulaciones de poblaciones neuronales a través del tiempo; el modelo puede recibir un input (estímulo) continuo, y la actividad de las poblaciones determina, la actividad de las neuronas output. Alto grado de interconectividad; en

el cerebro humano se estima que cada neurona establece conexiones sinápticas con 10000 más, con alto nivel de redundancia y recursividad. Estas características hacen que el modelo SNN sea más realista y similar al mecanismo cerebral. SNN recibe una serie de picos como entrada y produce una serie de picos como salida (una serie de picos generalmente se conoce como trenes de picos). Por lo antes expuesto, aquí se propone la aplicación de un mecanismo de “bajo costo” mediante SNN basado en el modelo “VGG16”, utilizando librerías como TensorFlow y Keras, que mantenga las mismas prestaciones que las CNN. Con esto, lo que se espera obtener, es una arquitectura de red neuronal mucho más eficiente, que preserve la misma características de precisión que una CNN en términos de reconocimiento y segmentación del iris humano, además de ser utilizada para cualquier mecanismo de identificación de imágenes de diferentes tipos. En el futuro el desafío es poder implementar de manera real esta propuesta en un sistema para la segmentación del iris.

Bibliografía

Anil K. Jain, Arun Ross y Salil. (2004).
An introduction to biometric



- recognition, IEEE Transactions on Circuits and Systems for Video Technology.
- Al-Waisy AS, Qahwaji R, Ipson S, Al-Fahdawi S y Nagem A. (2018). *A multi-biometric iris recognition system based on a deep learning approach. Pattern Anal Applic 21, 783-802*
<https://doi.org/10.1007/s10044-017-0656-1>
- Esteban Andrés García y Germán Leandro Osella Massa. (2003). Evolución de Redes Neuronales mediante Sistemas de Reescritura. Argentina: Facultad de Informática de la Universidad Nacional de La Plata.
- Géron, A. (2017). Hands-on Machine Learning with Scikit-Learn and TensorFlow. O'Reilly Media Inc.
- Jalilian, E. y Uhl, A. (2017). Iris Segmentation Using Fully Convolutional Encoder--Decoder Networks. In Deep Learning for Biometrics (pp. 133-155). (Advances in Computer Vision and Pattern Recognition). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61657-5_6
- Moñivar S. (2019). Reconocimiento de escenas exteriores mediante redes neuronales profundas entrenadas con la base de datos places. Madrid: Escuela Politecnica Superior. Universidad Autonoma de Madrid
- O. Oyedotun y A. Khashman. (2017). Iris nevus diagnosis: convolutional neural network and deep belief network. Turquia: *Turkish Journal of Electrical Engineering & Computer Sciences*, vol. 25, p. 1106-1115.
- Pech May, F. (2018). tecnm. Obtenido de http://rios.tecnm.mx/cdistribuido/recursos/DLScr/PLN.html#%28part._.Aprendizaje_profundo_con_.Redes_.Neuronales_.Recurrentes%29
- Prabhakar, S., S. Pankati and A. K. Jain (2003). Biometric Recognition: Security and Privacy concerns. Proc. of the IEEE Security and Privacy.
- S. Minaee, A. Abdolrashidiy y Y. Wang. (2016). An experimental study of deep convolutional features for iris recognition New York: Computer Science and Engineering Department, University of California at Riverside.



S. Minaee, A. Abdolrashidi y Y. Wang.(2016). Face Recognition Using Scattering Convolutional Network.

S. Minaee, A. Abdolrashidi, H. Su, M. Bennamoun y D. Zhang. (2019). Biometric Recognition Using Deep Learning: A Survey. Estados Unidos: New York University

S. Tammina. (2019). Transfer learning using VGG-16 with Deep Convolutional Neural Network for Classifying Images. *International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 9*. DOI: 10.29322/IJSRP.9.10.2019.p9420

Sian Jin, Sheng Di, Xin Liang, Jiannan Tian, Dingwen Tao y Franck Cappello. (2019). *DeepSZ: A Novel Framework to Compress Deep Neural Networks by Using Error-Bounded Lossy Compression*. DOI: 10.1145/3307681.3326608

Zijing Zhao y Ajay Kumar. (2017). Towards more accurate iris recognition using deeply learned spatially corresponding features. In IEEE International Conference on Computer Vision, (pp. 3809–381).

Financiamiento

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto de investigación y desarrollo (PID 7058) financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos de Entre Ríos.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias de La Administración de la Universidad Nacional de Entre Ríos por brindarme la posibilidad de ser parte del proyecto de investigación (PID UNER 7058). Al Dr. Carlos Eduardo Alvez por el acompañamiento y ayuda, a mi familia por el apoyo permanente en el transcurso de este proyecto.

Modelización de las relaciones de colimación de un instrumento de radiografía de neutrones para el futuro Reactor Nuclear de Investigación (RNI) Boliviano.



C.25. Ciencias Exactas – Ciencia tecnología e innovación

Modelización de las relaciones de colimación de un instrumento de radiografía de neutrones para el futuro Reactor Nuclear de Investigación (RNI) Boliviano.

Autor: Casimiro Icallo, Elvis; 201610854@est.umss.edu

Co-autor(es): Luna, Wily; 201801916@est.umss.edu

Román, Diego Rubén; 201706683@est.umss.edu

Nava, Jorge Eduardo; 202001751@est.umss.edu

Profesor/a guía: Callisaya Choque, Cynthia Esther; cynthia.callisaya@fcyt.umss.edu.bo
Universidad Mayor de San Simón

Resumen

El presente trabajo de investigación muestra el cálculo de la relación de colimación en un instrumento de radiografía de neutrones utilizando el software McStas.

McStas es una herramienta gratuita y de código abierto, optimizada para el trabajo con flujo de neutrones y los instrumentos que trabajan con estos; la ventaja de trabajar con esta herramienta radica en el hecho de que se puede realizar manipulaciones en el esquema de trabajo sin correr riesgo alguno. Este software se basa en el concepto estadístico de Montecarlo

El principio de funcionamiento de esta técnica se necesita conocer las componentes a ser usadas por el simulador, además de los parámetros de las cuales depende la modelización de las

relaciones de colimación, consecuentemente de esta depende en gran medida la resolución espacial intrínseca en el detector, es decir, la imagen del objeto.

La imagen en el detector también se complementa por la ley de Beer Lambert; que permite predecir el comportamiento de la intensidad del haz de neutrones. Para la obtención de resultados con esta técnica,

Realizando la simulación se encontró una relación L/D óptimo para la relación de colimación, consecuentemente a estos parámetros encontrados da como resultado una mejor resolución espacial intrínseca, entonces nuestro modelo de simulación optimiza la radiografía de neutrones, además se trabajó en la traducción de libros que ayuden en el proceso de la investigación para futuros interesados en el área.



1. Introducción

La Agencia Nuclear Boliviana (ABEN) a través de su centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología Nuclear (CIDTN) impulsa varios proyectos relacionados con el área nuclear uno de ellos es el complejo del reactor nuclear de investigación (RNI) donde los haces serán utilizados para el laboratorio por análisis por activación de neutrones y para radiografía de neutrones [1]. Los países desarrollados y la mayoría de los países latinoamericanos cuentan con este tipo de tecnología, Bolivia sin quedar atrás, más adelante también contará con esta tecnología. Hay una necesidad urgente de desarrollar esta tecnología, Ritch (1999) afirma: “La humanidad tendrá que utilizar la capacidad nuclear, si se pretende satisfacer sus necesidades...”[2]

En la actualidad se utiliza bastante la simulación para evitar accidentes y se usa en varios sectores como: en la aeronáutica, aeroespacial, medicina, militar, nuclear, etc. Mediante la simulación tanto los trabajadores como investigadores realizan tareas de alto riesgo y con la ventaja de que se puede repetir las veces que sea necesario. La simulación en McStas para la radiografía de neutrones permite al investigador realizar varias pruebas sin exponerse a la radiación ni a otros peligros. Una de las ventajas de usar

la simulación de McStas es el hecho de que este es gratuito y está a disposición de cualquier estudiante o investigador.

La técnica de Neutron Imaging (NI) o Imagenología neutrónica ofrece imágenes con muchas posibilidades para la evaluación no destructiva y no invasiva de objetos tanto in situ como in operando. También aprovecha las características particulares de la interacción del neutrón con la materia lo que permite aportar información única sobre la estructura microscópica del objeto (muestra), complementaria a la que se puede obtener con otras técnicas, como por ejemplo la radiografía de rayos X, las aplicaciones de la imagenología neutrónica son variadas y se extienden a múltiples áreas de la ciencia y la tecnología, como ser la paleontología, la arqueología, mecánica de fluidos, medicina, biología, entre otras; uno de ellas es la **radiografía de neutrones**, consiste en un haz de neutrones que atraviesa el objeto y se atenúa según la composición de la objeto o su forma geométrica. Si bien en este caso los neutrones interactúan con los núcleos de los átomos y no con sus electrones. A diferencia de los rayos X, sin embargo, los neutrones también se atenúan por efecto de algunos materiales ligeros, como el hidrógeno, el carbono, el boro y el litio, y penetran muchos materiales pesados,



como el titanio y el plomo. Esta característica otorga a la imagenología neutrónica una ventaja sobre la imagenología de rayos X cuando se trata de visualizaciones bidimensionales y tridimensionales [3].

Para obtener la calidad de imagen más óptima en el sistema de detección, depende mucho de la medición de la **relación de colimación** para una mayor eficiencia de detección, [4]-[5] así conocer los límites del instrumento y para la planificación estructural y dimensional.

Para conocer estos parámetros realizamos una simulación en el software mcStas aplicando el método de Montecarlo.

2. Objetivo

Realizar cálculos de la relación de colimación óptimas (L/D) para un nuevo instrumento de imágenes con neutrones generados por un reactor nuclear de investigación de 200 (kW) mediante simulaciones de Monte Carlo.

para lograr este objetivo se necesita realizar una serie de pasos:

- Esquematizar un diseño del instrumento de imágenes con neutrones.
- Realizar una revisión bibliográfica acerca del método Monte Carlo

aplicado a la radiografía de neutrones.

- Realizar una simulación de la radiografía de neutrones, enfocándose en el colimador (la relación de colimación) aplicando el Método Monte Carlo en McStas:

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

En una primera instancia se necesita ilustrar de manera breve el método Monte Carlo, como una herramienta independiente, luego indicaremos el software McStas y como esta funciona con esta estrategia de simulación, para ello necesitamos simplemente una computadora o laptop (convencional) con un sistema operativo mayor a windows 10 de 64bits y tener instalado de python.

3.2 Método

Previamente se debe conocer el principio de funcionamiento, componentes y parámetros de la radiografía de neutrones.

3.2.1 Principios de funcionamiento

La radiografía de neutrones convencional normalmente está basada en una fuente continua, con transmisión de haces colimados de neutrones tanto fríos y/o térmicos, que atraviesan el objeto y la detección del haz atenuado es en la

posición del detector, la intensidad de transmisión obedece la ley de Beer Lambert que establece que para una energía de neutrones dada, la relación entre la intensidad transmitida y la inicial es una función exponencial del espesor multiplicado por el coeficiente de atenuación de el objeto.

$$I = I_0 e^{-\Sigma z}$$

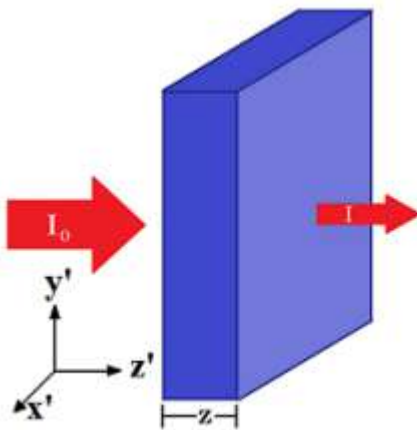


figura 1: Representación esquemática de la Ley de Beer Lambert

Esta ley establece que una muestra absorberá mayor radiación cuando las dimensiones del medio absorbente o material sean mayores; específicamente, su grosor, que viene a ser la distancia "z" que recorre la luz al entrar y salir.

3.2.2 Componentes y parámetros

La radiografía de neutrones está compuesta por una fuente, colimador,

objeto (muestra) y un detector de neutrones térmicos. El rango térmico posee dos ventajas, la primera es un mayor contraste en la imagen y la segunda una mayor sensibilidad de los detectores [6]

Los neutrones son generados por el proceso de fisión, el cual se encuentra en los elementos combustibles que posee el núcleo del Reactor. Los elementos combustibles son del tipo placa formados por un metal de Aluminio y Aluminio-Uranio (por ejemplo), siendo por lo tanto un reactor de los denominados MTR. A su vez, los mismos son refrigerados por agua liviana, y el núcleo posee reflectores de grafito en la periferia [7]

La resolución de la imagen está relacionada fuertemente con la **relación de colimación**; que es la divergencia del haz definida por diámetro D que es la apertura del colimador y la distancia L que es la distancia desde la apertura del colimador al objeto. La relación de colimación (L/D), es un parámetro importante ya que su valor establece el grado de colimación del haz. Se busca un valor grande sin perder la intensidad del flujo de los neutrones. El grado de colimación (L/D) incide directamente en la resolución espacial intrínseca que es posible lograr. Los valores L/D oscilan entre 50 y 550 en varios países de Europa [8]

Por otra parte, esa resolución dependerá en buena parte de la distancia entre el objeto y el detector. Si esa distancia es l , la resolución espacial intrínseca d estaría dada por:

$$d = \frac{l}{L/D}$$

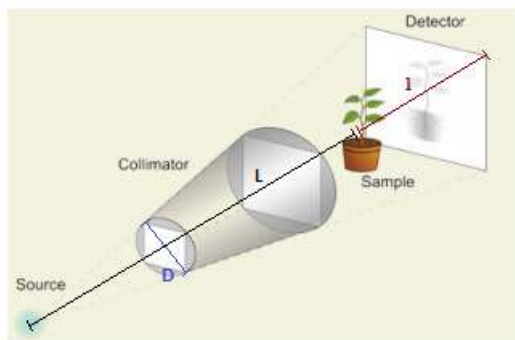


figura 2: El principio del sistema de radiografía: con sus componentes y parámetros

3.2.1 McStas

El nombre completo del software es *McStas - Monte Carlo simulation of neutron instruments* o también llamado *McStas - A neutron ray-trace simulation package*, *el cual* es una herramienta general para simular instrumentos y experimentos de dispersión de neutrones.

Una simulación semiclásica totalmente realista requerirá que cada neutrón está presente o perdido en cualquier momento, es por eso que se introduce el concepto de **“factor de peso”** del neutrón (neutrón weight) para cada rayo de neutrón

simulado. Si, por ejemplo, la reflectividad de un determinado componente óptico es del 10%, y solo los rayos de neutrones reflejados se consideran más adelante en las simulaciones, el peso del neutrón se multiplicará por 0,10 al pasar este componente.

Sea p_0 el peso inicial del neutrón y denotemos el factor de multiplicación del peso en la j -ésima componente por π_j . El factor de peso resultante para el rayo de neutrones después del paso de los n componentes en el instrumento de neutrones se convierte en el producto de todas las contribuciones.

$$p = p_n = p_0 \prod_{j=1}^n \pi_j$$

Donde el factor de de contribución debe ser $0 < \pi_j < 1$, por lo tanto el factor de peso solo disminuye, excepto en algunos casos muy especiales este aumenta.

En el caso si el rayo de neutrones alcanza el detector, en la práctica p puede ser inferior a 1. el uso del muestreo de importancia describiendo sólo el haz reflejado no descuidará la influencia física de la absorción, ya que aseguramos la conservación de la intensidad, es decir, $p = p' + p''$ donde p'' Es la intensidad del haz no reflejado (que en este ejemplo no transportamos).

La simulación por ajuste de peso se realiza siempre que sea posible. Esto incluye:

- Transmisión a través de filtros y ventanas.
- Transmisión a través de colimadores de pala Soller y selectores de velocidad (en la aproximación que no tiene en cuenta cada pala).
- Reflexión de cristales de monocromador (y analizador) con reflectividad finita
- Reflexión de las paredes guía.
- Paso de un haz continuo a través de un chopper.
- Dispersión de todo tipo de muestras.

3.3 Precisión de la simulación

Cuando se ejecuta un Monte Carlo, las cantidades significativas se obtienen integrando eventos aleatorios en un solo valor (por ejemplo, flujo) o en una cuadrícula de histograma. La teoría muestra que la precisión de estas estimaciones es una función de la dimensión del espacio "d" y el número de eventos N. Para números grandes N, el teorema del límite central proporciona una estimación del error relativo como $1/\sqrt{N}$. Sin embargo, la expresión exacta depende de las distribuciones aleatorias.

Pruebas	Precision
10^3	10%
10^4	2.5%
10^5	1%
10^6	0.25%
10^7	0.05%

Tabla 1: Estimación de la precisión en función del número de eventos estadísticos utilizados para estimar una integral con McStas.

4. Resultados y discusión

La simulación se basa en el modelo de Reactor Triga Puspati (RTP) que pertenece a la agencia nuclear de Malasia por utilizar la potencia similar al primer reactor boliviano. Primero tenemos una fuente, luego el colimador donde se modifican los parámetros D y L para la intensidad propia de nuestra fuente, por ejemplo si la proyección de nuestro objeto en el detector tiene una forma cuadrada, como resultado la intensidad (cantidad de neutrones colimados) en función de la longitud de onda (Energía inversamente proporcionalmente a la longitud de onda)

para diferentes valores de intensidad presenta las siguientes gráficas:

1. Para $N = 1 * 10^6$ rayos de neutrones

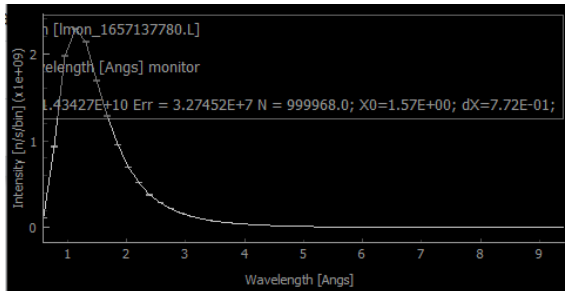


Figura 1: Intensidad en función de la longitud de onda

2. Para $N = 1 * 10^7$ rayos de neutrones

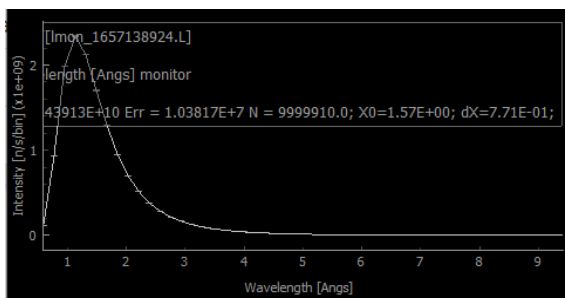


Figura 2: Intensidad en función de la longitud de onda

3. Para N rayos de neutrones
 $N = 1 * 10^7$

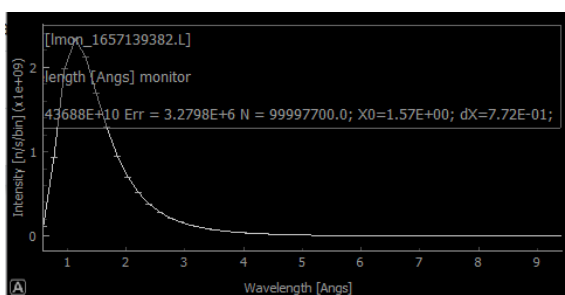


Figura 3: Intensidad en función de la energía

Analizando la gráfica los neutrones generalmente se encuentran en el rango de $0,6 \leq \lambda \leq 2,8 [Angs]$ lo cual corresponde a un espectro de energía de neutrones térmicos, la longitud de onda de los neutrones térmicos es:

$$\lambda = (0,9 - 2,6) [Angs]$$

lo cual nos indica que el resultado es el esperado para una fuente continua, y es el buscado ya que buscamos trabajar con neutrones térmicos que son más fáciles de obtener en la práctica.

5. Conclusiones

La modelación de las relaciones de colimación se encuentra todavía evolucionando se requieren variar las relaciones L/D y luego compararlas de modo que se pueda elegir lo más conveniente.

Una de las grandes ventajas que tiene esta investigación es el costo de inversión. La simulación Monte Carlo diseñada específicamente para este tipo de investigación en el software McStas es gratuita y un programa abierto; resuelve el problema de realizar los experimentos en un reactor nuclear, que implica posibles



situaciones de riesgo. Debido a la gratuidad del software, se abre el camino a los futuros estudiantes bolivianos para que puedan profundizar en investigaciones similares para poder desarrollar la tecnología nuclear en nuestro país.

Hasta el momento, se ha logrado la traducción bibliográfica de los manuales del software McStas y su instalación a disposición de la comunidad latinoamericana.

6. Bibliografía

[1] Agencia Boliviana de Energía Nuclear
<https://aben.gob.bo/index.php>

[2] Ritch, B. (1999). Energía nuclear y ecología puntos de vista sobre la ciencia, la diplomacia y los átomos para la paz. Boletín del OIEA.

[3] Organismo Internacional de Energía Atómica
<https://www.iaea.org/es/temas/imagenologia-a-neutronica>

[4] Lehmann, Pleinert, Wiezel (1996), Design of a neutron radiography facility at the spallation source SINQ, Nuclear instruments & methods in physics Research, Vol. A 377, pp 11-15.

[5] Garbe, Randall, Hughes, The new neutron radiography tomography imaging

station DINGO at OPAL, Nuclear Instruments & methods in physics research, Vol. A-651, pp. 42-26, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.nima.2011.02.017>.

[6] Peirone, M; Coleff, A; Sanchez, F; Chiaraviglio, N; DISEÑO DE LA FACILIDAD DE RADIOGRAFÍA DE NEUTRONES EN PILETA PARA EL REACTOR RA-10, pp 2

[7] Federico Andres Mezio Guanes, Caracterización y optimización de la facilidad de Radiografía con Neutrones On-Line del Reactor RA-6 - Proyecto Integrador de la Carrera de Ingeniería Nuclear, pp 8

[8] E.H. Lehmann - Facilities for Neutron Radiography in Europe: Performance, Applications and future Use - <http://www.ndt.net/article/wcndt00/papers/idn801/idn801.htm>

Revalorización de residuos de biomasa en la síntesis de novedosos
agentes potencialmente bioactivos: estudio teórico-experimental



C.25. Ciencia, tecnología e innovación

Revalorización de residuos de biomasa en la síntesis de novedosos agentes potencialmente bioactivos: estudio teórico-experimental

Autor: Cicetti, Soledad; cicetti@iquir-conicet.gov.ar

Profesor/a guía: Sarotti, Ariel M.; sarotti@iquir-conicet.gov.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

La situación ambiental actual exige cambios en las metodologías de producción. Buscando la sostenibilidad se han investigado nuevas materias primas quirales para el desarrollo de compuestos químicos con potencial farmacológico. Un importante ejemplo es la transformación de biomasa, fuente abundante y renovable, en productos de alto valor agregado, entre los que destaca levoglucosenona (**1**), una cetona bicíclica enantioméricamente pura obtenida de la pirólisis de material celulósico. Esta resulta una estructura privilegiada por las interesantes actividades biológicas que presentan algunos de sus derivados, como ser análogos con una promisoriosa propiedad antitumoral ligada al restablecimiento de la función de p53, proteína que actúa como un eficiente supresor tumoral. En nuestro grupo se sintetizaron derivados triazólicos isoxazólicos de **1** con prometedora actividad anticancerígena.

Actualmente en el grupo se estudian metodologías para la síntesis simple y eficiente de heterociclos relacionados mediante cicloadición 1,3-dipolar que permite la generación estereo y regio controlada a través del acoplamiento [3+2] entre un dipolo y un dipolarófilo.

Hasta el momento, se han sintetizado cuatro derivados isoxazolidínicos de **1** mediante procedimientos de no más de dos etapas, empleando materiales de partida con variada estructura y estabilidad que permitan establecer relaciones de reactividad entre las nitronas intermediarias. En simultáneo, se realizaron estudios computacionales buscando comprender los patrones de reactividad observados y elucidar los productos obtenidos, registrando en algunos casos mezcla de diastereoisómeros.

Palabras clave: biomasa, levoglucosenona, anticancerígenos.

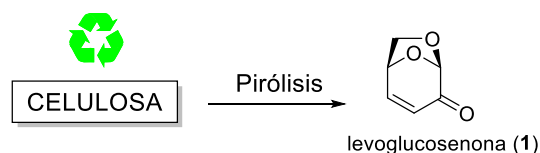
Introducción

Tormentas de arena en Rusia, inundaciones en Alemania, sequías en el Mercosur, pandemias de escala global. Cada día son más cercanas y tangibles las abrumadoras consecuencias de la destrucción de la naturaleza y el cambio climático generados por la actividad humana desmedida y desinteresada (Jia & Shevliakova, 2019). Hoy más que nunca se vuelve fundamental para nuestra subsistencia y la del planeta tomar conciencia de forma masiva y promover el desarrollo sostenible tanto a nivel académico como industrial.

Una de las mayores preocupaciones en torno a esta temática a escala global es la disponibilidad de fuentes renovables de carbono, para así dejar de lado el petróleo y los demás combustibles fósiles. La biomasa se presenta en este punto como una alternativa prometedora, empleada como biocombustible y precursor de compuestos químicos con alto valor agregado.

En el grupo de trabajo ya se encuentran en estudio la cáscara de soja, la fibra algodonosa de palo borracho y otros materiales ricos en celulosa como fuente de hidratos de carbono, componente mayoritario de la biomasa. Este biopolímero, por un simple proceso de pirólisis, puede convertirse en una gran

variedad de compuestos químicos entre los que destaca levoglucosenona (1), Esquema 1. Esta cetona bicíclica obtenida de forma enantioméricamente pura cuenta con un sistema carbonílico α,β -insaturado, ideal para un gran número de reacciones de síntesis orgánica. Además, el puente 1,6-anhidro fija la conformación de la molécula y aporta estereoselectividad en las modificaciones realizadas sobre la enona. Su privilegiada estructura la vuelve de gran interés como sintón quiral, motivo por el cual ya ha sido empleada como precursor para la preparación de prometores herbicidas, auxiliares y organocatalizadores quirales, complejos intermediarios clave ópticamente activos y diversos compuestos con potencial farmacológico, además de ser utilizada como solvente verde alternativo (Henzell,, Furneaux & Tyler, 1990; Comba, et al., 2018; Sarotti, Spanevello, Suárez, Echeverría & Piro, 2012).



Esquema 1. Obtención de levoglucosenona.

Haciendo hincapié por un momento en el campo de la medicina, es de público conocimiento la lucha que tiene lugar en todo el mundo con el fin de desarrollar nuevas y mejores terapias para combatir el

cáncer. Uno de los enfoques más estudiados en esta área propone el desarrollo de pequeñas moléculas orgánicas con la capacidad de restituir de forma localizada los mecanismos propios del organismo humano que pueden eliminar la neoplasia, pero que fueron dañados por mutaciones, perdiendo así su función (Bykov, et al., 2002).

Siguiendo esta línea de estudio, se han desarrollado derivados de **1** que demostraron tener prometedora actividad anticancerígena afectando distintos mecanismos biológicos de control de proliferación celular, como los que se muestran en la Figura 1 (I-III) (Müller, et al., 2009). Además, **1** ha sido empleada en la preparación de potenciales agentes farmacológicos con variadas actividades, como los compuestos sintetizados en el grupo de trabajo que resultaron ser promisorios agentes antituberculosos (IV-V).

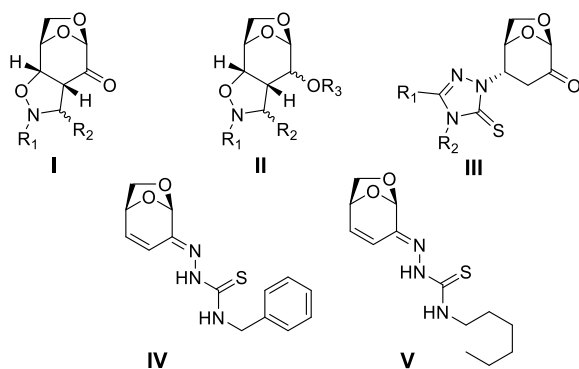


Figura 1. Derivados de **1** potencialmente biactivos.

Con base en estos antecedentes, en el grupo de trabajo se sintetizaron hasta el momento más de 80 derivados heterocíclicos de levoglucosenona obteniendo satisfactorios resultados. Tanto en las familias de análogos triazólicos como isoxazólicos se han hallado productos con alta actividad antitumoral en las líneas celulares ensayadas (Tsai, et al., 2018; Tsai, et al., 2020). En la Figura 2 se muestran ejemplos de las estructuras más activas, algunas de las cuales presentaron incluso alta selectividad frente a las células cancerosas.

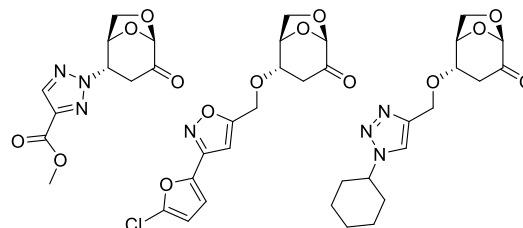


Figura 2. Estructuras de algunos de los triazoles e isoxazoles más activos.

Objetivos

Considerando lo expuesto hasta el momento, en el presente trabajo de investigación se propuso por objetivo el aprovechamiento de un desecho agroindustrial generado en cuantiosas proporciones en Argentina, como lo es la cáscara de soja. Mediante la pirólisis, esta fuente de biomasa residual se transformará en levoglucosenona, valioso sintón que será posteriormente empleado en la generación de estructuras moleculares



más complejas con potencial actividad anticancerígena, como ser isoxazolidinas derivadas de **1**. Así, se propone brindar una alternativa sustentable, económica y ambientalmente benigna para la revalorización de residuos mediante la generación de compuestos químicos de alto valor agregado.

Materiales y métodos

Todos los reactivos químicos empleados fueron adquiridos de fuentes comerciales, por lo que se han empleado sin purificación previa, a no ser que se indique lo contrario.

Las soluciones fueron evaporadas a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio, seguida de bomba de vacío, para eliminar el resto de solvente remanente.

El avance de las reacciones fue monitoreado mediante cromatografía en capa delgada (CCD) y los productos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna.

La estructura de los compuestos obtenidos fue elucidada a través de los datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, HMBC, e IR.

Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance II a 300 MHz para RMN de ^1H y a 75 MHz para RMN de ^{13}C .

Las mediciones se realizaron con la muestra disuelta en CDCl_3 .

Los espectros de IR se realizaron en un espectrómetro Shimadzu Prestige 21. Las muestras sólidas se midieron como dispersiones en pastillas de KBr. Los aceites se determinaron formando una delgada película soportada en pastilla de NaCl.

La caracterización de cada producto se completó con la medición de su poder rotatorio y la determinación de su punto de fusión (en caso de tratarse de un compuesto sólido a temperatura ambiente).

Los poderes rotatorios $[\alpha]_D$ fueron determinados a la longitud de la línea D del sodio (589 nm) empleando un fotopolarímetro electrónico marca Jasco modelo DIP-1000.

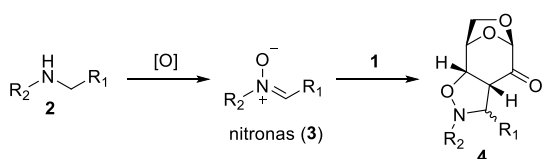
Los puntos de fusión fueron determinados en un microscopio con platina calefactora marca Ernst Leitz Wetzlar modelo 350.

Inicialmente se preparará el material de partida, levoglucosenona, mediante la pirólisis de material celulósico, en este caso cáscara de soja, aprovechando así un residuo agroindustrial producido en gran cantidad en nuestro país.

Luego, para la conversión de **1** en compuestos potencialmente bioactivos se

propone el estudio y desarrollo de metodologías simples y eficientes basadas en reacciones de cicloadición 1,3-dipolar, que consisten en el acoplamiento [3+2] entre un dipolo y un dipolarófilo (usualmente alquenos o alquinos) para dar lugar a un heterociclo de 5 miembros (Carey & Sundberg, 2007). Este tipo de transformación permite la generación estereo y regio controlada de una variedad de estructuras moleculares con total economía atómica, simplemente cambiando el dipolo elegido de entre la amplia diversidad existente.

Para llevar a cabo la síntesis de derivados isoxazolidinónicos de **1**, primero será necesario preparar las nitronas (**3**) por un proceso de oxidación a partir de las correspondientes aminas secundarias, para ser luego empleadas como dipolos en la reacción *click* (Esquema 2).



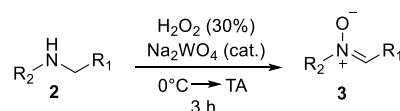
Esquema 2. Síntesis de derivados isoxazolidinónicos potencialmente bioactivos.

Resultados y discusión

Conforme a la metodología simple y eficiente desarrollada en el grupo de trabajo, se preparó **1** mediante la pirólisis de cáscara de soja pretratada con ácido fosfórico para favorecer su formación por

sobre los demás productos posibles. El crudo obtenido fue posteriormente purificado por destilación, generándose así el sustrato en cuantiosa cantidad con una pureza superior al 90%.

Previo a la preparación de los derivados de **1**, fue necesario sintetizar las nitronas que se emplearían como dipolo en las cicloadiciones 1,3-dipolares siguiendo el procedimiento reportado por Murahashi y sus colaboradores (Murahashi, Mitsui, Shiota, Tsuda & Watanabe, 1990). El mismo consiste en una sola etapa partiendo de las respectivas aminas secundarias por oxidación con solución acuosa de peróxido de hidrógeno catalizada por tungstato de sodio (Esquema 3).



Esquema 3. Obtención de nitronas por oxidación de aminas secundarias.

Debido a la alta tendencia de dimerización, estos intermediarios resultan muy inestables. Por eso se decidió preparar uno por vez para luego ser utilizado inmediatamente en la reacción *click*. Se prepararon cuatro nitronas con estructuras diversas, las cuales se muestran en la Figura 3. Las aminas de partida empleadas fueron pirrolidina (**2a**), piperidina (**2b**), *N,N*-bencilisopropilamina (**2c**) y *N,N*-dietilamina (**2d**).

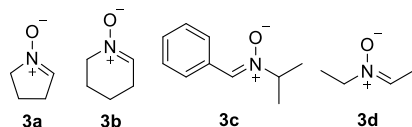
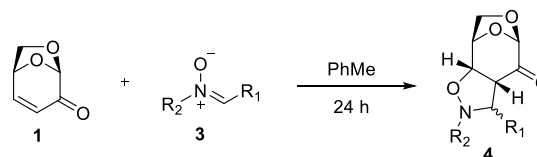


Figura 3. Estructuras de las nitronas sintetizadas.

Finalmente, se procedió con la síntesis de las isoxazolidinas por cicloadición 1,3-dipolar entre las nitronas preparadas como dipolo y **1**, cuyo doble enlace hizo las veces de dipolarófilo. Debido a la robustez de este tipo de reacciones no fue necesario purificar cada nitrona ni trabajar bajo atmósfera inerte. Las reacciones se llevaron a cabo en tolueno en condiciones térmicas (reflujo a

110 °C) con agitación durante 24 horas, Esquema 4.



Esquema 4. Preparación de los derivados isoxazolidínicos de **1**.

Se prepararon hasta el momento 4 productos, con rendimientos de moderados a muy buenos. Se observó una marcada estereoselectividad que en algunos casos condujo curiosamente a la formación exclusiva de un único derivado en forma enantioméricamente pura debido a la quiralidad del sustrato utilizado (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la síntesis de isoxazolidinas.

Compuesto	Condiciones	Rendimiento (%) ^a	Regioselectividad ^b	exo:endo ^b
4a	PhMe, TA, 4 h	60	100:0	100:0
4b		62	100:0	71:29
4c	PhMe, 110 °C, 24	85	100:0	84:16
4d	h	62	100:0	100:0

^a Calculado luego de purificación por columna cromatográfica.

^b Estimado calculado a partir de los espectros de RMN.

Ya sintetizados los compuestos, se realizó una exhaustiva elucidación espectroscópica para garantizar que se tratase de los productos deseados. Una vez confirmada la estructura por RMN, la determinación de la configuración relativa y absoluta representó un desafío debido a los *a priori* 8 posibles isómeros que podían obtenerse como producto.

Primero, se debe tener en cuenta que el ataque del dipolo hacia el dipolarófilo puede tener lugar por dos caras distintas de **1**. Sin embargo, está ampliamente demostrado que la cara β de levoglucosenona se encuentra impedida estéricamente por el puente 1,6-anhído, por lo que en principio se esperaba que se produjera el ataque de la nitrona exclusivamente por la cara α de **1**.

Además, se pueden obtener dos regioquímicas distintas, dado que el oxígeno de la nitrona podría unirse tanto al carbono 4 (regioquímica A) como a la posición 3 de **1** (regioquímica B), Figura 6a. Se logró verificar la obtención únicamente de la regioquímica A por estudios de NOE, en los que se observó interacción de H-7 únicamente con H-3, sin detectarse efecto entre H-7 y H-4 (Figura 6b). Asimismo, se evidenció por espectros de HMBC interacción entre C-7 y H-3 al mismo tiempo que se detectó correlación de C-3 con H-7 y ambos H-8, sin observarse interacción alguna entre las posiciones 7 y 4.

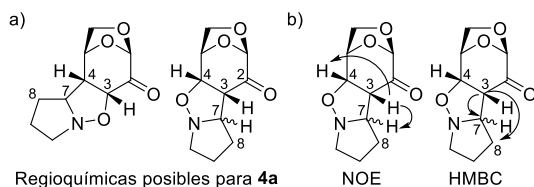


Figura 6. Asignación de la regioquímica obtenida para los productos **4**.

Por último, surgen otros dos escenarios posibles al considerar que el dipolo, atacando por la cara α y con la regioquímica ya establecida, puede aún generar dos configuraciones diferentes: la forma *exo* y la *endo*. Uno de los isómeros se obtuvo de forma mayoritaria. Sin embargo, resultó más que interesante observar que en algunos casos solo se detectaba un único producto. Si bien se trata de diastereoisómeros, no se logró

determinar de forma irrefutable la estereoquímica solamente aplicando técnicas espectroscópicas, como consecuencia de la superposición de señales clave.

Se realizaron para tal fin, cálculos computacionales a nivel DFT de los posibles productos para obtener sus valores de desplazamiento en RMN y emplearlos luego junto con la probabilidad DP4+, una útil herramienta desarrollada en el grupo de trabajo, para la asignación de los diastereoisómeros sintetizados. Siguiendo con el procedimiento sugerido (Grimblat, Zanardi & Sarotti, 2015), se comenzó realizando exhaustivas búsquedas conformacionales de cada isómero para cada uno de los productos en estudio a nivel MM+. En un siguiente paso, las conformaciones resultantes fueron reoptimizadas al nivel B3LYP/6-31G*. Luego se seleccionaron los confórmeros dentro de una ventana energética de 5 kcal/mol para cada caso, para realizar finalmente el cálculo tensorial a nivel PCM/mPW1PW91/6-31+G**, empleando como solvente cloroformo. Por último, los desplazamientos calculados junto con los experimentales se analizaron con la ayuda de DP4+, concluyendo que el isómero mayoritario en todos los casos era el producto con estereoquímica *exo*, Figura 7 Inicialmente, este procedimiento se llevó a

cabo con los 8 posibles isómeros de **4a** y **4b**. Como los resultados obtenidos en ambos casos fueron consistentes con el

análisis espectroscópico realizado, para **4c** y **4d** únicamente se modelaron los posibles diastereoisómeros *exo* y *endo*.

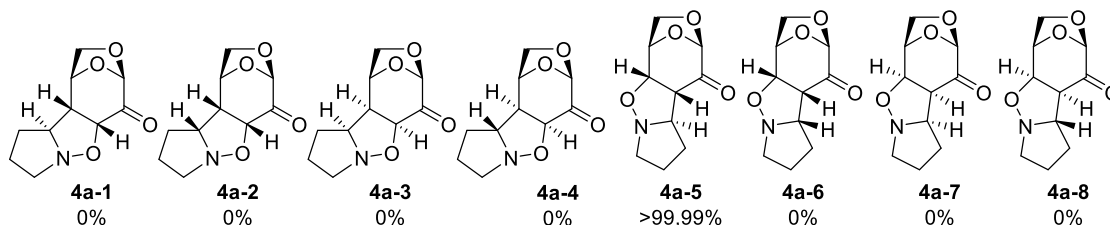


Figura 7. Probabilidades DP4+ calculadas para cada isómero posible para **4a**.

Por otro lado, se pudo constatar a lo largo del proceso de síntesis que las nitronas cíclicas resultaron más reactivas que sus contrapartes de cadena abierta. Tal era la diferencia de reactividad que en esos casos la reacción se completaba a temperatura ambiente en algunas horas (Tabla 1). Por el contrario, al intentar realizar la reacción empleando **3c** sin calentamiento, se observó una reactividad extremadamente baja, ya que luego de dos semanas de continua agitación a penas se convertía poco más de la mitad del sustrato. Es posible que la resonancia del grupo nitrona con el anillo aromático esté influyendo en la estabilidad del dipolo.

En un intento por comprender más profundamente los patrones tanto de reactividad como de selectividad de las nitronas utilizadas, se optó por un estudio de cinética de las cicloadiciones 1,3-dipolares llevadas a cabo. Se trabajó a temperatura ambiente, con tolueno como solvente de reacción y empleando una

relación 1:3 entre el sustrato y el dipolo, respectivamente.

Los datos recopilados se emplearon luego para obtener la constante de velocidad asociada (k) por regresión lineal. Según la literatura consultada, este tipo de reacciones suelen ocurrir con una cinética de segundo orden dependiente de las concentraciones de ambos reactivos (Huisgen, 1963). La fórmula empleada fue:

$$\ln\left(\frac{L^\circ \cdot N}{N^\circ \cdot L}\right) = k(N^\circ - L^\circ)t$$

en la cual N y L son las concentraciones al tiempo t de reacción de la nitrona y levoglucosenona, respectivamente. Por su parte, N° y L° son las correspondientes concentraciones iniciales ($t = 0$). Las concentraciones de cada reactivo se estimaron de forma relativa por RMN ^1H y teniendo en cuenta el volumen de solvente agregado en cada caso.

Luego de llevar a cabo las experiencias y realizar los cálculos

pertinentes, se lograron obtener los valores de k dispuestos en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de los estudios de cinética.

Nitrona	k	h	R^2
3a	0,058	-0,016	0,993
3b	0,274	0,018	0,999
3c	0,005	0,002	0,998
3d	0,010	0,009	0,999

La diferencia de reactividad entre las nitronas acíclicas y cíclicas salta a la vista, siendo estas últimas las más reactivas. Además, se evidencian distintas velocidades tanto entre **3a** y **3b**, como entre **3c** y **3d**, en total concordancia con las observaciones experimentales. Buscando una justificación teórica para las marcadas diferencias encontradas, se realizaron cálculos computacionales de los estados

de transición en cuestión y las energías asociadas, observándose interesantes correlaciones con la reactividad y la selectividad obtenidas de forma empírica.

De forma análoga a los posibles productos, se modelaron las estructuras de reactivos y estados de transición a nivel B3LYP/6-31G* y se seleccionaron los confórmeros más estables para el armado de los perfiles de reacción correspondientes. Los valores de energía de activación (E_a) calculados en base a la energía libre de Gibbs, al igual que ΔG en relación a productos, se muestran en la Tabla 3 a continuación para cada compuesto sintetizado. Los subíndices *exo* y *endo* hacen referencia a los isómeros **4x-5** y **4x-6**, respectivamente, siendo $x = \{a, b, c, d\}$ según el caso.

Tabla 3. Valores de energía (kcal/mol) calculados al nivel B3LYP/6-31G* junto con los datos de selectividad y reactividad experimentales.

Compuesto	$E_{a_{endo}}$	$E_{a_{exo}}$	ΔE_a	ΔG_{endo}	ΔG_{exo}	<i>exo:endo</i>	k
4a	22,11	21,34	0,77	-4,80	-4,75	100:0	0,058
4b	21,96	21,53	0,43	-6,18	-8,75	71:29	0,274
4c	32,64	31,37	1,27	5,69	1,37	84:16	0,005
4d	26,97	25,46	1,51	-2,41	-5,62	100:0	0,010

Analizando primeramente los valores de ΔG y E_a se puede apreciar que el isómero *exo* obtenido como producto mayoritario resulta estar favorecido tanto termodinámica como cinéticamente en casi la totalidad de

casos. Por otro lado, comparando las E_a calculadas, es sencillo notar que para las nitronas cíclicas se obtuvieron valores de menor magnitud en contraste con los valores de las nitronas acíclicas, evidenciándose una diferencia de

reactividad que repercutirá en última instancia en las velocidades de reacción. Esto coincide con la diferencia del valor de k obtenido de forma experimental para **3a** con **3c** y **3d**. Sin embargo, resulta interesante destacar que las E_a calculadas para la formación de **4a** y **4b** presentan diferencias menores en comparación con los valores de k hallados, que difieren en un orden de magnitud.

Con respecto a la diastereoselectividad de la reacción, si realizamos una distinción entre dipolos cíclicos y acíclicos, puede verse que en los casos en los que se genera un único producto, la diferencia de E_a entre el estado de transición para la formación del isómero *exo* y el *endo*, resulta mayor aproximadamente por 0,25 kcal/mol. Sin embargo, puede que dicha diferencia de energía no sea lo suficientemente significativa para explicar la marcada selectividad entre ambos productos posibles.

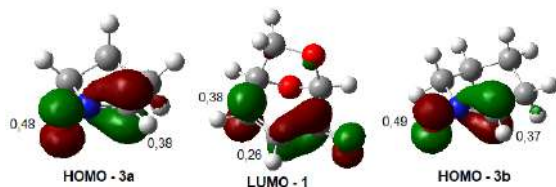


Figura 9. Orbitales moleculares frontera junto con sus coeficientes para los átomos relevantes.

En simultáneo, se llevaron a cabo cálculos de Orbitales Moleculares para comprobar y justificar la

regioquímica determinada espectroscópicamente. Analizando los valores de energía de los orbitales frontera de cada reactivo es posible afirmar que la reacción ocurre con demanda electrónica directa, resultando de la interacción del HOMO del dipolarico en electrones con el LUMO de levoglucosenona. Se visualizaron luego los orbitales moleculares junto con los coeficientes para cada átomo que forma parte de un nuevo enlace. Se identificó al oxígeno de la nitrona como el átomo más nucleofílico que se une a C-4 de **1**, que resultó ser el átomo más electrofílico del dipolarófilo. corroborando inequívocamente la regioquímica A evidenciada por espectroscopía (Figura 9).

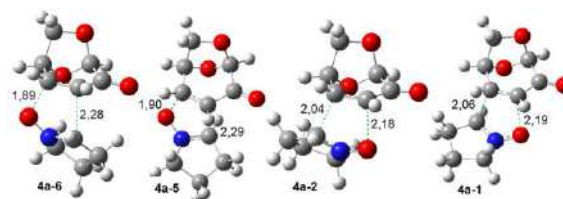


Figura 10. Estructuras de transición modeladas, junto con sus distancias de enlace (Å).

También se realizaron cálculos de NBO sobre las estructuras de transición mostradas en la Figura 10 mediante los cuales se establecieron los índices de Wiberg, que dan cuenta de que tan rotos o formados se encuentran los enlaces en el estado de transición y, por lo tanto, aportan información valiosa sobre la asincronicidad del proceso,

teniendo en consideración que la reacción ocurre de forma concertada (Huisgen, 1963).

Al comparar los índices de ambos enlaces en formación (O-C4/3 y C-C3/4), no se observaron marcadas diferencias entre ambas regioquímicas. Sin embargo, al analizar a su vez las distancias de dichos enlaces en cada estructura de transición, puede observarse claramente que en los estados asociados a la regioquímica A determinada experimentalmente (ET 4a-5 y ET 4a-6), se evidencia una asincronicidad mayor que la calculada para la regioquímica B (ET 4a-1 y ET 4a-2), Tabla 4. Esto podría deberse a que la formación del nuevo enlace O-C4 se encuentra favorecido en el primer caso por tratarse de una unión entre el centro más nucleofílico del dipolo con el átomo más electrofílico de **1**, identificados previamente por cálculo de orbitales moleculares.

Tabla 4. Valores de distancias para las estructuras de transición de los isómeros de **4a** (Å).

Regio- química	Isómero	Enlace formado		Δ Distancia
		O-	C-	
		C4/3	C3/4	
A	ET 4a-5	1,90	2,29	0,39
	ET 4a-6	1,85	2,28	0,43
B	ET 4a-1	2,19	2,06	0,13
	ET 4a-2	2,18	2,04	0,14

Es posible que dicha interacción estabilizante sea la causante de la obtención de una única regioquímica.

Además, se calcularon los estados de transición para la regioquímica alternativa tomando como ejemplo los isómeros del producto **4a**, considerando el ataque del dipolo exclusivamente por la cara α de **1**. Los valores encontrados de E_a , calculados a partir de la energía libre de Gibbs al nivel de teoría B3LYP/6-31G*, resultaron mucho mayores (al menos 5 kcal/mol) que los hallados para los análogos generados con la regioquímica efectivamente obtenida (Tabla 5). De esta forma, quedaría ampliamente verificada la estructura de los productos aislados.

Tabla 5. Valores de E_a (kcal/mol) calculados para cada regioquímica posible de **4a**.

Isómero	Regioquímica A		Regioquímica B	
	E_{aendo}	E_{aexo}	E_{aendo}	E_{aexo}
4a	22,11	21,34	27,19	26,70

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y discutidos en el presente trabajo, es posible reconocer a levoglucosenona como un útil y versátil sustrato para la síntesis de compuestos orgánicos quirales con un alto potencial farmacológico.



Asimismo, se logró preparar un conjunto de compuestos por reacción de **1** con nitronas estructuralmente diversas para su posterior estudio biológico con el objetivo de hallar estructuras con considerable actividad antitumoral (**4a-d**).

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio en mayor profundidad sobre las cuestiones intrínsecas asociadas a la variación de reactividad y selectividad evidenciada experimentalmente durante las reacciones de **1** con diferentes nitronas. En este punto, resultaron clave los cálculos computacionales realizados para visualizar y comprender tanto los perfiles y energías de reacción, como la estereo y regioselectividad observadas.

Referencias Bibliográficas

Bykov, V. J. N.; Issaeva, N.; Shilov, A.; Hultcrantz, M.; Pugacheva, E.; Chumakov, P.; Bergman, J.; Wiman, K. G. & Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.*, 8, 282–288. doi: 10.1038/nm0302-282

Carey, F. A. & Sundberg, R. J. (2007). *Advanced Organic Chemistry - Part B: Reaction and synthesis*. Nueva York, Estados

Unidos:Springer

Science+Business Media, LLC.

Comba, M. B.; Tsai, Y.; Sarotti, A. M.; Mangione, M. I.; Suárez, A. G. & Spanevello, R. A. (2018). Levoglucosenone and Its New Applications: Valorization of Cellulose Residues. *Eur. J. Org. Chem.*, 2018 (5), 590-604. doi: 10.1002/ejoc.201701227

Grimblat, N., Zanardi, M. M. & Sarotti, A. M. (2015). Beyond DP4: An Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. *J. Org. Chem.*, 80 (24), 12526–12534. doi: 10.1021/acs.joc.5b02396

Henzell, R. F.; Furneaux, R. H. & Tyler, P. C. (1990). An Evaluation of the Herbicidal and Plant Growth Regulatory Activity of a Novel Class of Carbohydrate-derived 6,8-Dioxabicyclo[3.2.1]octanes. *Pestic. Sci.*, 30, 59-66. doi: 10.1002/ps.2780300107

Huisgen, R. (1963). Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. internat. Ed.*, 2 (11), 633–696. doi: 10.1002/anie.196306331



- Jia, G. & Shevliakova, E. (2019). Land-Climate Interactions. *United Nations' Intergovernmental Panel on Climate Change's (IPCC) Special Report on Climate Change and Land (SRCCL)*. doi:10.1007/bf00047107
- Müller, C.; Gomez-Zurita Frau, M. A.; Ballinari, D.; Colombo, S.; Bitto, A.; Martegani, E.; Airoidi, C.; van Neuren, A. S.; Stein, M.; Weiser, J.; Battistini, C. & Peri, F. (2009). Design, synthesis, and biological evaluation of levoglucosenone-derived ras activation inhibitors. *Chem. Med. Chem.*, 4, 524–528. doi: 10.1002/cmdc.200800416
- Murahashi, S.; Mitsui, H.; Shiota, T.; Tsuda, T. & Watanabe, S. (1990). Tungstate-Catalyzed Oxidation of Secondary Amines to Nitrones. Alfa-Substitution of Secondary Amines via Nitrones. *J. Heterocycl. Chem*, 55 (6), 1736–1744.
- Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G.; Echeverría, G. A. & Piro, O. E. (2012). 1,3-Dipolar cycloaddition reactions of azomethine ylides with a cellulose-derived chiral enone. A novel route for organocatalysts development. *Org. Lett.* 14, 2556–2559. doi: 10.1021/ol3008588
- Tsai, Y. H; Borini Etichetti, C. M.; Di Benedetto, C.; Girardini, J. E.; Terra Martins, F.; Spanevello, R.; Suárez, A. G. & Sarotti, A. M. (2018). Synthesis of triazole derivatives of levoglucosenone as promising anticancer agents: Effective exploration of the chemical space through retro-za-michael//aza-michael isomerizations. *J. Org. Chem.*, 83 (7), 3516–3528. doi: 10.1021/acs.joc.7b03141
- Tsai, Y.; Borini Etichetti, C. M.; Cicetti, S.; Girardini, J. E.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. & Sarotti, A. M. (2020). Design, synthesis and evaluation of novel levoglucosenone derivatives as promising anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 30 (14), 127247. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127247

Financiamiento

UNR (BIO 500 y 600), ANPCyT (PICT-2019-4052) y CONICET (PIP 11220200102205CO; PUE 0068/2017).

Agradecimientos

CONICET – UNR – ANPCyT.

Sistema biaxial de seguimiento solar autónomo



C.25.Ciencias, tecnología e innovación

Sistema biaxial de seguimiento solar autónomo

Autor: Galeano Alonso, Marcos Abel; email: marclonso03@gmail.com , Ferreira González,

Yessica Cesarina; email: yesicesa20@gmail.com

Profesor/a guía: Kang, Daisy; email: kangdaisy@fpune.edu.py

Facultad Politécnica, Universidad Nacional del Este

Resumen

Este trabajo propone un método de seguimiento solar en dos ejes para la obtención de la mayor cantidad de irradiación. El objetivo del sistema es posicionar paneles fotovoltaicos en forma perpendicular a los rayos del sol mediante la implementación de la unión en cascada de los algoritmos de seguimiento de máxima potencia y el control predictivo. El algoritmo de seguimiento desarrollado fue simulado en un software computacional y fue instalado en un prototipo de seguidor solar construido para verificar su comportamiento en un entorno real. En las pruebas realizadas con el prototipo, se logró el seguimiento del sol en ambos ejes y un aumento en la captación de irradiación del 30%, comparado con la de un panel estático colocado en el lugar de las pruebas.

Palabras claves: Seguimiento solar, Irradiación, Algoritmos de control

I. Introducción

La energía solar es una fuente de energía renovable, que se encuentra en auge en los últimos años por tratarse de un recurso respetuoso con el medio ambiente (PTI, 2014) Este recurso es especialmente interesante en Paraguay, pues según Grassi (2020), es el país que mayor

radiación solar recibe por la posición mediterránea que adopta, principalmente en la región Occidental o Chaco. La cantidad de radiación solar incidente en el país es alta, en verano llega a 8 horas por día en promedio y en invierno a 5 horas (PTI,2016).

Además, la idea de que Paraguay pueda utilizar energía solar para convertirla en electricidad utilizando paneles fotovoltaicos



se vuelve aún más importante, teniendo en cuenta que en el país existen zonas alejadas de la red eléctrica.

Sin embargo, para lograr un aprovechamiento eficiente de la radiación solar en la generación fotovoltaica, es necesario que los rayos solares incidan perpendicularmente sobre la superficie de los paneles.

. En este contexto, una de las alternativas utilizadas para mejorar la eficiencia de los paneles solares es el seguimiento solar.

Teniendo en cuenta estos datos, se ha decidido construir un sistema biaxial de seguimiento solar autónomo, desarrollando un sistema de control conectados en cascada, y un prototipo mecánico de tamaño real teniendo en cuenta que el movimiento se realiza en el eje vertical y horizontal lo cual permiten un movimiento más completo de los paneles solares y de esa manera un mayor aprovechamiento de las incidencias de los rayos del sol.

II. Objetivos

1. Objetivo General

Desarrollar prototipo seguidor solar para paneles fotovoltaicos aplicando técnicas

de software más eficientes.

2. Objetivos Específicos

- Identificar los componentes de hardware y software necesario para la construcción del prototipo.
- Desarrollar el mecanismo de control del seguidor.
- Diseñar la estructura física del prototipo.
- Construir la estructura física del prototipo.
- Realizar un solarímetro casero.
- Comparar el rendimiento entre un prototipo estático y autónomo.

III. Materiales y Métodos

Los materiales utilizados para el desarrollo del prototipo se pueden dividir en dos partes, *Hardware* y *Software*.

Las herramientas hardware utilizadas son:

- Estructura mecánica, Controlador MPPT, Paneles solares Optimus Prime 150-36M, Microcontrolador ESP- WROOM-32, Giroscopio, Sensor de corriente, Celdas solares, Solarímetro casero, Motores lineales,

Controlador de motor Sabertooth,
Sensor WCS2702.

Las herramientas software utilizadas son:

SketchUp 3D, Matlab 2019Ra, Arduino IDE, Entorno de diseño, Fritzing.

El trabajo se desarrolló en módulos como se observa en la Figura 1.

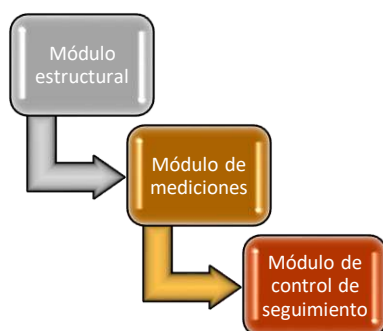


Figura 1 - Módulos desarrollados.

1. Módulo estructural

Consiste en el desarrollo de la estructura del prototipo que cumpla con las características del movimiento solar. Se dividió en dos etapas: Diseño 3D y construcción del prototipo. El diseño 3D de la estructura del seguidor se realizó utilizando el software SketchUp como se observa en la en la (Figura 2) teniendo en cuenta los requisitos establecidos, como: Movimiento en dos ejes, Capacidad para soportar fenómenos

naturales y Capacidad de soportar las cargas generadas por los elementos que lo conforman.

Cabe resaltar que la parte más importante en este diseño fue el mecanismo desarrollado para los movimientos en ambos ejes y la ubicación de los motores eléctricos que realizan los movimientos de latitud y longitud de los paneles.



Figura 2 - Diseño 3D de la estructura mecánica.

2. Módulo de mediciones

En este módulo se realizó la construcción de un medidor de irradiancia solar casero con una celda solar como sensor para

poder obtener la cantidad de irradiancia que reciben los paneles solares, también contienen los distintos sensores electrónicos como: el

ESP32 WROOM, MPU-6050 Giroscopio, Tiny RTC DS1307, Módulo MicroSD, que se utilizaron para medir la tensión, corriente e inclinación.

3. Módulo de control de seguimiento

- **Control de seguimiento del punto de máxima potencia (MPPT)**

El control de seguimiento solar desarrollado implementó el algoritmo Perturbar y Observar del Seguimiento de punto de máxima potencia (MPPT) (Ruiz, Sosa, 2010). Recibe como entrada las variables de corriente y tensión, generando como salida la tensión máxima, el bloque de perturbar y observar como se observa en la (Figura 3) contiene las líneas de código del algoritmo utilizado.

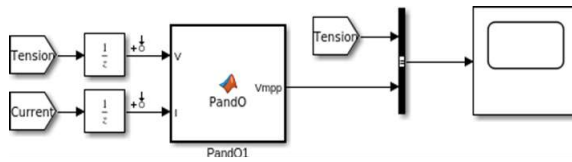


Figura 3 - Esquema Perturbar y Observar en Simulink.

A continuación en la Figura 4 y en la Figura 5 se muestra las líneas de código del algoritmo perturbar y observar:

```
delta = 0.0001; % initialize
for i = 1:size(V,1)
    Power(i) = V(i) .* I(i);
    dV = V(i) - Vold;
    dI = I(i) - Iold;
    dP = Power(i) - Pold;

    if dP ~= 0
        if dP < 0
            if dV < 0
                Vmpp = V(i) + delta;
            else
                Vmpp = V(i) - delta;
            end
        else
            if dV < 0
                Vmpp = V(i) - delta;
            else
                Vmpp = V(i) + delta;
            end
        end
    else
        Vmpp = V(i);
        P = Power(i);
    end
end
```

Figura 4 - Líneas de código Perturbar y Observar.

```
break
end
Vold = V(i);
Iold = I(i);
Pold = V(i) .* I(i);
end
end
```

Figura 5 - Líneas de código Perturbar y Observar.

- **Control Predictivo**

Para el desarrollo del controlador predictivo se utilizó el algoritmo basado en modelo (MPC) (Sendoya, 2013), es importante obtener el diseño de la planta, por lo tanto: Primeramente, se obtuvo el modelo de la planta como un requisito principal previo a la simulación del MPC. En el caso de este trabajo se utilizó perturbar y observar como el modelo de la planta. Luego de eso se realizó el diseño del controlador MPC, para

ello, en el Workspace de Matlab se escribió el comando mpc-Designer el cual permitió acceder al Toolbox de control predictivo MPC de Matlab. Se definió la estructura del MPC, una vez definida se linealizó el modelo definido, realizado la linealización se pudo observar el comportamiento que tendrá el sistema tanto en la entrada como en la salida en la Figura 6.

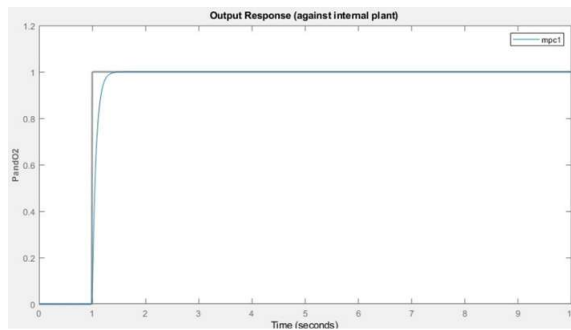


Figura 6 - MPC Designer.

Luego se procedió a parametrizar el controlador de acuerdo a los requerimientos del prototipo. Para la verificación de los parámetros del diseño, se utilizó la herramienta Review Design, donde se puede evidenciar cualquier advertencia o error que se presente en la compilación del controlador.

Posteriormente se desarrolló el controlador general con ambos algoritmos de perturbar y observar y MPC, donde el

controlador MPC recibe como referencia de entrada la tensión, y genera como salida un valor junto a la irradiancia que ingresa al perturbar y observar teniendo como salida la tensión máxima que vuelve a ingresar al MPC formando así un lazo cerrado (véase Figura 7).

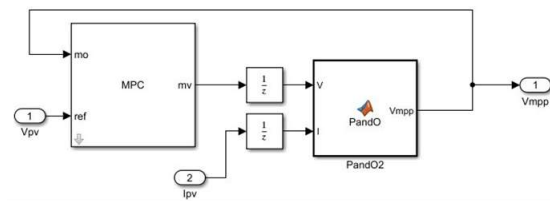


Figura 7 - Estructura de control MPC en Simulink.

Generación de código

Al término de cada uno de los puntos se realizó la conversión del subsistema a código editable de C++, utilizando la herramienta convertidor de código de Matlab. Dicho código se editó y ajustó en el IDE de arduino, se agregaron las librerías y se realizaron configuraciones que puedan brindar compatibilidad entre el entorno y la tarjeta. Algunas de las librerías principales utilizadas son las que se citan a continuación:

- esp32, RTCLib, EspSoftwareSerial, SabertoothSimplified, Adafruit mpu6050, SD.h

IV. Integración del Sistema

En la Figura 8 se presenta un Diagrama de flujo del seguimiento, donde se observa el funcionamiento del sistema del seguimiento.

Para el control predictivo la entrada de referencia es la irradiancia captada por el solarímetro de fabricación propia. Esta es utilizada para el cálculo de control y posteriormente el resultado del cálculo sirve como entrada al proceso y al modelo. En ambos bloques se realiza una aproximación teniendo en cuenta el valor de referencia de entrada, la diferencia entre el bloque de proceso y modelo da el error de aproximación al punto de referencia.

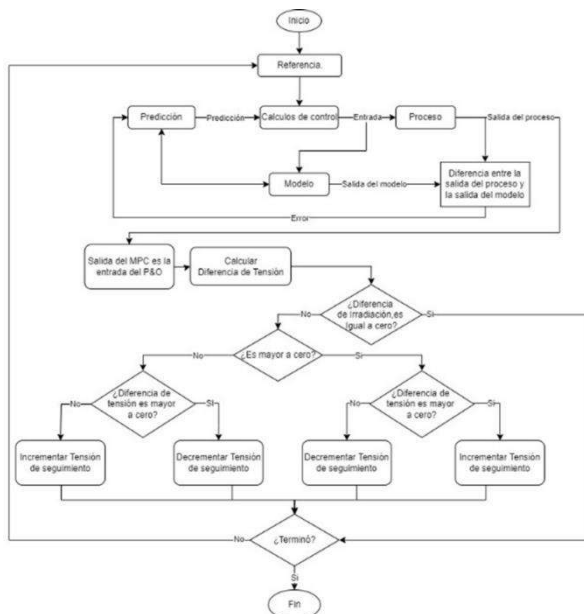


Figura 8 - Diagrama de flujo lógico del seguimiento.

El cual es utilizado en el bloque de predicción para su posterior ajuste, y así poder reducir entre el valor estimado y la referencia de entrada, la salida del proceso es utilizada como la entrada del controlador perturbador y observar el cual busca el valor máximo de los valores estimados por el controlador predictivo para así obtener el punto máximo de trabajo en el cual la irradiancia recibida sea el más alto, tanto como la tensión de los paneles. De esa manera realizan el trabajo en conjunto ambos controladores.

Sobre los métodos de control utilizando los algoritmos MPPT (Punto de máxima potencia) y el control predictivo los cuales son los algoritmos implementados. Como se observa en la Figura 9 el circuito de control posibilita

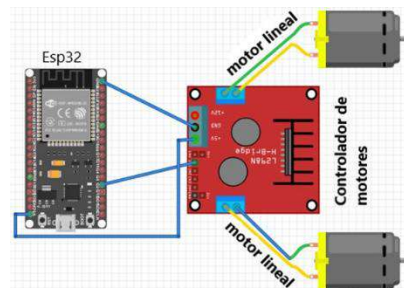


Figura 9 - Diagrama de conexiones entre el microcontrolador y el sensor de corriente.

el movimiento de los motores según los datos de entrada que recibe del solarímetro casero. Los componentes necesarios son las siguientes: ESP32 WROOM, Controlador de Motor Sabertooth, Motores Lineales.

Circuito de conexión del controlador y los motores

V. Resultados

1. Módulo estructural

En la siguiente Figura 10 se puede observar los datos de irradiación captados por el solarímetro de fabricación propia que se van guardando cada 2 minutos aproximadamente.

```

COM9
|
|
0.050 A 334 W/m2
0.053 A 353 W/m2
0.050 A 336 W/m2
written to SD Card Successfully !
0.050 A 331 W/m2
0.046 A 309 W/m2
0.036 A 242 W/m2
written to SD Card Successfully !
0.040 A 264 W/m2
0.042 A 281 W/m2
0.048 A 323 W/m2

```

Figura 10 - Medidor de Irradiancia, Micro SD y el módulo RTC.

Se destaca que el solarímetro casero contiene dentro todos los componentes

tanto del módulo de mediciones como del módulo de seguimiento, entre ellos están los sensores de corriente, tensión, inclinación, Módulo RTC, el microcontrolador esp32, y por fuera sobre la caja se encuentra la celda solar que se utiliza para medir la irradiación como se muestra en la Figura 11.

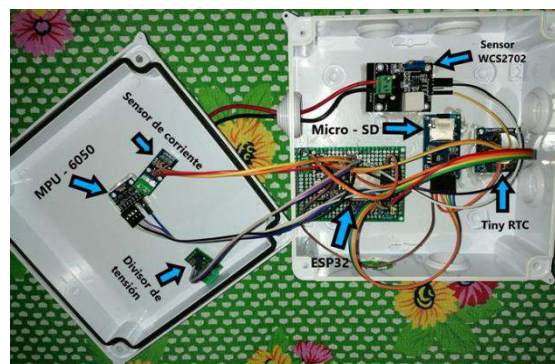


Figura 11 - Solarímetro de fabricación propia.

2. Módulo estructural

En la Figura 12 se observa el prototipo mecánico final con todos los componentes utilizados y con el solarímetro casero que hace parte del módulo de mediciones sujetado a la estructura mecánica para el funcionamiento en conjunto.



Figura 12 - Prototipo mecánico Final.

3. Módulo de control de seguimiento

En la simulación del perturbar y observar en conjunto con el esquema de configuración del panel, se observa que el algoritmo cumple con la función requerida que es realizar el seguimiento del punto de máxima potencia como se observa en la Figura 13.

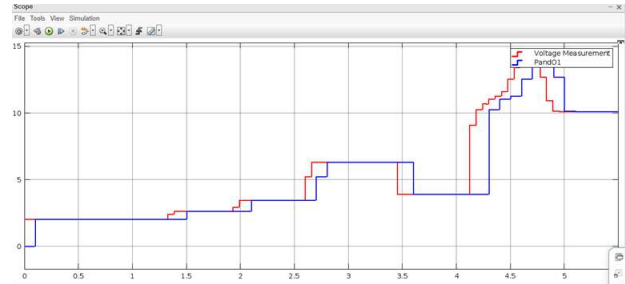


Figura 13 - Resultado de la simulación en Simulink.

En la Figura 14 se muestra los resultados de la medición de tensión que esta representada por la línea roja, y el seguimiento del sistema de control (MPPT , MPC) por la línea azul. Como se puede observar la respuesta del seguimiento es de forma casi inmediata.

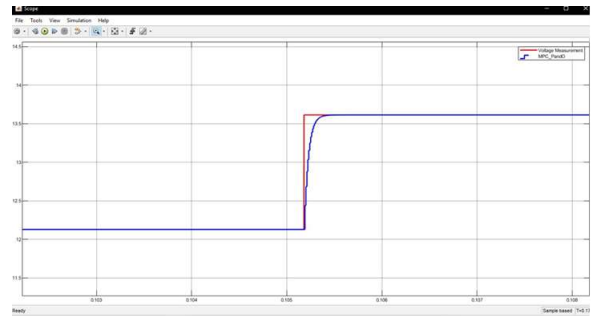


Figura 14 - Señal generada para simular el control de seguimiento en Simulink

Las pruebas fueron hechas en la ciudad de Minga Guazú, en un día soleado con un total de 7hs con 30 minutos de trabajo, desde las 09:00 hs hasta las 15:30 hora de Paraguay. Como Paraguay es un país que se encuentra en el hemisferio sur los

paneles solares fotovoltaicos estáticos están ubicadas sobre el tejado de la casa con dirección al Norte, con un ángulo de elevación de $23,5^{\circ}$. Como se observa en la Figura 15 el prototipo mecánico del seguidor solar está ubicada en la misma zona que los paneles solares fotovoltaicos.



Figura 15 - Prototipo dinámico y estático

Los gráficos de los resultados reflejan la cantidad de irradiación recibida en base al tiempo, como se observa en la figura 16 el sistema de seguimiento solar captó mayor cantidad de irradiancia que el sistema estático durante las horas de trabajo que ambos tuvieron. En el día de la realización de las pruebas el horario del punto medio del sol con respecto al horizonte era de las

11:30 hs, por lo tanto, se puede observar que ambos adquirieron más irradiancia en ese horario cercano, pero con el resultado de que el sistema de seguimiento obtuvo una mayor cantidad de irradiación en ese instante de tiempo ya que es un prototipo desarrollado para que este en búsqueda constante del sol.

Se observa la comparación de la irradiancia recibida figura 16 y la comparación de irradiancia acumulada figura 17 entre el sistema autónomo y el estático, donde se puede apreciar la diferencia del sistema autónomo ante el estático resaltando aún más los resultados obtenidos.

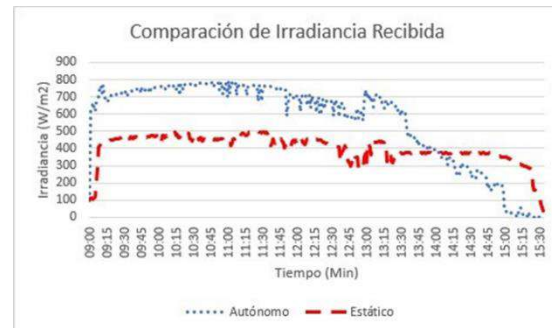


Figura 16 - Comparación de Irradiancia recibida.

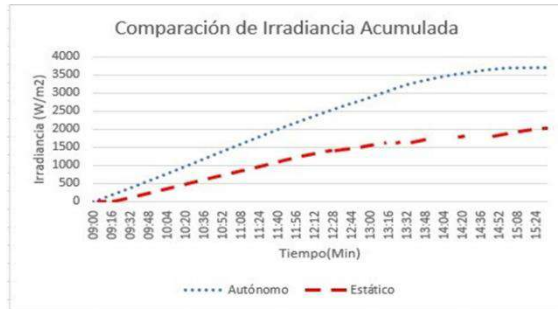


Figura 17 - Comparación de Irradiación acumulada recibida.

En la gráfica 17 se observa que el seguimiento biaxial autónomo recibió 3.7 kW de irradiación en comparación con el sistema estático que recibió 2 kW de irradiación en ese día de prueba. Evidenciando que el Sistema biaxial de seguimiento solar autónomo alcanzó un 30 % más de eficiencia que el Sistema estático en la obtención de irradiación.

VI. Conclusión

Se ha desarrollado un prototipo de seguimiento solar autónomo que es capaz de realizar movimientos en ambos ejes luego de varias investigaciones respecto a las energías renovables, a la energía solar y a distintos tipos de algoritmos. Además, se desarrolló un solarímetro de fabricación propia. El sistema de control de seguimiento fue desarrollado en base a dos algoritmos diferentes que fueron el seguimiento de punto de máxima potencia y el Control

predictivo, que primeramente fueron simulados en Simulink en el entorno de Matlab, para luego transferirlo al prototipo físico. Para la realización del prototipo a escala real se tuvo en cuenta la dimensión de los paneles solares fotovoltaicos, el rango de trabajo de los motores lineales y el movimiento que se necesitaba para el seguimiento. La utilización del microcontrolador Esp32 posibilitó tener más funcionalidades que el arduino que generalmente se utiliza, la utilización de un giroscopio y un solarímetro de fabricación propia posibilitaron la medición de la inclinación de los paneles del prototipo y la irradiación existente. En las pruebas se obtuvo resultados favorables y el seguidor ha mostrado un comportamiento correcto, que de acuerdo a los datos captados y gráficos generados se observa un mejor funcionamiento y captación de irradiación por parte del sistema biaxial de seguimiento solar autónomo que supera en un 30 % al sistema estático. Teniendo en cuenta que las pruebas fueron realizadas en un día soleado de otoño.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

VII. Referencias Bibliográficas

PTI-PY / Itaipu, Mapeo del Potencial Energético Solar y Eólico del Paraguay, 2014.

B. Grassi, *Libro - Estudio del Clima Paraguay 2019, 2020.*

I. B. PTI, Atlas del potencial energético solar y eólico del Paraguay,

2016.L. Ruiz, J. Beristáin, I. Sosa, y J. Hernández, “Estudio del algoritmo de seguimiento de punto de máxima potencia perturbar y observar,” *Revista de ingeniería eléctrica, electrónica y computación*, vol. 8, no. 1, pp. 17–23, 2010.

D. F. Sendoya, “¿qué es el control predictivo y hacia dónde se proyecta?”

Publicaciones e Investigación, vol. 7, pp. 53–59, 2013.

Software para la obtención de la resistencia del suelo basado en los datos proporcionados por el Standard Penetration Test (SPT)



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"
7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

C.25. Ciencia, tecnología e innovación

Software para la obtención de la resistencia del suelo basado en los datos proporcionados por el Standard Penetration Test (SPT)

Autor: Velázquez Rojas, María Marcela; marcela.velazquez@fiuni.edu.py

Profesor guía: Lischuk Barán, Ivan Alejandro; ivan.lischuk@fiuni.edu.py

Facultad de Ingeniería

Universidad Nacional de Itapúa

Resumen

En las últimas décadas, la tecnología se convirtió en una herramienta indispensable para un profesional de cualquier área, los ingenieros civiles no están exentos de esto, siendo ampliamente beneficiados en todos sus campos de aplicación. En el país actualmente se considera que los softwares o herramientas enfocados al área geotécnica no son utilizados, ya sea por desconocimiento de su existencia o porque simplemente no satisfacen las necesidades de los ensayos de suelo realizados.

El software mmvrSPT se proyectó con el fin de cubrir la escasez de las aplicaciones destinadas al área geotécnica, específicamente a herramientas relacionadas con ensayos específicos, como por ejemplo el ensayo SPT, para ello, inicialmente se comprobó cuál es el proceso de cálculo más preciso que brinde una resistencia de suelo aproximada para los tipos de suelos dominantes en el área de la ciudad de Encarnación, pudiéndose extender el uso del software a terrenos donde el ensayo sea aplicable y brinde información certera.

Para la validación del software se tuvo en cuenta el algoritmo generado minuciosamente mediante el estudio del cálculo manual y los ensayos que respalden la veracidad de los resultados expulsados, concluyéndose así que el software funciona para conocer la resistencia del suelo de estratos donde sea aplicable el ensayo.

Palabras clave: Geotecnia, ensayo SPT, software, algoritmo, resistencia de suelo.



Introducción

Actualmente la tecnología es una herramienta que se abre paso en todas las profesiones, siendo la ingeniería civil una de las más beneficiadas con esto, ya que extensos procesos de cálculo son reducidos en tiempo y trabajo, lo cual es sinónimo de ganancia, pero existe un déficit dentro de la rama geotécnica, la cual no cuenta con softwares que sean aplicables a ensayos geotécnicos específicos o directamente no son accesibles para los profesionales ingenieros o las empresas del área.

El SPT es uno de los ensayos más utilizados cuando se quiere conocer la resistencia que posee un suelo, si bien se denomina estándar y es aplicable para todo tipo de suelos engloba variables que posterior al ensayo deben ser analizadas según cada caso de manera independiente, por ello se puede afirmar que no es un ensayo que nos brinde información sobre la resistencia del suelo de forma inmediata. Actualmente, en el país se busca disminuir el tiempo empleado en el análisis posterior al ensayo y para ello se utilizan métodos menos complejos en cuanto a cálculo, los cuales se aproximan a la resistencia de suelo existente pero muchas veces carecen de precisión lo que, además de representar un riesgo para el profesional constructor,

puede desencadenar en errores que van desde asentamientos hasta fallas en las estructuras debidas a causas inherentes a la capacidad resistente del suelo para los fines que se establece en el proyecto estructural, y estos posteriormente repercuten directa o indirectamente en manifestaciones patológicas de origen a los problemas de fundaciones (Das, 2001).

Objetivo General

Desarrollar un software que estime la resistencia del suelo a partir de los datos proporcionados por el Standard Penetration Test (SPT).

Objetivos Específicos

- Determinar las variables involucradas dentro de la determinación manual de la resistencia del suelo a partir de los datos brindados por el ensayo SPT.
- Diseñar el software con la codificación necesaria dentro del programa Visual Studio 2019 para la estimación de la resistencia del suelo.
- Validar la funcionalidad del software mediante cartas geotécnicas de la ciudad de Encarnación.

Materiales y Métodos

Microsoft Visual Studio es un entorno de desarrollo integrado (IDE), creado por la compañía de Microsoft y disponible para sistemas operativos de



Windows, Linux y macOS, y a la vez compatible con múltiples lenguajes de programación, tales como C++, C#, Visual Basic .NET, F#, Java, Python, Ruby y PHP, es una aplicación informática que proporciona servicios integrales que facilitan al programador la creación del software, permitiendo desarrollar aplicaciones y sitios web.

Un IDE es un programa con numerosas propiedades que se pueden usar para diversos aspectos del desarrollo de software, en particular Visual Studio incluye características que van más allá del editor estándar y el depurador que proporcionan la mayoría de IDE, incluyendo compiladores, herramientas de finalización de código, diseñadores gráficos y otras varias para facilitar el proceso de desarrollo de software.

El lenguaje de programación utilizado para el desarrollo del software fue Visual Basic (VB), las aplicaciones creadas con este lenguaje están basadas en objetos y son manejadas por eventos, donde la ejecución no sigue una ruta predefinida, sino que se ejecutan diferentes secciones de código en respuesta a los eventos que se desencadenan por acciones del usuario, en este caso, dependerá de cada dato introducido por el usuario el paso a seguir dentro de la ruta de código, teniendo en cuenta que a su vez

la ruta será diferente para cada vez que se ejecute el programa (Rodríguez Bucarely, 2008), lo cual actúa en concordancia con la individualidad de cada estudio de suelo SPT realizado.

Se utilizó esta aplicación para diseñar el software mmvrSPT, realizando la codificación de principio a fin dentro del mismo, en lo concerniente a las validaciones, se realizaron dentro de mmvrSPT dependiente de Visual Studio.

El procedimiento total se dividió en tres etapas, las cuales se detallan a continuación:

1era etapa: Revisión bibliográfica. Se recopiló toda la información necesaria para el cálculo manual de la resistencia de suelo en los distintos tipos de perfiles que puedan presentarse, partiendo de la fórmula de la ecuación del número de penetración estándar corregido para condiciones de campo (Eq. 1), aplicable para todo tipo de suelos. Luego se dedujeron las fórmulas aplicables de manera directa, presentadas en la Tabla 1, partiendo de las fórmulas de las ecuaciones de correcciones con sus factores y valores estándares (Eq. 2 a Eq. 7), para suelos granulares, y las ecuaciones de resistencia de corte no drenada (Eq. 8 y Eq. 9), para suelos cohesivos.

$$N_{60} = \frac{N * \eta_H * \eta_B * \eta_S * \eta_R}{60} \quad (1)$$

Tabla 1. Fórmulas para hallar la resistencia del suelo.

Tipo de suelo	Fórmulas para hallar su resistencia
Granulares	$\sigma = 97.8121 + \sqrt[0.5]{\frac{127.7}{N_{60}}}$
Cohesivos	$\sigma = 58 * (N_{60})^{0.72}$

$$(N_1)_{60} = C_N * N_{60} \quad (2)$$

$$C_N = \left[\frac{1}{\left(\frac{\sigma'_0}{p_a} \right)} \right]^{0.5} \quad (3)$$

$$D_r (\%) = 1.55(N_1)_{60} + 40 \quad (4)$$

[para $0 \leq (N_1)_{60} \leq 25$]

$$D_r (\%) = 0.84(N_1)_{60} + 58.8 \quad (5)$$

[para $25 \leq (N_1)_{60} \leq 50$]

$$(N_1)_{60} = (N_1 + 12.9) \left(\frac{98}{\sigma'_0} \right)^{0.5} \quad (6)$$

$$\phi' = \sqrt{20 * (N_1)_{60}} + 20 \quad (7)$$

$$c_u = \frac{\sigma_1}{2} = \frac{q_u}{2} \quad (8)$$

$$c_u = 29 * N_{60}^{0.72} \quad (9)$$

Para el caso de que se presente napa freática, se dedujo que es viable la utilización directa de la fórmula dada en la ecuación de esfuerzo efectivo (Eq. 10), considerándose que si existe filtración de agua ya los datos de cualquier estudio de suelo realizado se verían alterados.

$$\begin{aligned} \sigma' &= [H * \gamma_w + (H_A - H)\gamma_{sat}] - H_A \\ * \gamma_w &= (H_A - H)(\gamma_{sat} - \gamma_w) \\ &= \text{altura de la columna de suelo} \\ * \gamma' & \end{aligned} \quad (10)$$

Tabla 2. Variaciones para ecuación del número de penetración estándar corregido para condiciones de campo.

1. Variación de η_B			
País	Tipo de martillo	Lanzamiento del martillo	η_B (%)
Japón	Anillos	Caída libre	78
	Anillos	Cuerda y polea	67
Estados Unidos	Seguridad	Cuerda y polea	60
	Anillos	Cuerda y polea	45
Argentina	Anillos	Cuerda y polea	45
China	Anillos	Cuerda y polea	60
	Anillos	Cuerda y polea	50

2. Variación de η_D	
Diámetro (mm)	η_D
60-120	1
150	1.05
200	1.15

3. Variación de η_L	
Variable	η_L
Muestreo estándar	1.0
Con revestimiento para arena densa y arcilla	0.8
Con revestimiento para arena suelta	0.9

4. Variación de η_R	
Longitud de la varilla (m)	η_R
>10	1.0
6-10	0.95
4-6	0.85
0-4	0.75

Para la aplicación de la ecuación del número de penetración estándar corregido para condiciones de campo, se filtraron los valores de la Tabla 2 de la siguiente manera:



- Para η_H :

Se estableció que el país es Argentina, por ser el de ubicación más cercana a Paraguay y, por ende, se consideraron el tipo de martillo de anillos y el lanzamiento del mismo con cuerda y polea, lo cual deriva en el valor de η_H (%) = 45.

- Para η_B :

Se estimó que el diámetro estaría siempre oscilando entre los 60 y 120 mm, en base a los datos descriptos en la norma NBR 6484:2001, y con ello, el valor de η_B = 1.

- Para η_S y η_R :

Para ambos valores de corrección se dedujo que no puede estandarizarse más de lo presentado en la Tabla 2, por lo tanto, se consideran que son valores dependientes de las condiciones dadas en el ensayo SPT, dependiendo así η_S del equipo utilizado y η_R de la profundidad a la cual se presente el rechazo.

2da etapa: Diseño de software. En base a la primera etapa, además de los datos numéricos recopilados, se normalizó la siguiente información como datos iniciales de entrada, proveídas por el usuario del software:

- Obra.
- Ubicación.

- Fecha inicial y fecha final del sondeo realizado.
- Cantidad de sondeos realizados.
- Las personas que realizaron el ensayo, dividiéndose en encargado y operador.

Para la siguiente fase de inserción de datos, primeramente, se limitó la cantidad de sondeos posibles a 2 como mínimo y de 5 como máximo, y luego se consideró que la información solicitada para cada uno de los sondeos será:

- Número de sondeo.
- Diámetro de perforación.
- Método de perforación.
- Cota.
- Profundidad de cada muestra.
- Presencia de napa freática y su profundidad.
- Descripción tacto visual de cada muestra.
- Número de golpes por muestra.
- Tipo de equipo utilizado en el ensayo, con o sin revestimiento.

Por otro lado, para la clasificación de cada estrato de suelo, se utilizó la clasificación SUCS, donde utilizando la Tabla 3, se concluye que según el porcentaje retenido en el tamiz N° 200, ingresado por el usuario entre los datos de cada sondeo y obtenido de la muestra llevada al laboratorio, el programa decidirá la utilización de las



fórmulas de la Tabla 1 de la siguiente manera:

- Más de 50 % de suelo retenido en el tamiz N° 200 → $\sigma = 97.8121 +$

$$0.5 \sqrt{\frac{127.7}{N_{60}}}$$

- Menos o 50% de suelo retenido en el tamiz N° 200 → $\sigma = 58 * (N_{60})^{0.72}$

Tabla 3. Sistema unificado de clasificación de suelos (basado en el material que pasa por el tamiz núm. 75).

Criterio para la asignación de símbolos de grupo			Símbolos de grupo	
Gravas	Gravas limpias	$C_u \leq 4 \text{ y } 1 \leq C_c \leq 3^1$		GW
Más de 50% de fracción de fracción	Menos de 5% finas ²	$C_u < 4 \text{ o } 1 > C_c > 3^1$		GP
Suelos de grano grueso: grava retenida en el tamiz núm. 4	Gravas con finas	$PI < 4$ o gráficos por debajo de línea "A" (figura 4.2)		GM
Más de 50% retenido en el tamiz núm. 200	Más de 12% finas ²	$PI > 7$ y gráficos en o por encima de línea "A" (figura 4.2)		GC
Arenas	Arenas limpias	$C_u \leq 6 \text{ y } 1 \leq C_c \leq 3^1$		SW
50% o más de la fracción gruesa pasa tamiz núm. 4	Menos de 5% finas ²	$C_u < 6 \text{ o } 1 > C_c > 3^1$		SP
	Arenas con finas	$PI < 4$ o gráficos por debajo de línea "A" (figura 4.2)		SM
	Más de 12% finas ²	$PI > 7$ y gráficos en o por encima de línea "A" (figura 4.2)		SC
	Limos y arcillas	$PI > 7$ y gráficos en o por encima de línea "A" (figura 4.2) ³		CL
Limite líquido	Orgánico	$PI < 4$ o gráficos por debajo de línea "A" (figura 4.2) ³		ML
Menos que 50		Limite líquido: seco < 0.75; sea la figura 4.2; zona OL		OL
Suelos de grano fino: 50% o más pasa a través del tamiz núm. 200		Limite líquido: no seco		
	Limos y arcillas	Gráficos PI en o por encima de línea "A" (figura 4.2)		CH
	Limite líquido	Gráficos PI por debajo de "A" (sea (figura 4.2)		MH
	50 o más	Limite líquido: seco < 0.75; sea la figura 4.2; zona OH		OH
	Limite líquido: no seco			
Suelos altamente orgánicos	Materia orgánica principalmente, color oscuro y orgánico			PT

¹Gravas con 5 a 12% de finas requieren símbolos dobles: GW-GM, GP-GC, GP-GM, GP-GC.

²Arenas con 5 a 12% de finas requieren símbolos dobles: SW-SM, SW-SC, SP-SM, SP-SC.

$C_u = \frac{D_{60}}{D_{10}}$; $C_c = \frac{(D_{30})^2}{D_{10} \times D_{60}}$

³Si $4 < PI \leq 7$ gráficos en la zona normal en la figura 4.2, se usa doble símbolo: GC-GM o SC-SM.

⁴Si $4 < PI \leq 7$ gráficos en la zona normal en la figura 4.2, se usa doble símbolo CL-ML.

Además, en caso de que exista napa freática, se vio necesario el ingreso del dato de peso unitario saturado del suelo, γ_{sat} , obtenido mediante la muestra llevada al laboratorio para el análisis de sus propiedades, ya que sin el mismo no podría utilizarse la fórmula de la ecuación de esfuerzo efectivo (Eq. 10).

Por último, se normalizó que el software generara un informe final, por sondeo, compuesto por dos secciones, con los datos presentados a continuación:

- Datos generales:

- Obra.
- Ubicación.
- Fecha inicial y fecha final del sondeo realizado.
- Encargado.
- Operador SPT.
- Número de sondeo.
- Diámetro de perforación.
- Método de perforación.
- Cota.

- Resultados del análisis, por estrato:

- Número de muestra.
- Profundidad.
- Nivel de agua, en caso de que exista.
- Descripción tacto visual.
- Gráfico de número de golpes.
- Resistencia del suelo.
- Gráfico de resistencia del suelo.

El diseño de las tres ventanas tipo form se realizó teniendo en cuenta los datos mencionados, de manera a que el diseño tenga la fluidez necesaria para ser interpretada por cualquier profesional del área, dichas ventanas se presentan en las Figuras 1, 2 y 3.



Figura 1. Ventana 1: Bienvenida.

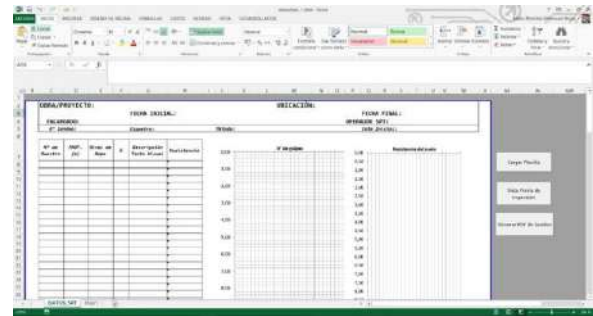


Figura 4. Planilla tipo generada para cada sondeo.

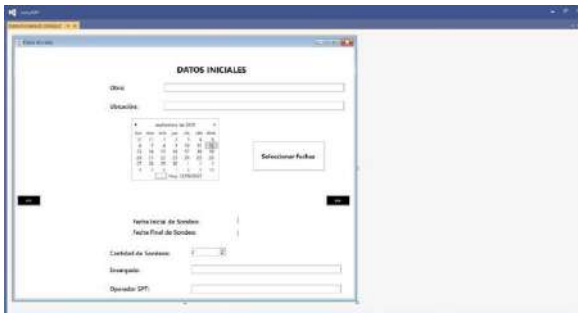


Figura 2. Ventana 2: Datos Iniciales.



Figura 3. Ventana 3: Datos del Sondeo.

Pasando mediante los botones de Sondeo N° a cada Hoja Excel donde se encuentra la planilla tipo presentada en la Figura 4, con los botones de: Cargar Planilla, el cual envía todos los datos desde el software a excel; Vista Previa de Impresión, que permite al usuario tener un preview de la hoja a imprimir y Generar PDF de Sondeo, que envía la hoja a un pdf llamado Sondeo seguido del número correspondiente para cada uno de ellos.

El algoritmo se desarrolló de la manera presentada en la Figura 5, generando así condiciones específicas dentro del programa para cada uno de los datos ingresados por el usuario del software, abarcando todos los casos posibles, ya analizados en la primera etapa.

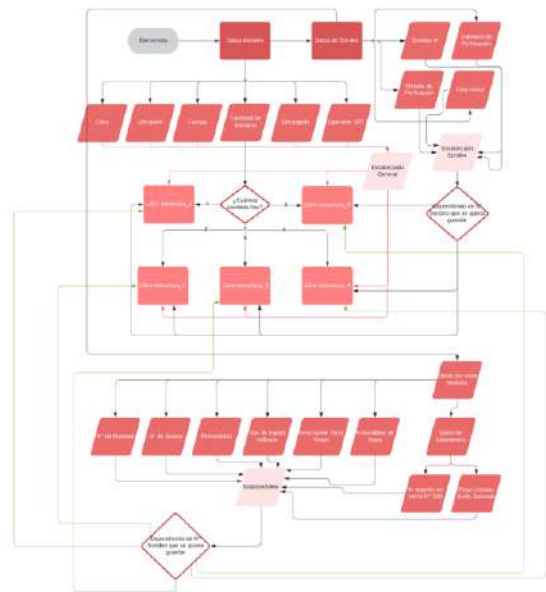


Figura 5. Algoritmo mmvrSPT.

3ra etapa: Validación de la funcionalidad del software. La misma se realizó teniendo en cuenta el algoritmo generado en la



segunda etapa, validando los siguientes puntos, con las respectivas diferentes opciones que puedan presentarse:

Si en la ventana Datos Iniciales, el usuario decide avanzar sin completar todos los datos necesarios, se presenta un MsgBox que no le permite seguir utilizando el programa, en caso de que todos los campos de Obra, Ubicación, Fechas, Encargado y Operador SPT estén completados se pasaría a la ventana Datos del Sondeo.

- Dependiendo de la cantidad de sondeos definida en la ventana Datos Iniciales, se habilitarán los Button de Sondeo N° en la ventana Datos del Sondeo.
- Si en la ventana Datos del Sondeo se tilda el CheckBox se habilitarán los TextBox para ingresar el valor de la profundidad a la cual se encuentra, en metros y el peso unitario del suelo saturado, en kg/m^3 .
- Una vez que se presione el Button de Sondeo N° 1 se abrirá el Libro Excel guardado como estructura_1, lo mismo sucederá cuando se presionen el Button correspondiente al sondeo 2, 3, 4 y 5, cambiando solo el número 1 por el respectivo indicado.
- Dentro de la hoja DATOS_SPT, ubicada dentro de cada Libro mencionado, si se presiona el botón

de Cargar Planilla, esta estará actualizando los datos correspondientes al informe del sondeo, donde la columna de resistencia cambiará sus celdas vacías solo si se logra calcular la misma con los datos proporcionados, teniéndose en cuenta aquí las fórmulas mencionadas en la primera etapa, para cada tipo de suelo y cada condición presentada.

- En cuanto a la actualización de los gráficos, estos dependerán de las columnas de número de golpes y profundidad, para el gráfico de N° de golpes, y de resistencia y profundidad para el gráfico de Resistencia del suelo.

Luego, se comparó la información generada por el software con los datos de ensayos SPT que cuentan con el respaldo de distintas empresas.

Resultados y Discusión

Una vez finalizado el software, se validaron los resultados generados por el mismo, teniendo en cuenta el cumplimiento del algoritmo y la tendencia similar de las gráficas de N° de golpes y Resistencia del suelo.

Se considera que, para todos los casos, la gráfica de N° de golpes se generó de manera idéntica y correcta.

En cuanto a los resultados de la columna de resistencia y su correspondiente gráfica, se considera que cuentan con el respaldo teórico suficiente para pasar la prueba de validación, tomando en cuenta las condiciones de campo en las que se realiza el ensayo, los parámetros del equipo utilizado para cada caso y el tipo de suelo examinado en cada muestra.

Si bien, dentro de los ensayos de suelo recaudados no se evidencia, no se puede dejar de lado que existe cierta variación en la resistencia presentada en suelos granulares, la cual radica en el enfoque que el ensayo tiene hacia la resistencia de suelos cohesivos, se consideran que los resultados son válidos por contar con el respaldo teórico de las fórmulas utilizadas.

En cuanto a los suelos cohesivos, la resistencia obtenida es válida, por lo tanto, se valida también la libre posterior utilización del software en la ciudad de Encarnación y en algunos puntos del departamento de Itapúa, teniendo en cuenta que los suelos presentados en estas regiones del país, en su mayoría, están compuestos por arcillas.

Además, ante la presencia de napa freática, se comprueba la inminente disminución de la resistencia del suelo, lo

cual en la mayoría de los casos de aproximación se pasa por alto.

Los resultados obtenidos, en formato pdf, para concluir lo mencionado anteriormente, se presentan en las siguientes figuras:

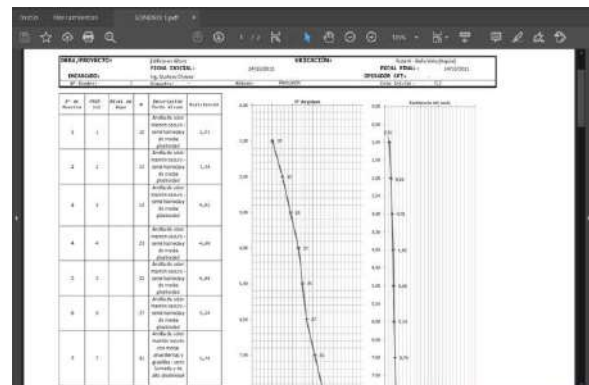


Figura 6. Estudio 1 - Sondaje 1 - Resultados, Parte 1/2.

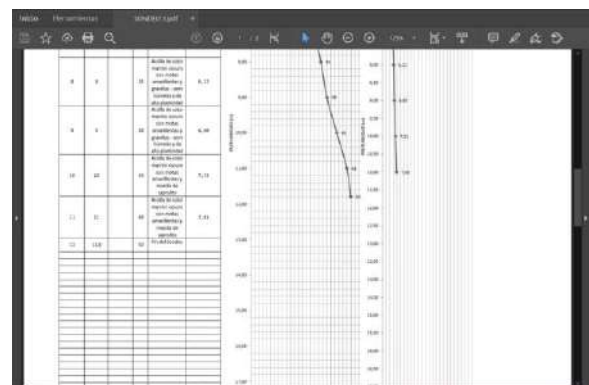


Figura 7. Estudio 1 - Sondaje 1 - Resultados, Parte 2/2.

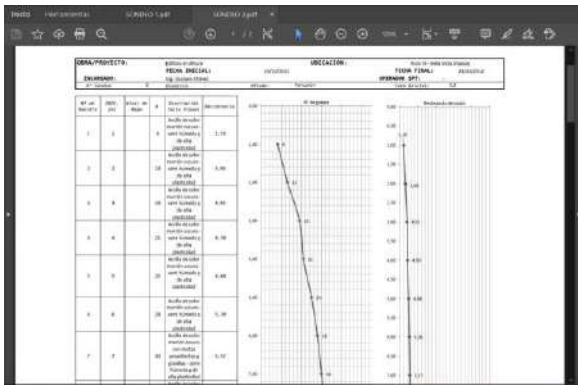


Figura 8. Estudio 1 - Sondeo 2 - Resultados, Parte 1/2.

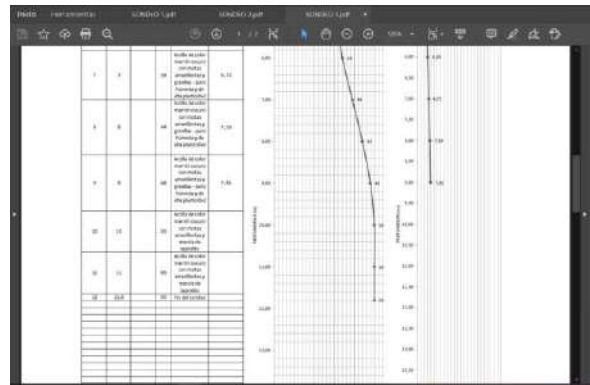


Figura 11. Estudio 1 - Sondeo 3 - Resultados, Parte 2/2.

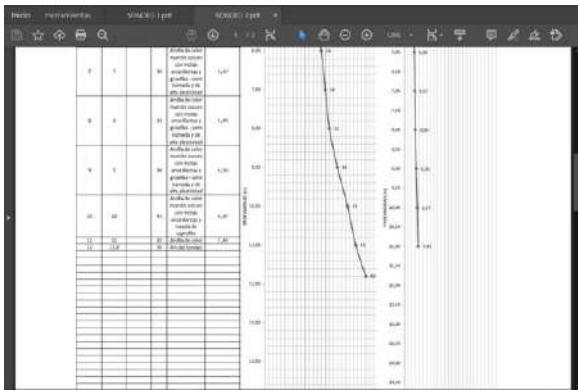


Figura 9. Estudio 1 - Sondeo 2 - Resultados, Parte 2/2.

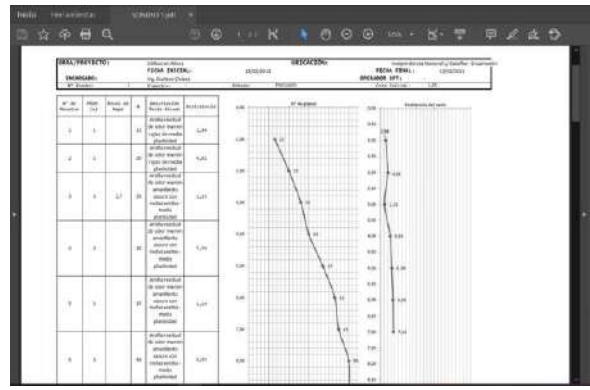


Figura 12. Estudio 2 - Sondeo 1 - Resultados, Parte 1/2.

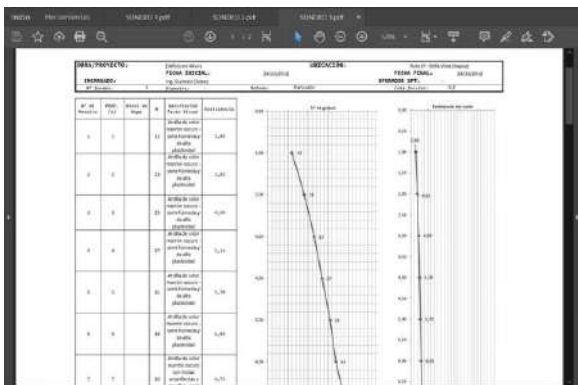


Figura 10. Estudio 1 - Sondeo 3 - Resultados, Parte 1/2.

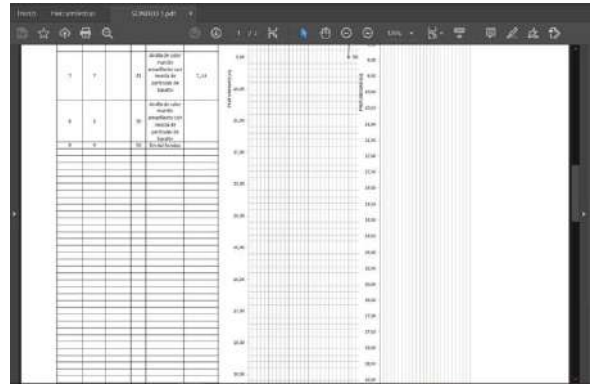


Figura 13. Estudio 2 - Sondeo 1 - Resultados, Parte 2/2.

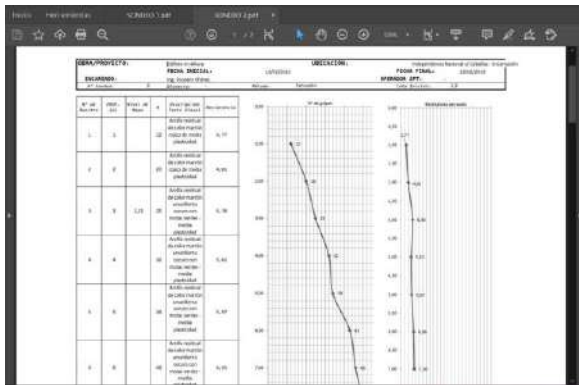


Figura 14. Estudio 2 - Sondeo 2 - Resultados, Parte 1/2.

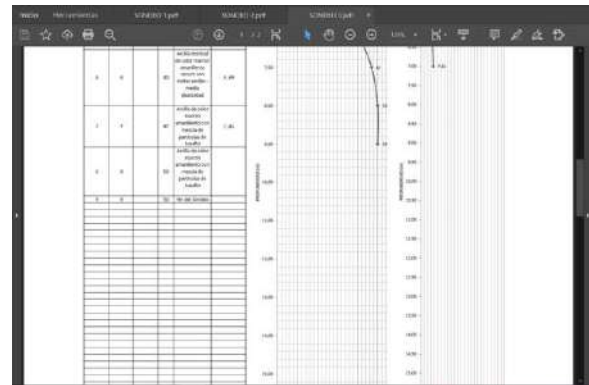


Figura 17. Estudio 2 - Sondeo 3 - Resultados, Parte 2/2.

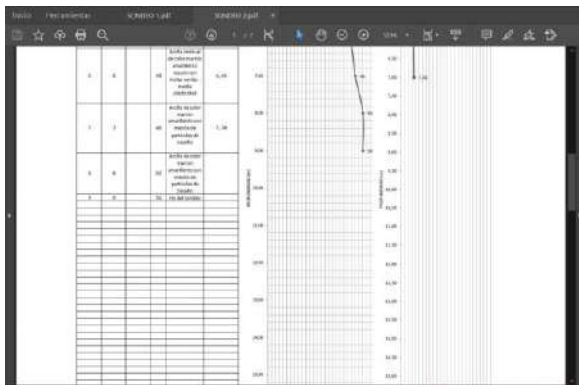


Figura 15. Estudio 2 - Sondeo 2 - Resultados, Parte 2/2.

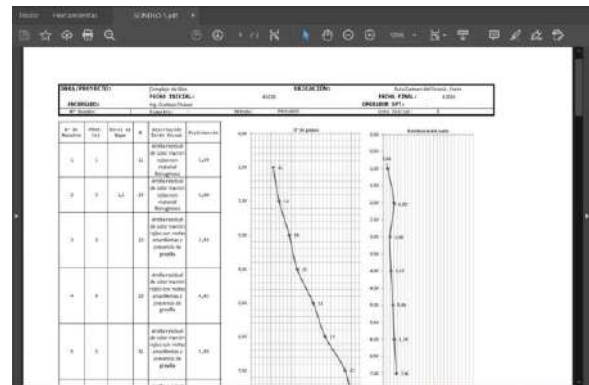


Figura 18. Estudio 3 - Sondeo 1 - Resultados, Parte 1/2.

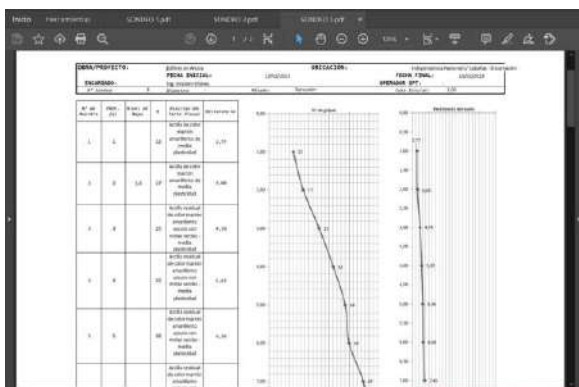


Figura 16. Estudio 2 - Sondeo 3 - Resultados, Parte 1/2.

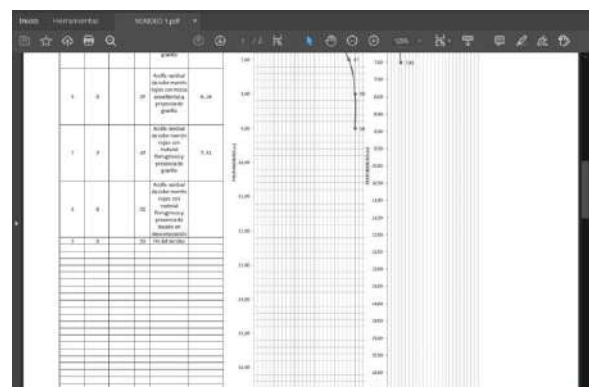


Figura 19. Estudio 3 - Sondeo 1 - Resultados, Parte 2/2.

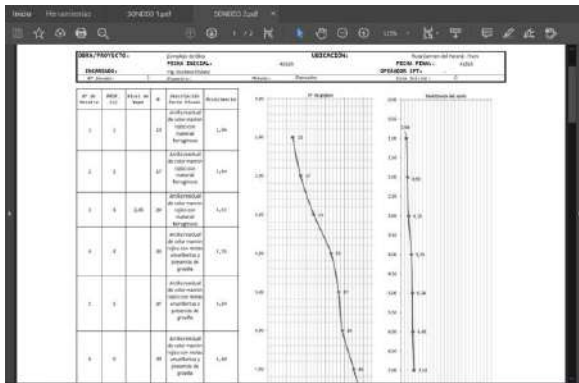


Figura 20. Estudio 3 - Sondeo 2 - Resultados, Parte 1/2.

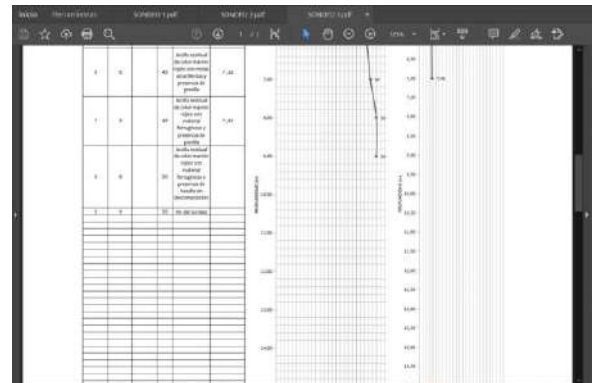


Figura 23. Estudio 3 - Sondeo 3 - Resultados, Parte 2/2.

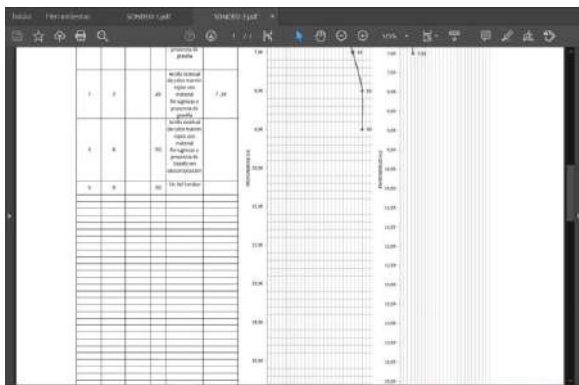


Figura 21. Estudio 3 - Sondeo 2 - Resultados, Parte 2/2.

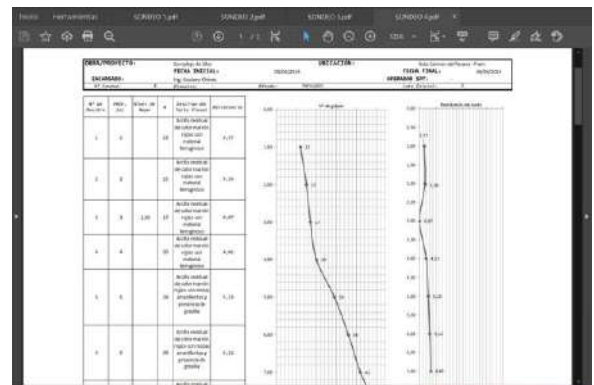


Figura 24. Estudio 3 - Sondeo 4 - Resultados, Parte 1/2.

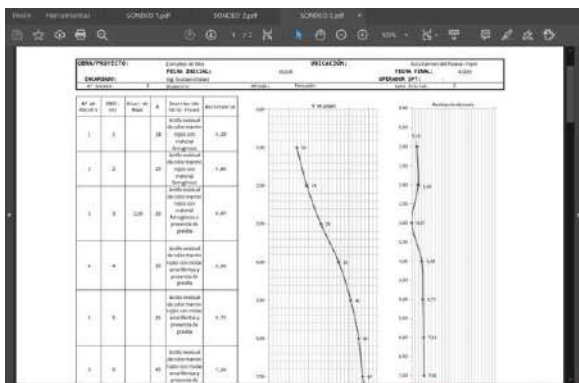


Figura 22. Estudio 3 - Sondeo 3 - Resultados, Parte 1/2.

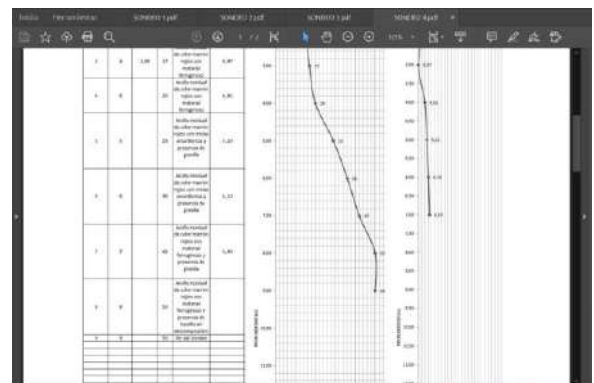


Figura 25. Estudio 3 - Sondeo 4 - Resultados, Parte 2/2.

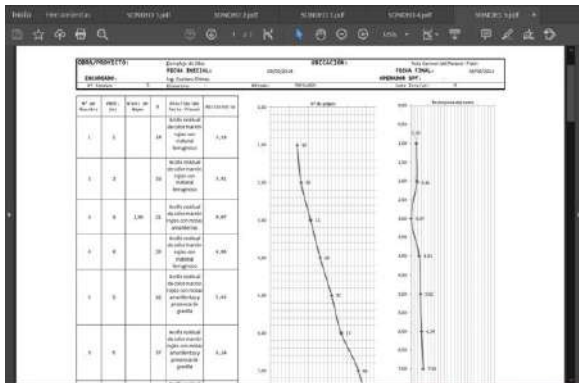


Figura 26. Estudio 3 - Sondeo 5 - Resultados, Parte 1/2.



Figura 29. Estudio 4 - Sondeo 2 - Resultados.

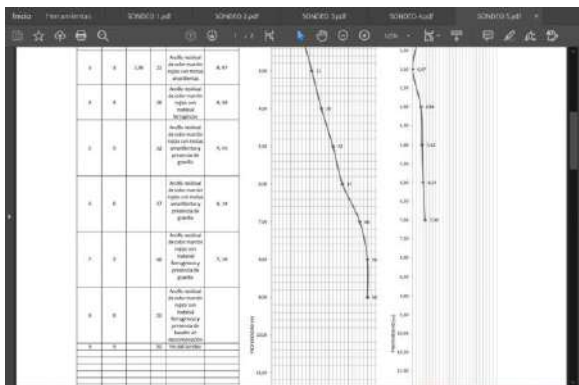


Figura 27. Estudio 3 - Sondeo 5 - Resultados, Parte 2/2.



Figura 30. Estudio 4 - Sondeo 3 - Resultados.

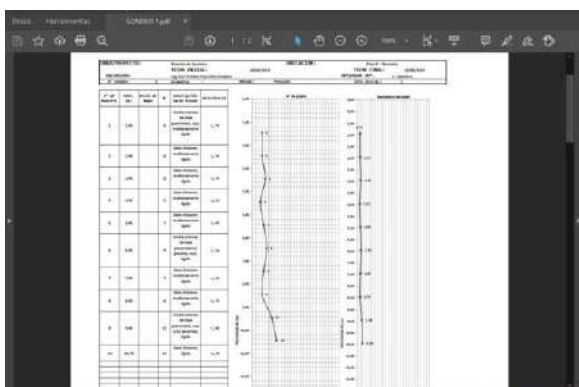


Figura 28. Estudio 4 - Sondeo 1 - Resultados.



Figura 31. Estudio 4 - Sondeo 4 - Resultados.

Conclusiones

Si bien los resultados obtenidos a través de la validación no dejan de ser aproximaciones, se considera que son más precisos, por el hecho de tener en cuenta



factores más exactos a partir de los datos obtenidos de las muestras enviadas al laboratorio y el estudio de cada fórmula aplicada, acercándose así los datos expulsados por el software a las resistencias de suelo existente.

La necesidad de informatizar los procesos de gabinete radica principalmente en el tiempo utilizado en el cálculo manual, descartando posibles imprecisiones por errores humanos.

A raíz del cálculo más preciso se puede optimizar el presupuesto destinado a fundaciones, ya que se estaría evitando el sobredimensionamiento que muchas veces genera sobrecostos. En caso contrario, que a raíz del resultado obtenido mediante el análisis se requiera aumentar las dimensiones de las fundaciones, si bien aumentaría el presupuesto, se estaría del lado de la seguridad, evitando posibles catástrofes durante la ejecución de la obra o posterior a la finalización de la misma.

El hecho de tener informes completos en diferentes formatos y de manera digitalizada permite la posible colaboración de otros profesionales en la decisión de fundaciones a adoptar para la obra en cuestión.

Bibliografía

- TERZAGHI, Karl y PECK, Ralph B.. *Mecánica de Suelos en la Ingeniería Práctica*. Segunda Edición. 1978.
- DAS, Braja M.. *Fundamentos de Ingeniería Geotécnica*. 2015.
- DAS, Braja M.. *Fundamentos de Ingeniería Geotécnica*. 2001.
- Geotechnical & Geoenvironmental Software Directory. Disponible en: <http://www.ggsd.com/>
- TERZAGHI, Karl. *Theoretical Soil Mechanics*. 1943.
- LAMBE, T. William y WHITMAN, Robert V.. *Mecánica de Suelos*. 1976.
- MURRAY, Haydn H. *Applied Clay Mineralogy*. 2007.
- JIMENEZ SALAS, José A. y DE JUSTO ALPAÑES, José L. *Geotecnia y Cimientos I*. 1975.
- NBR 6484:2001 Solo – Sondagens de simples reconhecimento com SPT – Método de ensaio. 2001.
- ASOCIACION PARAGUAYA DE CARRETERAS. Método de penetración normal y muestreo con tubo partido de los suelos. Manual de Carreteras del Paraguay - Ensayos de materiales para construcción de carreteras - Unidad 6. 2019.
- Mapa Geológico del Paraguay. Disponible en: https://www.ssme.gov.py/vmme/images/mineria/mapa%20geologico_1million_set2014.png
- Mapa de los Suelos del Paraguay. Disponible en:



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

<https://www.geologiadelparaguay.com.py/mapasdesuelos.htm>

- FERREYRA, M.. Carta Geotécnica del microcentro Urbano de la Ciudad de Encarnación. Trabajo de titulación (Ingeniero Civil). 2012.
- Relatorio de Impacto Ambiental – Cementerio Municipal de la Ciudad de Encarnación. Disponible en: http://mades.gov.py/sites/default/files/users/control/muni_encar_antonio.m.pdf
- GeoLogismiki. Disponible en: <https://geologismiki.gr/about-us/>
- RODRÍGUEZ BUCARELLY, Carlos M. *Visual Basic 6.0, Orientado a Bases de Datos*. Segunda Edición. Desarrollando Grupo Experto Bucarelly, 2008. 158p. DCLC (Distribución del Conocimiento Libre de Costo).

Vaporizador de inyección electrónica para líquidos anestésicos



C. Eje Ciencias exactas

C.25. Ciencia, Tecnología e Innovación

Vaporizador de inyección electrónica para líquidos anestésicos

Autor: Alarcon Navarro, Roberto Carlos; robertoalarconrca@gmail.com

Profesor guía: Sánchez Guzmán, Jaime Eduardo; jedsanguz@gmail.com

Universidad Mayor de San Andrés

Resumen

Un vaporizador es un equipo de quirófano, diseñado para administrar por vía respiratoria una cantidad controlada del vapor de un líquido anestésico a un paciente, con el fin de prevenir el dolor durante una cirugía. La presente investigación muestra el proceso de diseño y construcción de un vaporizador anestésico de inyección electrónica, comparando su funcionamiento con las características del estándar solicitado por el mercado; y un estudio de los efectos de la altura sobre el mismo aparato.

La metodología empleada en la investigación parte de un análisis de flujos del gas de entrada, y dos cálculos principales, uno de la concentración real y otro del caudal de entrada a partir de la concentración deseada; con el fin de obtener el tiempo de apertura de un inyector. A este diseño se le añadió el de una válvula solenoide, para conmutar entre una vía libre y una conectada al inyector.

La construcción del sistema dio como resultados principales, la validez del principio de inyección y una pieza central del vaporizador que, por medio de un solenoide, nos permite variar a voluntad la concentración de vapor, y de este modo el porcentaje de anestesia. La calibración del equipo se realizará sobre un sexto prototipo.

De ser implementado, este prototipo nos permitiría una mayor independencia tecnológica nacional, y hacer económicamente más factible equipar los hospitales del país.

Palabras clave: Vaporizador, anestesia, inyección



Introducción

Un vaporizador de anestesia es un equipo que se utiliza para facilitar el cambio de líquido a vapor de un compuesto anestésico, con el fin de agregar una cantidad controlada de este vapor al “aire” que llega al paciente. Podemos encontrarlo en todos los quirófanos y salas de cirugía.

Para comprender completamente su funcionamiento, necesitamos recurrir a diferentes conceptos tanto de ciencias de la ingeniería, como de ciencias de la salud.

Esta investigación se centra en el desarrollo de un equipo que pueda vaporizar líquidos anestésicos de manera controlada mediante inyección electrónica, debido a la alta precisión que puede lograr, y a la insuperable velocidad, a la que este sistema puede compensar de la presión de una mezcla de gases ante un cambio de temperatura en el ambiente.

Objetivos

Objetivo General

Construir un vaporizador de anestesia, que dosifique un líquido anestésico de modo electrónicamente controlado.

Objetivos específicos

- Normalizar el diseño, para adaptarse a cualquier instalación hospitalaria.
- Garantizar que la máquina será capaz de asistir a personas de cualquier edad a partir de los 5 años.
- Garantizar el rendimiento de la máquina a 3600 m.s.n.m.

Materiales y métodos

El diseño de los equipos médicos tiene principalmente dos enfoques de estudio: el de las ciencias de la salud y el de la ingeniería. Para realizar un vaporizador de líquidos anestésicos se deben abordar las dos percepciones.

Enfoque médico

Este enfoque tiene por prioridad la confiabilidad de las medidas y la interfaz amigable a prueba de errores.

Miller, Neal, Lars, Lee, Wiener-Kronish, y William L. Young, describen en su libro de anestesiología (2015), que el objetivo principal de la anestesia general es producir en un paciente un estado de inconsciencia; caracterizado por sueño profundo, analgesia, protección neurovegetativa y relajación muscular mediante la administración de fármacos.

Para ello, las máquinas de anestesia se han ido sofisticando a lo largo del tiempo, hasta llegar a máquinas como la mostrada en la Figura 1.



Figura 1. Máquina de anestesia, con dos vaporizadores, de sevoflurano e isoflurano respectivamente. (s.f.) Extraído de «Catálogo», biomedical.pe, Licencia CC.

Este acto quirúrgico, requiere una administración controlada de fármacos. En el caso de una intervención quirúrgica, la anestesia se dosifica por lo general de manera inhalatoria (En ocasiones también puede aplicarse anestesia de forma intravenosa). La dosificación del anestésico inhalatorio depende del flujo de entrada de gas y la ventilación por minuto, pero se controla mediante el ajuste de concentración del vaporizador. Se llamará

a esta variable concentración ideal, y tiene influencia directa sobre la concentración alveolar, que es la concentración en masa del agente anestésico captada en los alvéolos pulmonares.


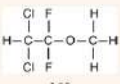
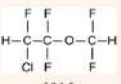
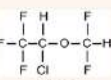
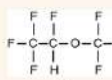
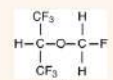
La concentración alveolar (FA) es la fuerza con la que se manifestará en un paciente la captación del anestésico por la sangre; entonces, esta concentración se incrementará si el gas anestésico posee mayor solubilidad en la sangre, y el efecto tardará más en desaparecer; del mismo modo una baja solubilidad del anestésico en la sangre se asocia con un final rápido de la anestesia.

Por ello, se debe considerar la composición y las propiedades del líquido con el que se vá a trabajar. Existen 7 tipos de anestésicos inhalatorios, cada uno con diferentes características y propiedades, sin embargo, todos tienen en común su alta volatilidad.

En la tabla 1 se muestran 6 diferentes líquidos anestésicos. Miller, Neal, Lars, Lee, Wiener-Kronish, y William L. Young suelen considerar entre estos fluidos al óxido nitroso (gas de la risa), pero no se incluirá en el estudio, debido a que es un gas seco, que no se dosifica en el

vaporizador de anestesia y suele ser en muchos lugares sustituido por el dióxido de carbono.

Tabla 1. Estructura química y propiedades de los líquidos anestésicos inhalatorios.

ESTRUCTURAS QUÍMICAS Y PROPIEDADES DE LOS ANESTÉSICOS INHALATORIOS			
Anestésico	Halotano	Metoxiflurano	Enflurano
Año de introducción clínica	E 1956	1960	1966
Estructura química			
Peso molecular	197,4	165	184,5
Punto de ebullición (°C)	50,2	104,8	56,5
Densidad (g/ml)	1,86	1,42	1,52
Presión de vapor (mmHg)	243	22,5	175
Coefficiente de distribución aceite/gas a 37 °C	197	950	98,5
Coefficiente de distribución sangre/gas a 37 °C	2,5	12	1,9
CAM (% atm/mmHg) ¹	0,75/5,7	0,2/1,52	1,58/12
CAM-despertar ²	0,41/3,21	0,081/0,62	0,51/3,88
Anestésico	Isoflurano	Desflurano	Sevoflurano
Año de introducción clínica	1969	1990	1981
Estructura química			
Peso molecular	184,5	168	200,1
Punto de ebullición (°C)	48,5	22,8	58,6
Densidad (g/ml)	1,5	1,45	1,5
Presión de vapor (mmHg)	238	664	157
Coefficiente de distribución aceite/gas a 37 °C	90,8	19	47-54
Coefficiente de distribución sangre/gas a 37 °C	1,4	0,45	0,65
CAM (% atm/mmHg) ¹	1,28/9,7	6/45,6	2,05/15,6
CAM-despertar ²	0,43/3,27	2,4/19	0,63/4,79

Adaptado de «Anestesia de Miller», 2015, p.640. (Edición en Español) © 2015 de Miller Roland, Neal H. Cohen, Lars I Eriksson, Lee A. Fleisher, Jeanine P. Wiener-Kronish, William L. Young.

Nota. Los datos de la tabla se tomaron a nivel del mar, a una temperatura de 20°C y 1 atm de presión.

El flujo de gas en la entrada de un vaporizador es una mezcla de Oxígeno y Nitrógeno. De acuerdo con los conceptos de anestesiología, Gironés (2020) este es llamado “gas fresco”; y se llamará “gas

vector” al flujo derivado de este, que arrastra consigo moléculas del agente anestésico en forma de vapor.

Del “vapor anestésico”, se obtiene una primera relación interdisciplinaria de conceptos, puesto que la concentración alveolar (FA), es la presión parcial que corresponde al vapor anestésico dentro de la mezcla. Existen además otros conceptos como la concentración alveolar mínima y los coeficientes de distribución sangre/gas y aceite/gas sin embargo no son relevantes a la hora de diseñar el vaporizador.

Miller, Neal, Lars, Lee, Wiener-Kronish, y William L. Young, describen también en su libro de anestesiología (2015) que al incrementar el caudal de gas fresco, se altera la presión parcial de anestésico inhalado y por ende la captación del gas anestésico. Esto hace posible variar la dosis al aumentar el flujo de gas, es decir si se aumenta la ventilación por minuto del ventilador mecánico al que se acopla el equipo, se aumenta la velocidad de entrega y posterior disolución en la sangre del agente anestésico. El incremento de la velocidad disminuye la presión, esto tiene influencia directa en el cálculo de concentración. Lo óptimo es variar la concentración de la mezcla de modo



controlado y ajustable, esto hace necesaria una dosificación que se auto regule ante los cambios de presión solo utilizando una perilla o potenciómetro que esté incluida en el vaporizador.

De esta información rescatamos dos criterios; en primer lugar, que cuanto mayor sea la concentración inspirada de un gas anestésico menos disminuirá su presión parcial; y en segundo lugar, que nuestro diseño debe incluir una perilla, que pueda regular la concentración de gas anestésico deseada, sean cuales sean los valores de la presión que entrega el ventilador mecánico y el caudal suministrado de gas vector.

Enfoque ingenieril

Este enfoque tiene por prioridad la precisión en la dosificación de anestesia y la prevención de fallas de todo tipo.

Del anterior enfoque obtuvimos que las variables que influyen de forma importante en el vaporizador anestésicos son la presión de entrada de gas fresco, el flujo de aire de gas fresco, la presión del gas fresco derivado y la presión de inyección del gas vector; Además de ello sabemos que existe una relación de todas estas variables para obtener una única variable de control

llamada concentración deseada o ideal (Ci%).

A partir de este planteamiento ya es posible pensar en el funcionamiento de un vaporizador, sin embargo, el principal aporte del enfoque ingenieril es la inyección electrónica.

Según D’Este, (2001) los vaporizadores de inyección tienen el mismo principio de funcionamiento que los sistemas de inyección de los motores de combustión; y la base para el diseño de estos sistemas es un microprocesador y un circuito capaz de medir la presión y regular el flujo gaseoso.

Girones (2020) describe la calibración del porcentaje de gas anestésico en base a la relación entre la presión de vapor y la presión total de la mezcla es decir escribe la concentración de vapor anestésico en base a la ley de presiones parciales, es decir $C\% = P_V / P_T$. Los diferentes líquidos anestésicos, como los ilustrados en la figura 2, tienen diferentes valores de presión de vapor, además de estar identificados según un código de colores.



Figura 2. Botellas de sevoflurano, isoflurano, enflurano y desflurano (2008). Extraído de «Flurane Bottles», Wikimedia.. Licencia CC.

Considerando que utilizaremos un recipiente cerrado para almacenar el líquido anestésico, debemos asumir que la presión de vapor saturado es la presión PV, de modo que la concentración que calculamos de utilizar este dato y dividirlo entre la presión total del sistema, será una medición de la concentración real, por lo tanto distinguiremos esta concentración como Cr%.

Cómo se mostró anteriormente en la tabla de propiedades químicas de los anestésicos inhalatorios, no es necesario diseñar un calentador para el líquido anestésico, porque estos fluidos tienen temperaturas de ebullición que rondan los 55 °C y a la temperatura normal de un quirófano (aproximadamente 20 a 25°C) ya tienen una presión de vapor considerable,

en la investigación se contrasta que a una mayor altura sobre el nivel del mar, es más fácil alcanzar la temperatura de ebullición, por lo cual los anestésicos serán más efectivos .

La succión de la presión de vapor se consigue mediante el uso de un inyector de Venturi, el cual consta de una reducción de sección, que disminuye la presión de entrada de modo que al salir de nuevo a una tubería de sección normal sufre una caída de presión; caída que, de existir una tercera vía, generará en esta un efecto de succión hacia el lado de salida. Este sistema es ampliamente aprovechado en redes de riego como se ilustra en la figura 3.

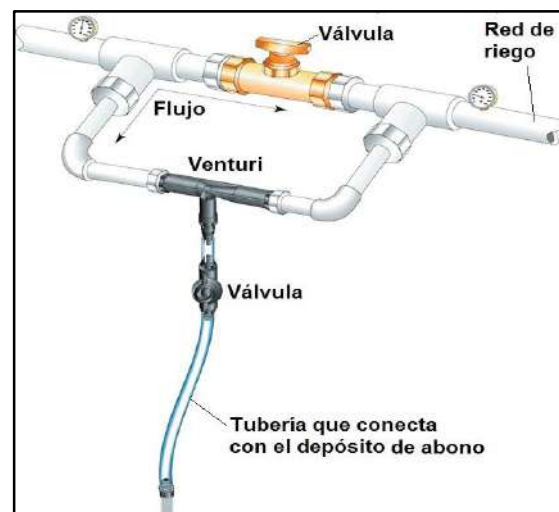


Figura 3. Sistema de inyección. Extraído de «Riego por goteo», *ingemecanica* Licencia CC



La selección de los diámetros adecuados para provocar la succión en el inyector se hizo de manera experimental, mediante un análisis de flujos del gas fresco, al simular el estrechamiento a diferentes diámetros, caudales y presiones para calcular el número de Reynolds, de este modo se eligió en la parte ancha un flujo laminar que encamine el fluido por la derivación y en la parte estrecha un flujo turbulento, que permita la succión con una relación de 9 a 1 entre las áreas del estrechamiento y la entrada.

Se obtuvo una segunda relación para la concentración de vapor anestésico en base al flujo; como el fluido mantiene flujo laminar, el proceso se lleva a cabo a una temperatura constante y el intercambio gaseoso se hace a un caudal constante; Se puede medir la concentración como la relación porcentual del caudal del gas anestésico, es decir, la concentración es igual al porcentaje de vapor en la mezcla; de modo que $C\% = Q_v / (Q_v + Q_0)$.

Si analizamos esta relación de concentración como en el anterior caso se notará que existe un parámetro que no se tiene (Flujo de vapor) pero se puede calcular a partir de la ecuación de la concentración. De esa manera se obtiene

el valor de Q_v ; ya que a partir del caudal deseado por el anestesiólogo, se obtendrá un caudal de vapor deseado o ideal.

Al combinar la concentración real y la concentración deseada para establecer una relación en base al volumen que se obtiene idealmente en un segundo y el caudal real obtendremos una medida de tiempo; Este es el tiempo en el cual se libera el volumen de vapor que se desea administrar de acuerdo al caudal que se tiene. Cuando se sustituye el valor del volumen ideal y el caudal real, se obtiene una relación de concentraciones para hallar el tiempo que la electroválvula del inyector debe permanecer abierta.

$$T = [(C_i\% - C_i\%Cr\%) / (Cr\% - Cr\%C_i\%)] \quad (1)$$

En la ecuación 1 se muestra como obtener el tiempo de apertura de válvula en base a las concentraciones de vapor, sin embargo, estas deben estar en tanto por uno.

Resultados y discusión

En la investigación se realizaron seis prototipos, para probar las hipótesis planteadas: El primer modelo (G1) demostró la efectividad del proceso y sentó las bases para el diseño del aparato, sin

embargo las piezas eran de aire comprimido de uso industrial, por lo que además de no ser adecuadas, no permitían un tamaño conveniente.

Luego de un rediseño, el segundo modelo (G2) se construyó sobre un bloque de aluminio, en el cual se implementó una válvula 4/2 de cuarto giro servo motorizada

Para un tercer y cuarto modelo (G3 y G4) se implementó el control de la válvula mediante un PIC 16F84A, y un inyector de modo que se obtuvo el tamaño deseado de la pieza central, y un funcionamiento más silencioso.

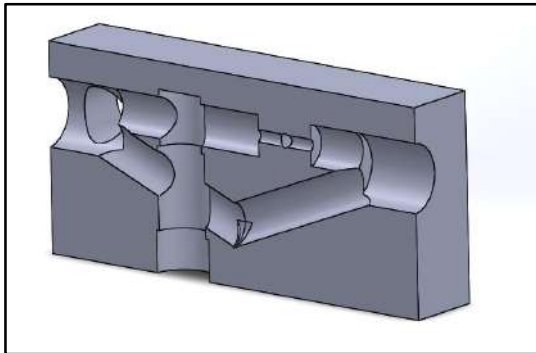


Figura 4. Vista en corte de la pieza central del modelo G4 del Vaporizador anestésico. Elaboración propia.

Para que el circuito electrónico sea auto regulable se utilizó un módulo sensor de presión manométrica y una fuente de

corriente continua. este fue implementado en el modelo G4 y G5.

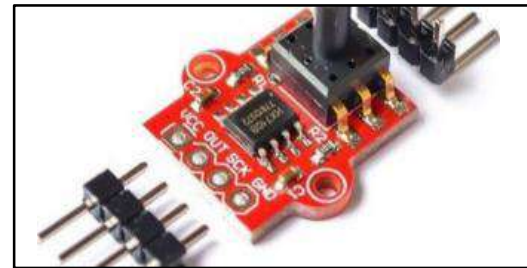


Figura 5. Modulo Sensor de Presión MPS 20040. Licencia CC

El algoritmo que sigue el microcontrolador es simple, en intervalos de 2 segundos, lee el sensor de presión instalado a la entrada del inyector, y al relacionarla con la presión de vapor saturado obtiene la concentración real; luego lee la concentración ideal en la resistencia variable de la perilla (Potenciómetro) y de relacionar ambas variables determina el tiempo de apertura de la válvula de cuarto giro para ese ciclo. Una vez que el ciclo termina, el programa vuelve a iniciar.

Es importante recalcar que este programa funciona para cualquier mecanismo de apertura, por lo que es posible la dosificación discretizada de cualquier fluido mediante este sistema, es por ello que además de modificar el inyector para el diseño G6, se tramitó la patente del inyector como modelo de utilidad. Para que

la calibración del equipo tenga el aval del Instituto Boliviano de Normalización y Calidad (IBNORCA), es necesaria la construcción de un séptimo modelo en materiales inocuos.

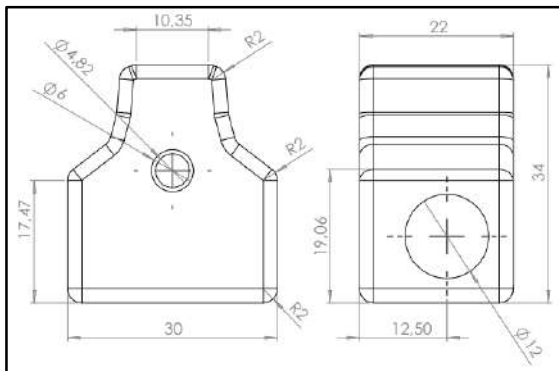


Figura 6. Pieza central del sistema de inyección con solenoide del modelo G6 del Vaporizador anestésico. Elaboración propia.

Debido a que los tiempos de apertura de la electroválvula son muy pequeños en ocasiones la velocidad de apertura no es adecuada, entonces, para no saturar al microcontrolador y prolongar la vida del equipo se utiliza un múltiplo de este tiempo; en este caso se eligió multiplicar el tiempo por 2 debido a que es una fracción frente un proceso respiratorio normal (20 segundos); eso garantiza que en un ciclo respiratorio completo se inhala el vapor anestésico en una mezcla prácticamente uniforme

Al programar el microcontrolador, es posible cambiar la presión de vapor de acuerdo al compuesto anestésico específico para el cual servirá ese vaporizador; se había analizado la posibilidad de utilizar un solo vaporizador para diferentes compuestos, usando para su configuración un selector, sin embargo esta modificación no es factible ya que iría en contra de los estándares establecidos para equipos médicos.

Si bien la construcción del circuito, tanto en la parte eléctrica como mecánica es simple, rápida y de bajo costo, la siguiente etapa para el desarrollo del proyecto consiste en hacer más robusta su programación, automatizar su producción con un software CAM, y garantizar su inocuidad en la selección de materiales.

Además, implementar este diseño, nos permitiría equipar a un costo más accesible los quirófanos de los hospitales del país, generando así, una mejor calidad de atención en el área de salud y alcanzando un nivel más avanzado de independencia tecnológica.

Por último, el vaporizador puede operar en caudales de gas fresco de 0 a 12 litros por minuto, y presiones de 0.8 a 1.8 bar, lo que



lo hace apto para el trabajo de quirófano; sin embargo, no es completamente inocuo, por lo que se está trabajando en utilizar mejores materiales, de modo que este equipo en su tercera versión, será apto para usarse en cualquier paciente; ya que cumple los requerimientos demandados por el área de la salud para un vaporizador anestésico.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos del modelo G6, es factible la construcción del vaporizador de inyección electrónica, que funciona para todos los líquidos anestésicos excepto el metoxiflurano.

La inyección es un método muy preciso de dosificación de vapor, que permite que el aparato cumpla las especificaciones requeridas para trabajar como un equipo médico, siempre que se utilicen presiones de gas fresco dentro de los parámetros establecidos.

El desempeño de los vaporizadores es mayor a medida que la presión atmosférica es menor, es decir el rendimiento del vaporizador mejora con la altura siempre que se mantenga una temperatura constante en el líquido de aproximadamente 20°C.

Bibliografía

Gironés Muriel, A. (2020). Vaporizadores anestésicos. Revista Electrónica AnestesiaR, 10(12), 5, 1-12. <https://doi.org/10.30445/rear.v10i12.677>

Miller Roland, Neal H. Cohen, Lars I Eriksson, Lee A. Fleisher, Jeanine P. Wiener-Kronish, William L. Young. Anestesia de Miller. 8va Edición; 2015 (Edición en Español).

D'Este, Juan P. (2001). Vaporizadores. (Texto guía. Societat Catalana d'Anestesiologia, Reanimació i Terapèutica del Dolor.) Recuperado de http://www.scartd.org/arxius/vaptxt_yfig.pdf

[Imagen digital de una Máquina de anestesia, cargada con sevoflurano e isoflurano]. (s.f.). Recuperado de https://biomedical.pe/catalogo/img/p/1/0/0/2/1002-large_default.jpg

[Fotografía de “Bottles of sevoflurane, isoflurane, enflurane and desflurane”] (2008). Recuperado de



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluranebottles.jpg>

Miller Roland, Neal H. Cohen, Lars I Eriksson, Lee A. Fleisher, Jeanine P. Wiener-Kronish, William L. Young. (2015). Estructuras químicas y propiedades de los anestésicos inhalatorios. Anestesia de Miller, 8va Edición. (En Español).

Financiamiento

Esta investigación ha sido desarrollada en el Instituto de Investigaciones Mecánicas y Electromecánica (IIME), de la Carrera de Ingeniería Mecánica, Electromecánica, Mecatrónica y Automotriz; perteneciente a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Mayor de San Andrés, bajo la dirección del ingeniero Jaime Eduardo Sánchez Guzmán.

Agradecimiento

Al ser creador, a mi amada familia, a mi novia María Jesús y al increíble equipo de trabajo del IIME.

Robot para Inspección de Sistemas de Saneamiento y
Alcantarillado



o

C-26 Ingeniería Mecánica y de la
Producción.

RISSA

Robot para Inspección de Sistemas de Saneamiento y Alcantarillado

Autores : Abramo, Renzo¹

abramo.renzo.m@gmail.com ; López,
Gonzalo¹ gonzalo.lopezmas@gmail.com ;
Maisonnave, Juan¹
juanmaiso97@gmail.com

Tutores: Figueredo Henry ¹

henryf@fing.edu.uy ; Usera Gabriel¹
gusera@fing.edu.uy

1- Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay

Resumen

La inspección de los sistemas de Saneamiento y Alcantarillado para el mantenimiento y rehabilitación en las ciudades resultan un tema complejo y de grandes gastos.

Este trabajo de investigación surge de una necesidad real de la Intendencia de Montevideo para disponer de dispositivos

(RISSA) para la inspección de tuberías de saneamiento y alcantarillados.

La principal ventaja de usar un robot como RISSA para la inspección de los colectores, es la de prevenir riesgos de salud para los operarios que deban realizar la inspección y facilitar el alcance a zonas de difícil acceso.

El alcance del robot se limitó a alcantarillas de diámetro grande (mayor a 1 metro). Donde el robot debe ser capaz de desplazarse tanto si las alcantarillas están secas o con alto nivel de agua (flotar) y superar obstáculos.

El robot (RISSA) puede ser controlado desde la superficie a través de una interfaz de control por el usuario que permite al operador la inspección y monitoreo de los sistemas de saneamiento a distancia.

La mayor particularidad del robot es que cuenta con un sistema de ruedas transformables que le permite desplazarse en agua, tierra y superar obstáculos.

En el trabajo se presenta el diseño mecánico del robot, selección de componentes y construcción de un prototipo impreso en PLA.

Palabras claves: robot , sistema de saneamiento , inspección.

o

1. Introducción

Los sistemas de saneamiento son una parte importante dentro de la infraestructura de una ciudad, ya que son los encargados de gestionar las aguas residuales, pluviales e industriales. Sin embargo su inspección y mantenimiento son una tarea sumamente compleja por varios motivos, a modo de ejemplo, por las características del agua que circula, su ubicación, secciones no transitables por un operario, etc.

La principal ventaja de usar un robot como RISSA para la inspección de los colectores, es la de prevenir riesgos de salud para los operarios que deban realizar la inspección y facilitar el alcance a zonas de difícil acceso.

El sistema de saneamiento de Montevideo combina infraestructuras modernas con infraestructuras con varias décadas de servicio. Se compone de tramos de diversas desde secciones transitables a secciones no transitables de 200 mm. La figura 1 presenta unas secciones típicas de colectores unitarios del sistema de Montevideo.



Figura 1. Secciones típicas unitarias del sistema de Montevideo (ovoides).

En el contexto comercial de algunos sistemas existentes en el mercado para la inspección de sistema de saneamiento se pueden encontrar principalmente clasificados en el uso final y diámetro a inspeccionar. El sistema para inspección visual de tuberías denominado "iPEK ROVER", permite la inspección de diámetros de tuberías en los rangos desde 100 mm hasta 2500 mm. El sistema está equipado con un sistema de 3 ejes de tracción y 6 ruedas motrices. No se trata de un sistema autónomo, consta de un cordón para ser manipulado, recibir y transmitir las órdenes (figura 2) .

o



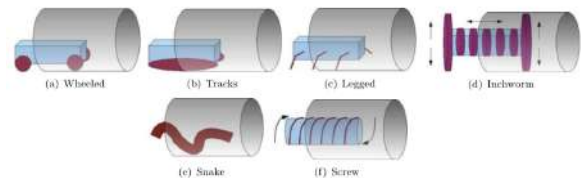
Figura 2 - Sistema ROVION (tomada de PANATEC).

Otro ejemplo para inspección visual utilizado por la Eddyfi Technologies es la gama de las familias VERSATRAX (vehículos orugas, figura 3). Estos vehículos pueden inspeccionar hasta una longitud de 1000 m, en diámetros superiores a 320 mm, a una velocidad máxima de 6.4 m/min; al igual que el sistema anterior no es autónomo.



Figura 3- Sistema VersaTrax™ - (tomada de Eddyfi Technologies)

Varios estudios muestran la complejidad en el diseño de dispositivos para conducciones de saneamiento, para el análisis de los componentes mecánicos más utilizados para los desplazamientos en a) ruedas, b) orugas, c) paletas, d) gusano, e) víbora, f) tornillo, de acuerdo con la figura 4, se plantea que una única solución difícilmente se adapte a las diversas condiciones encontradas en los sistema de saneamiento



(ver figura 5).

Figura 4 . Principios de desplazamiento (tomada de Tur and Garthwaite, 2010).



Figura 5 Detalle de obstrucciones en la red del sistema de saneamiento (Montevideo, Punta Carretas).

o

En la misma línea de argumentación, (Elkmann, Reimann, Schulenburg, and Althoff, 2006) propuso un sistema con varias etapas de inspección compuesto por tres clases de dispositivos un primer equipo con sensores básicos realiza una inspección inicial con desplazamiento flotante sobre el agua figura 6, las otras etapas posteriores son guiadas por esta inspección inicial.



Figura 6 - Prototipo de unidad flotante de inspección preliminar, "Spy" presentado por Elkmann et al (tomada de Elkmann, Reimann, Schulenburg, and Althoff, 2006).

De estas búsquedas en la literatura se encontró que predominan muchos ejemplos de desarrollos de robot específicamente orientados para inspección de saneamiento con desarrollos en parte investigativos en Universidades y otros más comerciales desarrollados por empresas (Alejo, Marques, Caballero, Alvito, and Merino, 2016) ,(Chataigner et al., 2020) ,(Andrade-Pineda et al., 2019), (Le, Chen, and Rajkumar, 2020).

Este trabajo desarrolla un prototipo de vehículo robótico, no autónomo, pero con una interfaz de control por el usuario sin cables, con el propósito de inspeccionar los sistemas de saneamiento, mostrando la capacidad para trasladarse en alcantarillas de diámetro mayor a un metro en condiciones secas o con alto nivel de agua (flotar) y también poder superar obstáculos medios.

2. Objetivos

Diseñar y construir un prototipo de un vehículo robótico anfibia, no autónomo, especializado en la inspección de tuberías de saneamiento.

3. Materiales y Métodos

Los conceptos usados para el desplazamiento del robot de inspección

o

en este estudio son desplazamientos mediante sistema ruedas en colectores secos (figura 7) y ante la presencia de agua las ruedas se transformaran en sistema paletas (figura 8) . Estas paletas también funcionan para superar obstáculos.

El diseño inicial de la rueda se basó (Zheng and Lee, 2019) , donde un engranaje central, acoplado al eje, es el encargado de abrir o cerrar las paletas (detalles figura 9 y 10) .

Una vez ideados los mecanismos y concepto del robot (RISSA) , se comenzó la etapa de diseño, cálculo y acople de mecanismos efectivos.

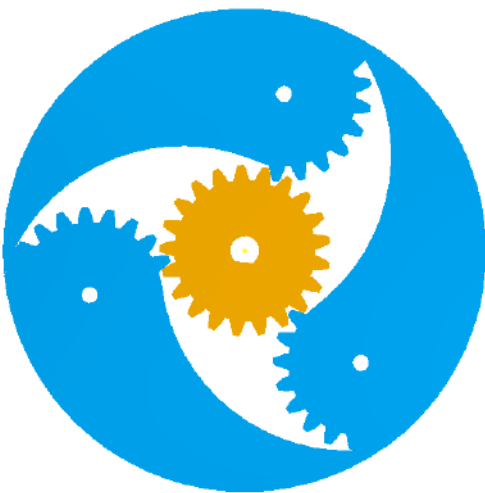


Figura 7. Concepto del Sistema Rueda.

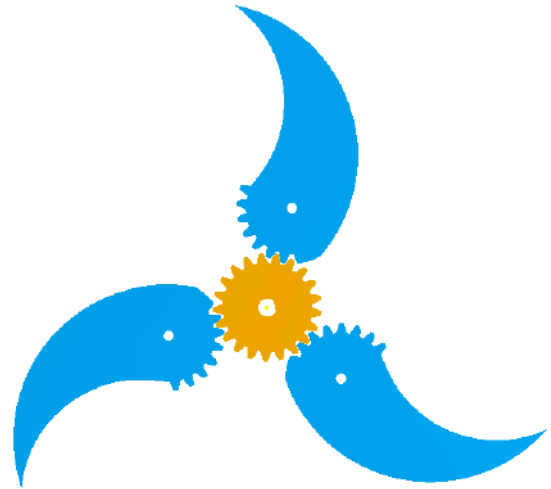


Figura 8. Concepto del Sistema Paleta.

En el artículo (Zheng and Lee, 2019) la condición del sistema rueda vs paleta paleta está determinada por la dirección de giro de la rueda.

Por lo tanto , con el objetivo de independizar la dirección de giro del tipo de desplazamiento adicionamos la idea de un embrague.

Como resultado del análisis y evaluaciones obtuvo la configuración, figura 9.

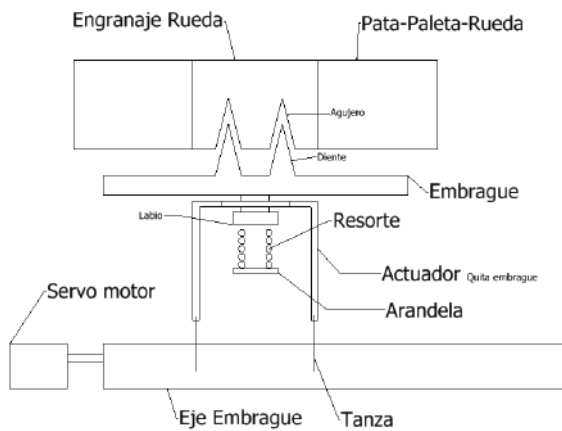


Figura 9 . Esquema del Mecanismo de embrague para independizar los conceptos Rueda/Paleta del movimiento de RISSA.

Mediante la colocación del embrague, los dientes del mismo se insertan en el engranaje de la rueda. Bloqueando así el movimiento relativo entre las paletas y el engranaje de la rueda. El mecanismo del embrague no tuvo grandes variaciones posteriores al esquema de las Figuras 9, 10 y 11.

El accionamiento del embrague se realiza mediante el giro de un servo motor. Este servo se encuentra acoplado al eje de embrague, al rotar el eje de embrague tensa 8 líneas de tanza que son las encargadas desplazar los 4 actuadores quita embrague. Estos actuadores vencen la resistencia del resorte, logrando así desacoplar el embrague de las ruedas.

La etapa más extensa del trabajo, constó de diseñar en software para Diseño CAD e imprimir en 3D (PLA-ácido poliláctico) las piezas a escala y armar varios prototipos junto con la selección de componentes para el mecanismo.

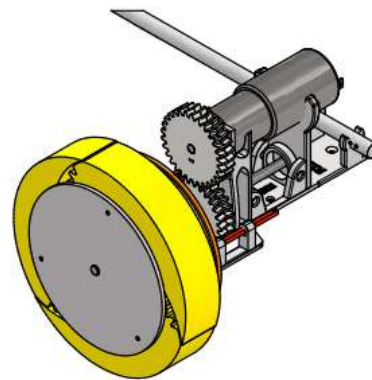


Figura 10. Vista Isométrica del Concepto Sistema Rueda /Paleta final funcionando mediante impresión 3D utilizando material PLA.

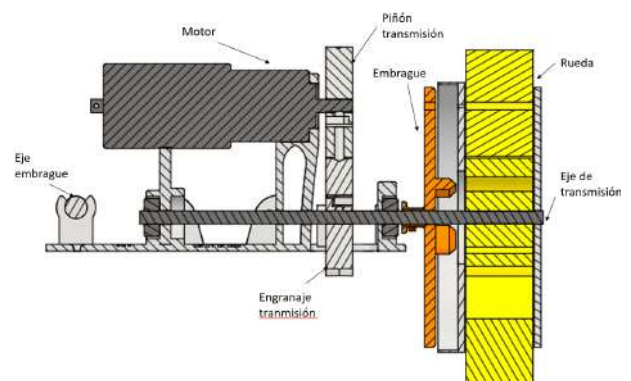


Figura 11 . Vista lateral del Concepto Sistema Rueda /Paleta final.

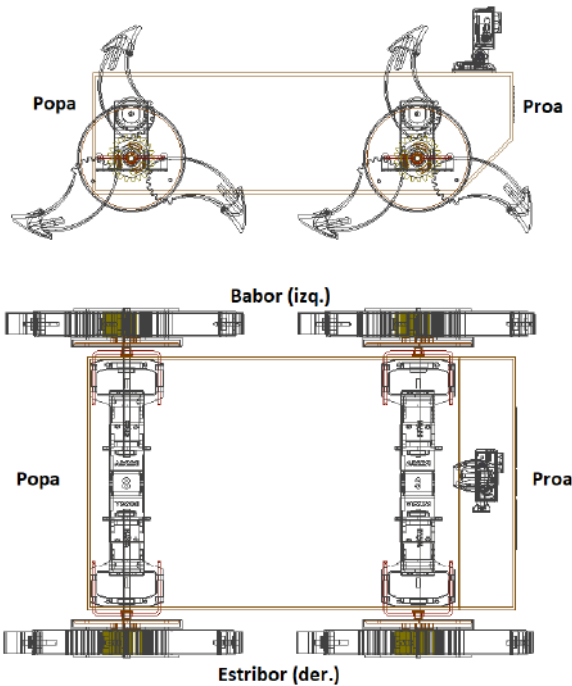


Figura 12 . Vista superior y lateral del prototipo v2.

A continuación se presentan los elementos seleccionados para el prototipo v1 y v2.

3.1 Selección de motor desplazamientos.

Utilizando un Criterio de Torque bloqueado mínimo requerido:

$$T_{min}^{stall} = FD * \frac{m}{4} * r \quad (1)$$

Donde:

T_{min}^{stall} : Torque de motor bloqueado mínimo.

FD: Factor de diseño.

m: Masa del vehículo.

r: Distancia entre el centro de la rueda y la punta de la paleta.

$$T_{min}^{stall} = 3 * \frac{5.5}{4} * 14.5 = 59.8 \text{ kg} * \text{cm}$$

(2)

n (rpm=revoluciones/minuto) en superficie seca :

$$n_d = v_d * \frac{60}{2\pi * r} \quad (3)$$

Donde :

v_d : velocidad de diseño en tierra.

$$n_d = 1 * \frac{60}{2\pi * 0.075} = 127 \text{ rpm} \quad (4)$$

Utilizando los resultados Ec (2) y Ec (4) seleccionamos el motor de 118 rpm con reducción planetaria marca Servocity cumpliendo las siguientes características (Tabla 1) .

Tabla 1. Características eléctricas, "118 RPM HD Premium Planetary Gear Motor - ServoCity," n.d.

B. Electrical Characteristics:

1	Max. No-load Current	0.53	A
2	No-load Speed	118 ± 12	rpm
3	Rated-load Current	2	A
4	Rated-load Speed	104 ± 10	rpm
5	Min. Stall Torque	69	kgf-cm

o

6	Max. Stall Current	20	A
7	Insulation Resist.(500V)	20	MΩ
8	Dielectric Strength	250	VAC
9	Motor Brush Type	Graphite	~
10	Output Power at Max.Eff.	11	W

En la figura 13 se muestran las cotas dimensiones del motor seleccionado.

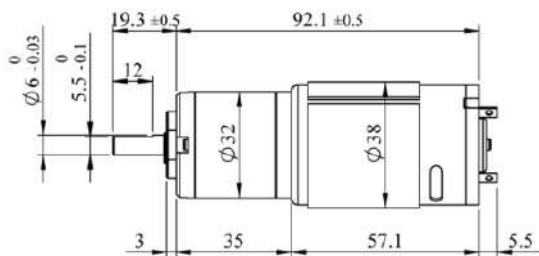


Figura 13. Dimensiones geométricas del seleccionado.

3.2 Selección del servomotor para acople y desacople del mecanismo rueda/paleta.

Utilizando un criterio empírico de ensayo para la selección final (figuras 7 y 8) , el servomotor seleccionado para acoplar y desacoplar los embragues fue de, modelo SERVO SG-5010 marca TowerPro (figura 14) que cuenta con un torque máximo de 6 kg*cm para un voltaje de 6V.



Figura 14 Servo seleccionado SERVO TowerPro SG-5010.

3.3 Selección del sistema para control

Usamos 2 controladores, uno para el lado derecho y otro para el lado izquierdo. Ver lados en la figura 12.

Corriente admisible requerida Ec.(5) :

$$I = 2 * I_{stall} = 2 * 20 = 40 A \quad (5)$$

Donde:

I : Corriente admisible requerida.

I_{stall} : Corriente de rotor bloqueado.

Utilizando la Ec.(5) seleccionamos el controlador QUICRUN 880 Dual ESC Marca Hobbywing (figura 15) el cual cuenta con salida para 2 motores y hasta una corriente admisible de 80 Amperes.

o



Figura 15. Controlador QUICRUN 880
Dual ESC Marca Hobbywing.

3.5 Selección de batería

Para seleccionar la batería del prototipo se estimó un consumo de 6 watts por motor en tierra a velocidad media.

Se seleccionó la batería Turnigy 5000mAh 3S 20C LiPo Pack w/XT-9.

Los 5000mAh a 3S, equivalen a 57Wh. Energía suficiente para desplazarse 2 horas en tierra.

El valor 20C en la batería indica que la corriente admisible por esta es de 100A mayor a $4 * I_{stall} = 80 A$.

3.4 Selección interfaz de control por el usuario- Radio control.

El sistema de radio control seleccionado fue utilizando los criterios de salida para controlar los motores de potencia y el servomotor del embrague ,figura 16.



Figura 16 . Radio control para desplazar a RISSA (modelo Element 6 de GOBILDA)

En la figura 17 se muestra el Diagrama funcional de control implementado para el control de RISSA.

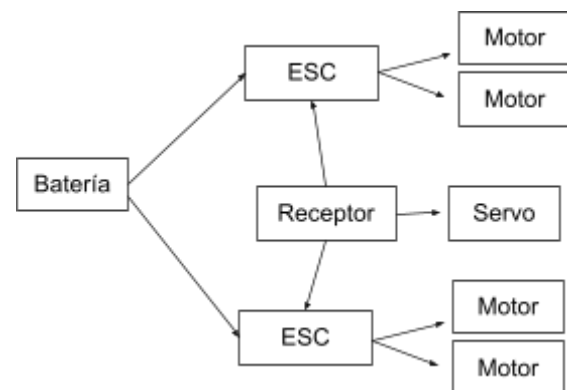


Figura 17. Diagrama del control de RISSA.

3.5 Análisis del diseño mecánico.

o

El diseño funcional propuesto fue integrado y construido logrando una funcionalidad de los mecanismos, se continuó con la realización de un análisis (optimización) del diseño utilizando criterios de resistencia y rigidez admisibles mediante técnicas de implementación (CAD-CAE).

Se estudiaron los elementos estructurales para obtener una resistencia, rigidez y factores de seguridad normalizados. En las figuras 18 y 19 se muestran algunos resultados de los estudios de tensiones realizados.

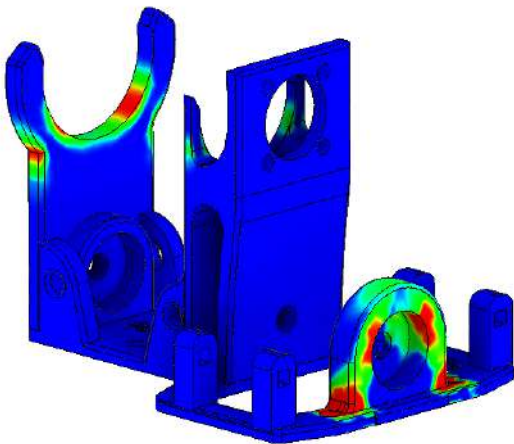


Figura 18. Análisis de tensiones para el porta motor y rodamientos.

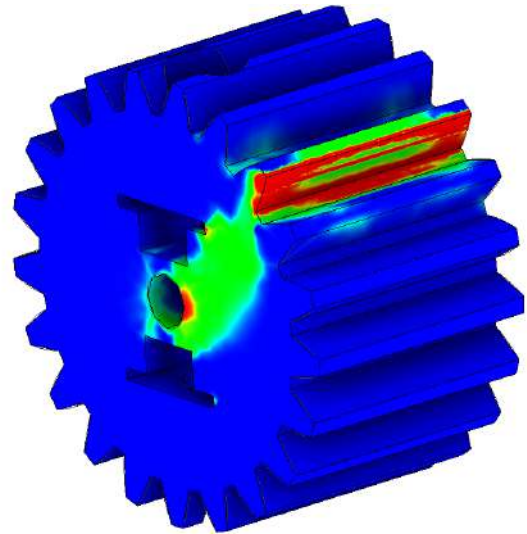


Figura 19. Resultados del análisis de tensiones para el engranaje central de la rueda.

Finalmente , mediante el análisis utilizando el modelo numérico con unas condiciones de cargas de tipo impacto se evalúa el concepto del Sistema Paleta para superar los obstáculos medios. El análisis demuestra que existe una concentración elevada de tensiones por el factor impacto, no cumpliendo los criterios de resistencia, lo cual corresponde con los resultados experimentales realizados.

Utilizando una modificación al diseño para proteger los engranajes y otros elementos se planteó un sistema de absorción de impacto ubicado en el extremo de la paleta (figura 20).

o

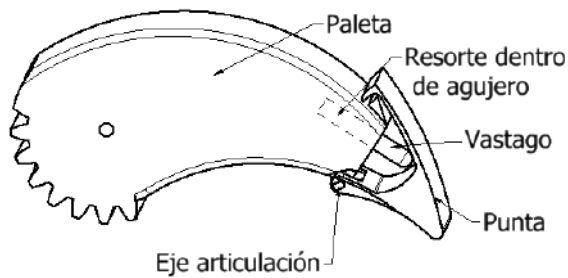


Figura 20. Diseño del sistema para absorber los impactos y superar obstáculos.

Utilizando el análisis numérico también se dimensionó el resorte del mecanismo (figura 20).

3.6 Diseño del casco y desplazamiento en agua.

A la hora de diseñar el casco se tienen tres objetivos:

- Un diseño compacto en pos de reducir las dimensiones del robot lo más posible.
- Que el calado sea lo menor posible, de forma de alejar el casco del suelo cuando este se encuentra en tierra.
- Un diseño liviano y de construcción sencilla.

Mediante una estimación de la masa del robot, se obtuvo el volumen de desplazamiento, ajustando el calado

manga y eslora para obtener las dimensiones del casco.

Se hicieron simulaciones en CFD (Dinámica de los Fluidos Computacionales) para distintos ángulos de ataque y velocidades. A partir de estas simulaciones y de los objetivos en el diseño del casco se seleccionó un alfa de ataque.

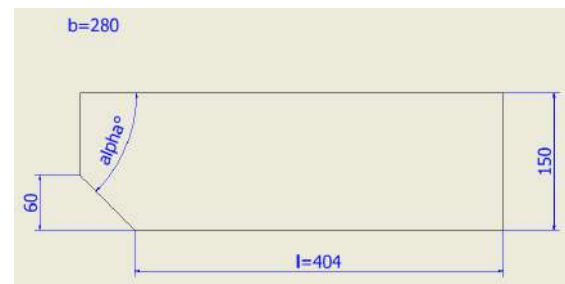


Figura 21. Vista lateral casco.

En la figura 21 se muestra el ángulo alfa del casco, cuyo análisis se presenta en la sección resultados

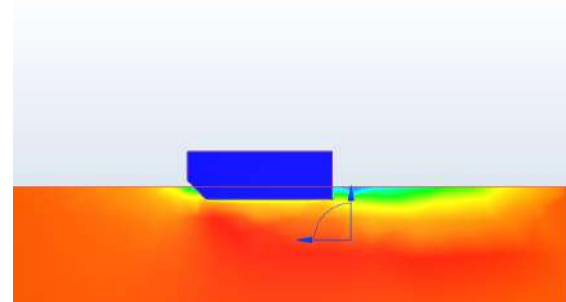


Figura 22. Dimensiones del casco y Simulación en CFD para el desplazamiento de RISSA por el agua.

Como se mencionó anteriormente la propulsión en agua es con el Concepto

o

Sistema paletas, que al girar desplazan agua hacia atrás.

Mientras la rueda se encuentre girando en el agua la cantidad de paletas sumergidas va a variar en función del ángulo φ (figura ()).

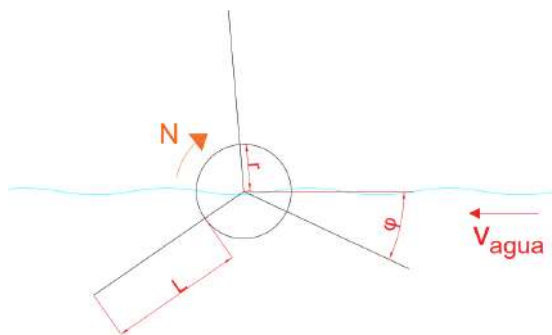


Figura 23. paleta quieta girando contra corriente.

Donde n son las rpm de la rueda, L el largo de la paleta extendida, r el radio del engranaje central y v_{agua} la velocidad del agua ya que se considera un referencial solidario al robot.

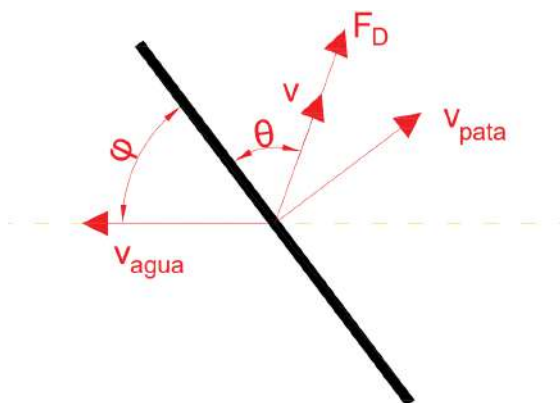


Figura 24. diagrama de cuerpo libre de una paleta o paleta.

Donde v_{paleta} es la velocidad tangencial media de la paleta, producto de la rotación de la misma, v la velocidad resultante de la suma de v_{agua} y v_{paleta} , F_D la fuerza de arrastre generada por la paleta y θ el ángulo de v respecto a la paleta.

A partir de este modelo físico simplificado se generó un código en Octave se obtuvieron las curvas de coeficiente de drag paleta vs angulo.

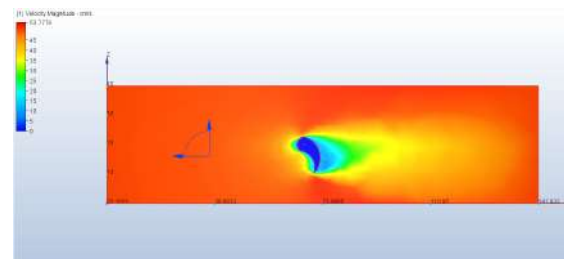


Figura 25. Simulación paleta en CFD.

Posteriormente se realizó un ensayo al casco, para determinar la curva fuerza de arrastre vs velocidad de desplazamiento.



Figura 26. Ensayo sobre el casco del prototipo v2.

4.- Resultados y discusión.

Se construyó un prototipo que mostró ser capaz de desplazarse en condiciones secas.

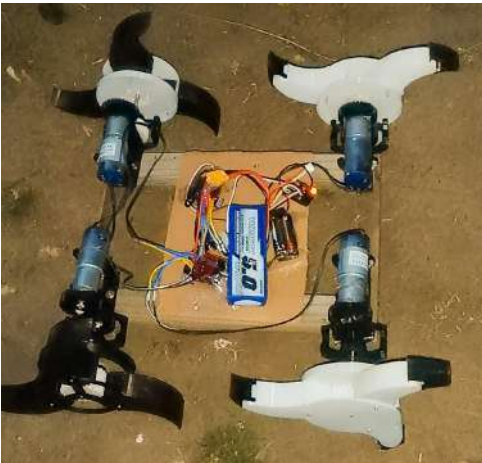


Figura 27. Prototipo v1.

Se diseñó un segundo prototipo con casco, el cual fue analizado y ensayado hidrodinámicamente.

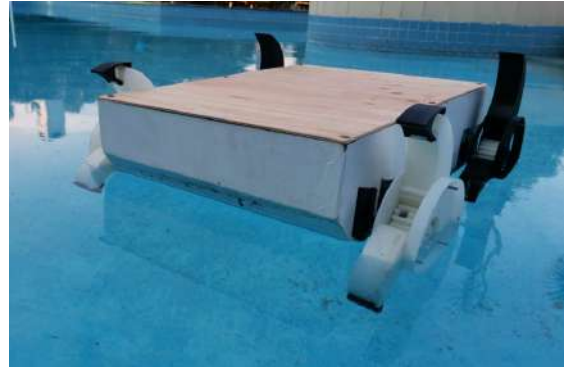


Figura 28. Prototipo v2 del Diseño RISSA.

Se obtuvo un diseño final, el cual es más simétrico lo que permitiría voltearse sin perder funcionalidad. Para el mismo se seleccionaron materiales y procesos de fabricación.

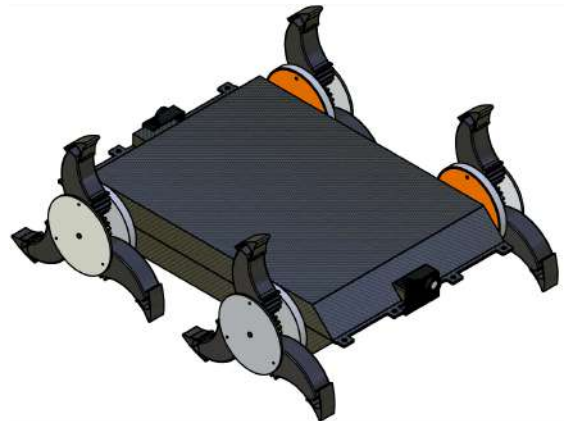


Figura 29. Vista Isométrica diseño final RISSA.

A continuación se presentan los resultados del análisis hidrodinámico del casco del prototipo v2.

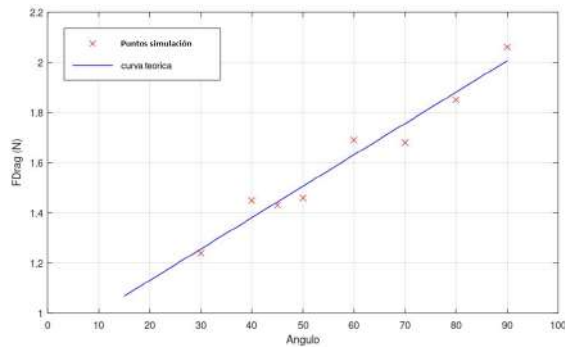


Figura 30. Fuerza de arrastre ejercida sobre el casco a $v=0.5$ m/s para diferentes ángulos α .

A partir de la gráfica de la figura 30 y los requerimientos mencionados en la sección anterior 3.6, se seleccionó $\alpha=45^\circ$.

Con el casco ya definido se realizaron simulaciones como las de la figura 22 para obtener curvas de arrastre vs. velocidad. Posteriormente se realizó un ensayo al casco (figura 26). Se presentan los resultados en la figura 31.

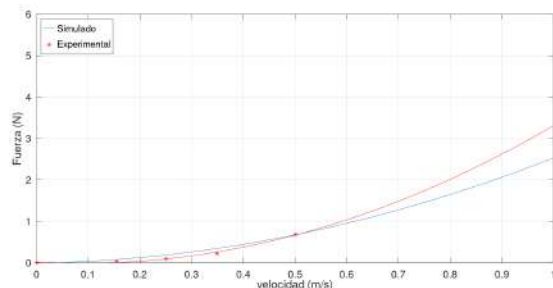


Figura 31. Fuerza de arrastre del casco en función la velocidad del mismo para el ángulo seleccionado, $\alpha = 45^\circ$.

Como resultado de la simulación en CFD como en la figura 25 para distintos ángulos de ataque se obtuvo la gráfica de la figura 32.

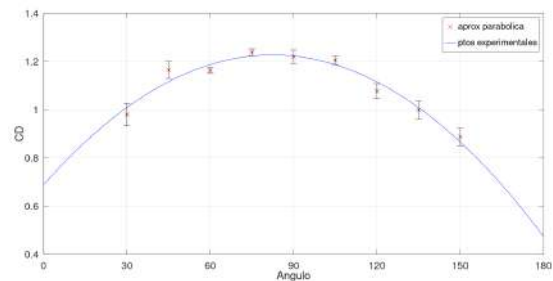


Figura 32. Coeficiente de drag (CD) en el recorrido de 180° de una paleta en el agua.

Obteniendo así la fuerza ejercida por las paletas, presentado en las siguientes figuras.

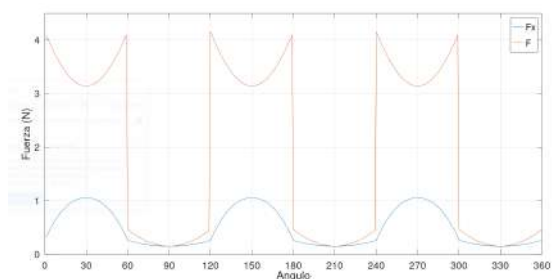


Figura 33. F (fuerza en total ideal) y F_x (fuerza ideal en dirección horizontal) según ángulo φ rueda para una vuelta

completa de la rueda en punto de funcionamiento.

Conociendo cómo se comporta el **CD** de la paleta en función del ángulo, se obtiene el arrastre de la paleta en función de la velocidad angular **n**, se procedió a iterar para distintos valores de velocidad de desplazamiento del robot en agua y **n**.

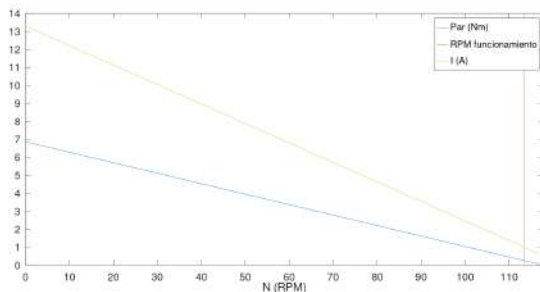


Figura 34. Curvas motor y cortadas con el punto de funcionamiento.

El motor debe efectuar un par de 0,187 Nm, girando así a una velocidad de 113 rpm y consumiendo una corriente de 1,05 A, por ende consumiendo una potencia de 12,6 Watts por motor.

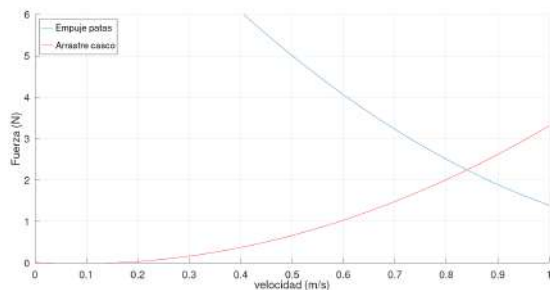


Figura 35. Arrastre casco vs Arrastre paletas.

Finalmente, interceptando la curva de arrastre del casco con la de arrastre de las paletas de la gráfica de la figura 35, se obtiene así una velocidad de desplazamiento de 0,84 m/s y un empuje generado de 2,23 N.

Haciendo un balance general, ya conociendo los puntos de funcionamiento, se puede calcular la eficiencia de fuerza siendo ésta de 0,244. Esto significa que en una situación ideal, este método de desplazamiento desperdicia un 75,6% de potencia como base.

Calculando un rendimiento del sistema, este se calcula como:

$$\eta = \frac{P_{\text{útil}}}{P_{\text{mec motores}}} = \frac{v_{\text{robot}} \cdot T}{\text{Par}_{\text{motor}} \cdot \text{rpm} \cdot \frac{2\pi}{60}}$$

Siendo T el empuje generado por las cuatro ruedas y $P_{\text{mec motores}}$ la potencia mecánica que entregan los cuatro motores. Se deduce así que $\eta = 21,15\%$

A modo de comparación se utilizan las ecuaciones de (Harte, Bose, Clifford, Roberts, and Davidson, 2011) para caracterizar el rendimiento de ruedas de paletas en agua.

De donde se obtiene $\eta = 15,9\%$.



o

4. Conclusiones.

Analizando los resultados obtenidos se logró diseñar un prototipo de vehículo robótico anfíbio controlado a distancia por un usuario objetivo y mostrando capacidad para trasladarse en condiciones secas o con alto nivel de agua (flotar) y también poder superar obstáculos medios.

El prototipo construido mostró un buen desempeño en tierra, resultando este satisfactorio mecánicamente y de fácil construcción a partir del ensamblaje de componentes estándar en el mercado y la impresión de los diseños y mecanismos mediante impresora 3D con materiales como el PLA.

Finalmente, puede concluirse que el prototipo RISSA, si bien el desempeño en agua fue analizado, aún queda por construir y ensayar experimentalmente su comportamiento sobre el agua. De esta forma los modelos numéricos y los ensayos realizados sobre el prototipo pueden contribuir para un mejor entendimiento de las influencias de los diferentes parámetros estudiados sobre el diseño del robot para inspeccionar los sistemas de saneamiento.

Bibliografía

- Adouni, M., Shirazi-Adl, A., and Shirazi, R. (2012). Computational biodynamics of human knee joint in gait: From muscle forces to cartilage stresses. *Journal of Biomechanics*, 45(12), 2149–2156. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2012.05.040>
- Alejo, D., Marques, C., Caballero, F., Alvito, P., and Merino, L. (2016). SIAR: an autonomous ground robot for sewer inspection. *Proceedings of the Spanish Actas de Las Jornadas de Automática*, 1–8.
- Andrade-Pineda, J. L., Romero Rodríguez, H., Rodríguez Castaño, Á., Pérez Grau, F. J., Carpes Hortal, G., and Ollero Baturone, A. (2019). Diseño y desarrollo de un robot aéreo para la inspección de colectores de saneamiento. *XL Jornadas de Automática*, 647–654.
- Bahnsen, C. H., Johansen, A. S., Philipsen, M. P., Henriksen, J. W., Nasrollahi, K., and Moeslund, T. B. (2021). 3d sensors for sewer inspection: A quantitative review and analysis. *Sensors*, 21(7), 2553.
- Chataigner, F., Cavestany, P., Soler, M., Rizzo, C., Gonzalez, J.-P., Bosch, C., ... Serrano, D. (2020). Arsi: an aerial robot for sewer inspection. In *Advances in Robotics Research: From Lab to Market* (pp. 249–274). Springer.
- Elkmann, N., Reimann, B., Schulenburg, E., and Althoff, H. (2006). Automated



inspection system for large underground concrete pipes under operating conditions. *Field and Service Robotics*, 567–578.

Gomez, F., Althoefer, K., and Seneviratne, L. D. (2007). An ultrasonic profiling method for the inspection of tubular structures. *Computer-Aided Civil and Infrastructure Engineering*, 22(6), 400–418.

Harte, D., Bose, N., Clifford, R., Roberts, T., and Davidson, G. (2011). An application of paddle wheel propulsion to a high speed craft. *Second International Symposium on Marine Propulsors (SMP'11), Hamburg, Germany*.

Le, D. V.-K., Chen, Z., and Rajkumar, R. (2020). Multi-sensors in-line inspection robot for pipe flaws detection. *IET Science, Measurement & Technology*, 14(1), 71–82.

Tscheikner-Gratl, F., Caradot, N., Cherqui, F., Leitão, J. P., Ahmadi, M., Langeveld, J. G., (2019). Sewer asset management--state of the art and research needs. *Urban Water Journal*, 16(9), 662–675.

Tur, J. M. M., and Garthwaite, W. (2010). Robotic devices for water main in-pipe inspection: A survey. *Journal of Field Robotics*, 4(27), 491–508.

Zheng, C., and Lee, K. (2019). WheelLeR: Wheel-leg reconfigurable mechanism with passive gears for mobile robot applications. *2019 International Conference on Robotics and Automation (ICRA)*, 9292–9298.

118 RPM HD Premium Planetary Gear Motor - ServoCity. (n.d.). Retrieved June 27, 2022, from: <https://www.servocity.com/118-rpm-hd-premium-planetary-gear-motor/>

Financiamiento

El proyecto fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (Programa PAIE 2021. Título RISSA/ ID de proyecto 160).

Agradecimiento

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República (FING-UDELAR) por la formación brindada y el apoyo al proyecto.

Efecto de la frecuencia y altura de corte en la producción forrajera de brachiaria
brizantha cv. Mg4, cuarto año de evaluación



C.26

EFFECTO DE LA FRECUENCIA Y ALTURA DE CORTE EN LA PRODUCCIÓN FORRAJERA DE *Brachiaria brizantha* cv. MG4, CUARTO AÑO DE EVALUACIÓN

Autor: Villanueva Ocampos, Micaela María; micaela.villaoca@gmail.com

Profesor guía: Ortiz Acosta, Edgar Orlando; orlantizpy@yahoo.com

Facultad de Ingeniería Agronómica
Universidad Nacional del Este

Resumen

El Paraguay es uno de los mayores productores y exportadores de carne Latinoamericana, donde el mercado exige que los animales deben ser terminados a campo (pastorean constantemente), en el país se diferencian dos épocas (alta y baja) de producción de forraje, por ende, es de suma importancia tener un buen manejo (altura y frecuencia de corte) del pastizal para lograr metas trazadas. El experimento se llevó a cabo en el campo experimental de la FIA – UNE con el objetivo de evaluar el efecto de la altura de corte y frecuencia de corte sobre la producción forrajera de *Brachiaria brizantha* cv. MG4. El diseño experimental utilizado fue el de bloques completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 que corresponde al Factor A con 3 Frecuencias de corte (31, 41 y 51 días) y al Factor B con 2 Alturas (15 y 30 cm), teniendo 4 bloques de 6 tratamientos. Los tratamientos consistieron en T1 (31 días x 15 cm), T2 (31 días x 30 cm), T3 (41 días x 15 cm), T4 (41 días x 30 cm), T5 (51 días x 15 cm) y T6 (51 días x 30 cm). Para la variable altura de planta se mostró diferencia altamente significativa entre tratamientos, el mejor tratamiento fue T6 con 71 cm y el de menor promedio fue el tratamiento T1 con 41 cm. En la variable materia verde el T1 produjo 23,75% más de forraje verde en relación al tratamiento T6 esto representa a 7.981 kg/mv/ha. Para la variable materia seca se produjo un promedio de 8.215 kg/ms/ha entre tratamientos, donde el T1 produjo 22,39 % más que el T2, equivalente a 2.126 kg/ms/ha. La tasa de crecimiento para los tratamientos fue de 39 kg/ ha/ día de materia seca en promedio. La variable carga animal en promedio fue de 821,5 U.A./ha/a, el T1 fue 22 % superior al T2 equivalente a 213 U.A/ha. Finalmente, el mejor tratamiento a utilizar durante la época estival es el T1 ya que este tratamiento permite explotar al máximo el potencial productivo de la pastura.

Palabras claves: manejo, *Brachiaria brizantha*, frecuencia de corte, altura de corte



Introducción

Según el Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA, 2018) en el Paraguay hay un total de 145.025 productores de ganado con una población bovina de 13.500.965 cabezas, con estatus sanitario libre de fiebre aftosa con vacunación.

En el ámbito de la producción bovina, ya sea este de carne o leche, las pasturas cultivadas de diferentes especies representan la fuente de alimento más viable y económico para el productor, donde los pastizales son sometidos a constantes pastoreos.

La comprensión de los efectos del pastoreo sobre la planta requiere conocimiento y análisis de las alteraciones morfológicas y fisiológicas provocadas por este proceso. Esos son las consecuencias de la severidad y la frecuencia de defoliación, del tiempo de rebrote (en el caso de pastoreo rotativo) y de la interacción entre defoliación y factores ambientales (Dos Santos *et al.*, 2011).

Objetivo

El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la altura de corte y frecuencia de corte sobre la producción forrajera de *Brachiaria brizantha* cv. MG4, por medio de la altura de planta, el rendimiento de materia verde, rendimiento en materia

seca, la tasa de crecimiento del pastizal y la carga animal con diferentes alturas y frecuencias de corte en *Brachiaria brizantha* cv. MG4 en su cuarto año de producción.

Materiales y métodos

La unidad experimental se instaló en el Campo Experimental de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional del Este, ubicado sobre la ruta Py 02, en el Distrito de Minga Guazú, departamento de Alto Paraná, en una parcela experimental de *Brachiaria brizantha* cv. Mg4, en su cuarto año de producción, el cual fue implantada en el año 2015.

El suelo pertenece al orden Oxisol, gran grupo Kandiodox subgrupo taxonómico *Rhodic Kandiodox*, de textura franca arcillosa. Alto potencial de producción por sus excelentes propiedades físicas (Gorostiaga *et al.*, 1995).

El diseño experimental que se utilizó es el de bloques completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 2 que corresponde al Factor A con 3 Frecuencias de corte y al Factor B con 2 Alturas, teniendo 4 bloques de 6 tratamientos, por tanto, totalizando 24 unidades experimentales.

El área total del experimento fue de 495,72 m² de superficie, cada unidad experimental tuvo las siguientes medidas 4,05 m x 5, 10

m, es espacio entre bloques de 1, 50 m. La parcela útil de cada unidad experimental tuvo una dimensión de 2 x 2 m, siendo así 4 m².

El análisis estadístico se realizó en base a los resultados del cuadro de análisis de varianza (ANAVA), para la comparación de medias se utilizó el test de tukey al 5 % de posibilidad de error por medio de programas, tales como, infoStat y agroEstat.

Los tratamientos consistieron en diferentes frecuencias y alturas de cortes. La frecuencia de corte fue a los 31 días con 15 cm y 30 cm de altura, a los 41 días con 15 cm y 30 cm de altura, a los 51 días con 15 cm y 30 cm de altura. La distribución de los tratamientos es presentada en la tabla 1.

Tabla 1 Descripción de los tratamientos, sobre la frecuencia y altura de corte. Minga Guazú. 2019.

Tratamiento	Factor A	Factor B
Tratamiento 1	Frecuencia 1:	Altura 1: 15 cm
Tratamiento 2	31 días	Altura 2: 30 cm
Tratamiento 3	Frecuencia 2:	Altura 1: 15 cm
Tratamiento 4	41 días	Altura 2: 30 cm
Tratamiento 5	Frecuencia 3:	Altura 1: 15 cm
Tratamiento 6	51 días	Altura 2: 30 cm

Resultados y discusión

Altura de planta

En el análisis de varianza para la variable altura de plantas se detectó diferencia altamente significativa entre los

tratamientos, como se puede observar en la Tabla 2 el tratamiento T6 (Frecuencia 51 días x Altura 30 cm) fue estadísticamente superior pero no difiere del tratamiento T4 (Frecuencia 41 días x Altura de corte 30cm) y T5 (Frecuencia 51 días x Altura de corte 15 cm) por el contrario el de menor resultado fue el tratamiento T1 (Frecuencia 31 días x Altura 15 cm), los demás tratamientos fueron estadísticamente iguales.

Tabla 2 Altura de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. MG4 con dos alturas y tres frecuencias de corte – Cuarto año de evaluación, Minga Guazú 2019

Tratamiento	Frecuencia de corte x Altura de corte	Medias (cm)
T6	Frecuencia 51 días x Altura 30 cm	71 a
T4	Frecuencia 41 días x Altura 30 cm	66 a
T5	Frecuencia 51 días x Altura 15 cm	64 ab
T2	Frecuencia 31 días x Altura 30 cm	55 bc
T3	Frecuencia 41 días x Altura 15 cm	51 c
T1	Frecuencia 31 días x Altura 15 cm	41 d

*Valores medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,5$)

Con respecto al Factor A correspondiente a la frecuencia de corte la mayor altura de la planta se registró con tratamientos cortados a los 51 días, seguidos de las frecuencias de cortes a los 41 días y 31 días respectivamente. En el caso del mejor resultado con mayor frecuencia de corte (51 días), podría deberse a que la planta tuvo más tiempo para desenvolverse,



donde la planta tiene una mayor acumulación de reservas que fue destinado a la producción tallos más largos.

Los largos períodos de descanso dan lugar a cambios indeseables en la estructura del dosel forraje, caracterizado por la elevación de la participación de los tallos y material muerto. Este hecho puede dar lugar a pérdidas de forraje por la acción de pastoreo (Carnevali *et al.*, 2006).

De igual forma, el Factor B que es la altura de corte arrojó que plantas cortadas a 30 cm dan mayores alturas de planta en relación a las cortadas a 15 cm. Esto podría deberse a que la competencia por la luz fue mayor para plantas cortadas a 30 cm puesto que la radiación solar ya no llegaba a hojas inferiores, por lo tanto, se pudo activar yemas apicales creciendo así en elongación, por el contrario, los de menor valor se debió a que la cantidad de luz que llegó a estas plantas fue mayor activando yemas axilares durmientes.

Resultados similares encontraron Dos Santos *et al.* (2011), manifiestan que la altura pre-corte del dosel varía con la altura y el intervalo de corte, pero no la interacción altura x corte. Donde encontraron mayores valores de altura de pre-corte en plantas cortadas a 30 cm.

Materia verde

Para la variable materia verde el análisis de varianza detectó diferencia no significativa entre los tratamientos, como se puede observar en la Tabla 3, todos los tratamientos fueron estadísticamente similares, con un rendimiento promedio de 29.826 kg/mv/ha.

Sin embargo, al realizar una comparación simple de medias se puede constatar que el tratamiento T1 (31 días x 15 cm) produjo 23,75% más de forraje verde en relación a al tratamiento T6 (51 días x 30 cm), esto representa a 7.981 kg/mv/ha.

Tabla 3 Materia verde de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. MG4 con dos alturas y tres frecuencias de corte – Cuarto año de evaluación, Minga Guazú 2019

Tratamiento	Frecuencia de corte x Altura de corte	Medias (kg/mv/ha)
T1	Frecuencia 31 días x Altura 15 cm	33.606
T5	Frecuencia 51 días x Altura 15 cm	32.075
T3	Frecuencia 41 días x Altura 15 cm	30.394
T4	Frecuencia 41 días x Altura 30 cm	29.331
T2	Frecuencia 31 días x Altura 30 cm	27.925
T6	Frecuencia 51 días x Altura 30 cm	25.625

*Valores medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,5$)

Para el Factor A correspondiente a la frecuencia de corte, los de 31 días resultaron en un rendimiento de materia verde mayor a los 41 días y 51 días.



Esto podría deberse a que las pasturas crecen con mayor vigor a medida que se le exige en frecuencia (menor frecuencia entre cortes).

Esto se constata con el trabajo de Costa *et al.* (2007), que mencionan que el aumento en el intervalo de corte en *Brachiaria brizantha* cv. Mg5 determina aumentos en la producción de masa seca, sin embargo, el inverso se puede observar en el contenido de PB. La planta, cuando es nueva, presenta altos niveles de agua, cuanto más cerca de su madurez este contenido es reducido y se produce un aumento en los contenidos de MS.

Otro hecho a considerar es el de Trindade *et al.* (2007), que afirma que pastos sometidos a períodos de descanso más largos, como los del 100% de la IL (intensidad lumínica), tenían una presencia significativa de tallo y material muerto en el estrato de pastoreo.

En el factor B altura de corte, los tratamientos cortados a 15 cm de altura tuvieron 14 % más de producción en relación a los cortados a 30 cm, esto equivale 4.369 kg/mv/ha. Esto podría ser porque a medida que se corta la planta esta tiene luz de mayor calidad que llega a hojas cercanas al suelo, entonces la planta produce tallos secundarios, estas a medida que se le exigía en altura de corte crecían

a un ritmo más acelerado, por el contrario, cortes hechos con 30 cm de altura como es el caso del T6, permitieron que las yemas axilares de los tallos anulen su rebrote por no llegar suficiente cantidad de luz y siguieron produciendo fotosíntesis facilitando la elongación de tallos y hojas. Hecho que constata Galeano (2015), en su trabajo de tesis realizado en el campo experimental de la F.I.A-U.N.E que la altura de corte o pastoreo cambian la localización de las yemas que soportan el rebrote. Si se corta cerca del suelo se producirán rebrotes en la base de los tallos y rizomas, los cortes a mayor altura permiten que las yemas axilares de los tallos anulen su turno de rebrote de las yemas que están por debajo de ellas.

Tal es el caso de Dos Santos *et al.* (2011), que mencionan que la altura de corte de 15 cm asegura a las plantas mayor cantidad de radiación solar de mejor calidad para hojas cerca del suelo, activando así yemas latentes. Por lo tanto, si se corta cerca del suelo se produjeran rebrotes en la base los tallos y rizomas.

Materia seca

En el análisis de varianza para la variable materia seca no detectó diferencia significativa entre tratamientos.

Todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales con un promedio

de medias de 8.215 kg/ms/ ha. Datos similares encontró Galeano (2008), en las 18 semanas de evaluación reportó una producción de 9.637 kg/ms/ha para la B. brizantha cv. MG4.

Tabla 4 Materia seca de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. MG4 con dos alturas y tres frecuencias de corte – Cuarto año de evaluación, Minga Guazú 2019

Tratamiento	Frecuencia de corte x Altura de corte	Medias (kg/ms/Ha)
T1	Frecuencia 31 días x Altura 15 cm	9.497
T3	Frecuencia 41 días x Altura 15 cm	8.221
T6	Frecuencia 51 días x Altura 30 cm	8.162
T5	Frecuencia 51 días x Altura 15 cm	8.041
T4	Frecuencia 41 días x Altura 30 cm	7.996
T2	Frecuencia 31 días x Altura 30 cm	7.371

*Valores medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,5$)

Resultados de medias demuestran que el T1 produjo 22,39 % más que el T2, equivalente a 2.126 kg/ms/ha.

En cuanto a la producción de materia seca los tratamientos cortados a 15 cm tuvieron mayor rendimiento, esto podría ser porque en los cortes hechos a esta altura se recolectaron mayor cantidad de tallos en relación a los de 30 cm en los cuales presentaron una mayor cantidad de hojas recogidas. Como menciona Galeano (2015), que al disminuir la altura de corte se elimina gran parte del área foliar.

Mientras que cortando a alturas mayores la pastura queda con mayor cantidad de hojas que continúan realizando fotosíntesis.

Hecho que difiere con el trabajo de investigación de Echeverría *et al.* (2012) en pasto *Brachiaria brizantha* cv. Piatã, muestran que la tasa de acumulación de forraje fue menor para el pasto con 15 cm altura del dosel, las medias estándar fueron de 61,1 (altura de 15 cm); 86,1 (altura de 30 cm) y 91,3 (altura de 45 cm) \pm 4,9 kg/ha/día de MS, respectivamente.

Tasa de crecimiento

Tabla 5 Tasa de crecimiento de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. MG4 con dos alturas y tres frecuencias de corte – Cuarto año de evaluación, Minga Guazú 2019

Tratamiento	Frecuencia de corte x Altura de corte	Tasa de crecimiento (kg/ms/ha/d)
T1	Frecuencia 31 días x Altura 15 cm	44
T3	Frecuencia 41 días x Altura 15 cm	40
T6	Frecuencia 51 días x Altura 30 cm	40
T5	Frecuencia 51 días x Altura 15 cm	39
T4	Frecuencia 41 días x Altura 30 cm	39
T2	Frecuencia 31 días x Altura 30 cm	34

*Valores medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,5$)

En la tabla 5, se presenta los resultados de la variable tasa de crecimiento diario, como se observa el análisis de varianza no presentó diferencia significativa para los

tratamientos, los cuales fueron estadísticamente iguales, con un promedio de 39 kg/ms/ha.

La mayor tasa de crecimiento se registró en cortes a 15 cm altura, esto podría deberse que realizando cortes a menor altura se promueven ramificaciones secundarias, obteniéndose así mayor número de tallos que se desarrollaban, lo que implica una mayor ganancia en kilogramos en relación a los cortados a 30 cm que crecieron cobertura foliar. Lo que concuerda con Vanegas (2015), por otro la planta recibe mayor cantidad radiación y de mejor calidad en las hojas próximas al suelo, activando las yemas axilares.

Carga animal

En la variable carga animal el análisis de varianza resultó no significativo para los tratamientos, estos fueron estadísticamente iguales con un promedio de 821,5 U.A./ha/a.

Esto pudo deberse a la mayor capacidad de producción de materia seca del tratamiento T1 (Frecuencia 31 días x Altura 15 cm) con 950 U.A/ha en relación al T2 (Frecuencia 31 días x Altura 15 cm) 737 U.A/ha, siendo 22 % mayor equivalente a 213 U.A/ha

Tabla 6 Carga animal de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. MG4 con dos alturas y tres frecuencias de corte – Cuarto año de evaluación, Minga Guazú 2019

Tratamiento	Frecuencia de corte x Altura de corte	Medias (U.A/há/a)
T1	Frecuencia 31 días x Altura 15 cm	950
T3	Frecuencia 41 días x Altura 15 cm	822
T6	Frecuencia 51 días x Altura 30 cm	816
T5	Frecuencia 51 días x Altura 15 cm	804
T4	Frecuencia 41 días x Altura 30 cm	800
T2	Frecuencia 31 días x Altura 30 cm	737

*Valores medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,5$)

Datos que concuerda con González (2018) en trabajos anteriores en esta pastura, que reporto que el tratamiento T1 (31 días x 15 cm) fue el de mejor rendimiento en carga animal con un valor de 657 unidades animales

Conclusión

A partir de este trabajo de investigación se puede llegar a las siguientes conclusiones

Para la variable altura de planta se mostró diferencia altamente significativa entre tratamientos, el mejor tratamiento fue T6 (51 días y 30 cm) con 71 cm y el de menor promedio fue el tratamiento T1 (31 días y 15 cm) con 41 cm.



Luego de obtener los datos de la variable materia verde, se pudo observar que no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Mediante la comparación simple de medias se constató que el tratamiento T1 (31 días x 15 cm) produjo 23,75% más de forraje verde en relación a al tratamiento T6 (51 días x 30 cm), esto representa a 7.981 kg/mv/ha.

Para la variable materia seca se produjo un promedio de 8.215 kg/ms/ha entre tratamientos, resultados de medias demuestran que el T1 produjo 22,39 % más que el T2, equivalente a 2.126 kg/ms/ha.

La tasa de crecimiento para los tratamientos fue de 39 kg/ha/día de materia seca en promedio.

Calculando para la variable carga animal no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. Con un promedio de 821,5 U.A/ha/a, el T1 (31 días x 15 cm) fue 22 % superior al T2 (31 días x 30 cm) equivalente a 213 U.A/ha

Finalmente, en función a lo expuesto anteriormente, se puede determinar que el mejor tratamiento a utilizar durante la época estival es el T1 (Frecuencia de corte 31 días x altura de corte 15 cm) ya que este tratamiento permite explotar al máximo el potencial productivo de la pastura.

Referencias bibliográficas

- Carnevali, R.A.; Silva, S.C.; Oliveira, A.A.; Uebele, M.C.; Bueno, F.O.; Hodgson, J.; Silva, G.N y Morais, J.P. (2006). *Herbage production and grazing losses in Panicum maximum cv. Mombaça pastures under four grazing managements*. Tropical Grasslands, 40 (3),165-176.
- Costa, K.; Pereira, I.; Faquin, V.; Pereira Das Neves, B.; Rodrigues, C; Y De Menezes, F. (2007). *Intervalo de cor intervala de corte na produção de massa seca e composição na produção de massa seca e composição química-bromatológica da Brachiaria brizantha cv. MG-5*. Ciênc. agrotec., Lavras, 31 (4), 1197-1202.
- Dos Santos, G et al. 2011. *Características morfogênicas e estruturais do capim-marandu submetido a combinações de alturas e intervalos de corte*. Revista Brasileira de Zootecnia 40 (5), 955-963
- Echeverria, D. M. da S.; Euclides, V. P. B.; Montagner, D. B.; Almeida, R. G. de; Carpejani, G. C.; Nantes, N. N. (2012). *Densidade de perfilhos, taxa de acúmulo de forragem e estrutura do dossel de capim-piatã sob lotação continua: produção animal no mundo em transformação*. Conferencia



llevada a cabo en el congreso Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, Brasília.

Galeano, P. 2008. *Evaluación agronómica de tres especies del género Brachiaria y Stylosanthes cv. Campo Grande en forma pura y consorciada durante la etapa del establecimiento*. Tesis (Ingeniero Agrónomo). San Lorenzo, Paraguay: Carrera de Ingeniería Agronómica. FCA. UNA. 45 p.

González, C. (2018). *Efecto de la frecuencia y altura de corte en la producción forrajera de Brachiaria brizantha cv. Mg4, tercer año de evaluación*. (tesis de grado). Facultad de Ingeniería Agronómica. Minga Guazú, Paraguay

Gorostiaga, O.; González, E.; Llamas, P.; Molinas, A.; Franco, E.; García, S. Y Ríos, E. (1995). *Estudio de reconocimiento de suelos, capacidad de uso de la tierra y propuesta de ordenamiento territorial preliminar de la región oriental del Paraguay*. Asunción, Paraguay.

SENACSA (Servicio Nacional de calidad y salud animal). (2018). *Estadística Pecuaria: primer cuatrimestre*. Asunción, Paraguay. 12 p

Trindade, J.; Silva, S.; Souza, S.; Giacomini, A.; Varesqui, C.; Guarda, V. Y Faccio, P. (2007). *Composição*

morfológica da forragem consumida por bovinos de corte durante o rebaixamento do capim-marandu submetido a estratégias de pastejo rotativo. Pesq. agropec. bras., Brasília, 42 (6), 883-890.

Vanegas, L. (2015). *Dinámica de crecimiento y criterios de pastoreo para optimizar el uso de praderas Brachiaria brizantha cv. Toledo*. Universidad de Lasalle. Bogota (Col). 252p.

Financiamiento

El presente trabajo fue autofinanciado con la colaboración de FIA-UNE para el desarrollo de los ensayos.

Agradecimientos

A mi familia por acompañarme en cada proyecto y sueño

Al profesor Ing. Agr. Orlando Ortiz, por su acompañamiento y orientación en el proceso de elaboración de este trabajo de investigación

Geração de malhas triangulares em geofísica



C.27. Matemática Aplicada

Geração de malhas triangulares em geofísica

Autor: Tonello Pereira, Henrique, h261102@dac.unicamp.br

Orientador: Biloti, Ricardo, rbiloti@dac.unicamp.br

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

1 Resumo

Neste projeto, analisamos a geração de malhas, em especial as triangulações de Delaunay, para desenvolver soluções em problemas de geofísica computacional. A motivação para o estudo dessas triangulações se justifica pela sua propriedade de evitar triângulos degenerados, ou seja, aqueles que possuem um ângulo muito pequeno, pois a aplicação de tais triângulos na resolução de equações diferenciais pode ocasionar dificuldades numéricas.

Inicialmente, buscamos entender como as triangulações de Delaunay são formadas, suas vantagens e como obtê-las partindo de uma triangulação arbitrária. A partir daí, nos voltamos para resultados que caracterizam uma triangulação de Delaunay, os quais forneceram critérios para gerar essas triangulações. Desenvolvemos ainda um entendimento aprofundado do processo de obtenção dessas triangulações através da elaboração de diversos algoritmos, que são continuamente aperfeiçoados.

Concluído este processo, partimos para a

criação de malhas que pudessem representar estruturas geológicas para explorar a solução da equação da onda em meios acústicos suaves pelo traçamento de raios. Para isso, estudamos uma técnica para ajustar malhas triangulares por uma curva, mantendo a qualidade de sua malha, isto é, fosse ainda uma triangulação de Delaunay.

2 Introdução

A ideia da geração de malhas consiste em decompor um domínio geométrico de forma a representar informações em pequenas células. Neste projeto trabalhamos com malhas triangulares em 2D, isto é, regiões no plano decompostas por triângulos.

Malhas triangulares são muito importantes em computação gráfica, pois diversos objetos são mapeados por malhas para serem renderizados ou submetidos a outros métodos de imagem. Na cartografia, geografia, entre outros, os terrenos podem ser representados por meio de malhas, fornecendo uma representação mais compacta das informações da região.



As triangulações de Delaunay foram utilizadas por fornecerem um bom conjunto de triângulos para usar como polígonos em malhas. Em particular, por evita triângulos estreitos (a resolução de equações diferenciais utilizando-se malhas com esses triângulos, por exemplo, leva a dificuldades numéricas).

3 Objetivos

O foco inicial da pesquisa foi estudar o processo de geração de uma malha de qualidade, em especial de triangulações de Delaunay no plano. Desejamos entender como são definidas e sobre o processo de construção, tanto teórico quanto computacional, de geração de uma malha de qualidade.

Outro aspecto do projeto foi desenvolver algoritmos que refletissem os processos estudados, isto é, que fosse possível também gerar uma malha triangular de qualidade ao final do projeto. Isso permitiu que várias ferramentas úteis a manipulação de malhas fossem criadas, resultando na aplicação dessa teoria em um problema sísmico.

Recentemente, temos utilizado essas ferramentas para gerar malhas que possam representar estruturas geológicas para explorar soluções numéricas da equação da onda pelo traçamento de raios em meios acústicos, os quais são discretizados por essas malhas. O método para explorar essas so-

luções ainda está sendo estudado, mas esperamos implementá-lo em breve.

4 Materiais e Métodos

A principal referência do projeto foi [Edelsbrunner, 2001], que continha a base teórica do estudo. Como apoio ao desenvolvimento computacional, nos baseamos também em [O'Rourke, Joseph, 1998]. Empregamos ainda o ambiente de computação numérica [John W. Eaton and Wehbring, 2014] para colocar em prática o entendimento do conteúdo, implementar os algoritmos criados, testar e validar ideias.

Também utilizamos o [Hohenwarter et al., 2013] como uma ferramenta para entender conceitos estudados e trabalhar ideias iniciais antes de desenvolver os algoritmos. Além disso, a aplicação do trabalho tem sido baseada no estudo descrito no artigo [Zaide and Ollivier-Gooch, 2014].

5 Resultados e discussão

Para entender o que são triangulações de Delaunay, devemos estabelecer alguns conceitos antes. Considere um conjunto de pontos S no plano. Chamamos de *fecho-convexo* do conjunto S o menor polígono convexo que contém todos os pontos de S . Chamamos de *triangulação* uma decomposição do fecho-convexo por triângu-

los, que se intersectam no máximo em arestas e têm como vértices os pontos de S .

As triangulações de Delaunay, por sua vez, são um tipo específico de triangulação que maximiza o ângulo interno mínimo dos triângulos e evita triângulos estreitos. Um exemplo é apresentado na figura 1.

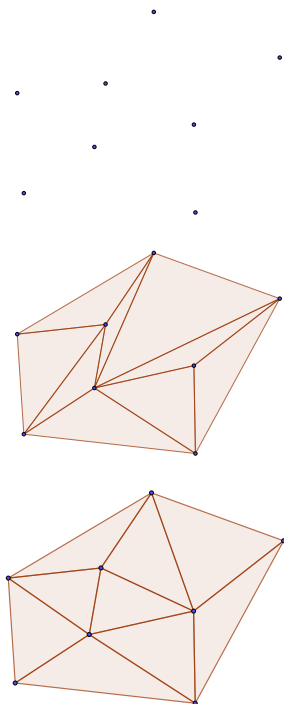


Figura 1: Na primeira imagem, vemos um conjunto de pontos no plano. Ao meio, mostramos um exemplo de triangulação que poderia ser criada a partir destes pontos. Por último, mostramos uma triangulação de Delaunay desses pontos.

Essencialmente, a definição de *triangulação de Delaunay* vem do conceito de *diagramas de Voronoi*. A *Região de Voronoi* de um ponto $x \in S$ é o conjunto de pontos do plano que está mais próximo de x do que de qualquer outro ponto do conjunto S . As regiões equidistantes a dois pontos são representadas

por uma linha, e o conjunto dessas linhas formam um diagrama de Voronoi. Uma triangulação de Delaunay, por sua vez, é o conjunto de triângulos em que cada aresta conecta os pontos que possuem regiões de Voronoi adjacentes. Esses conceitos estão ilustrados na Figura 2.

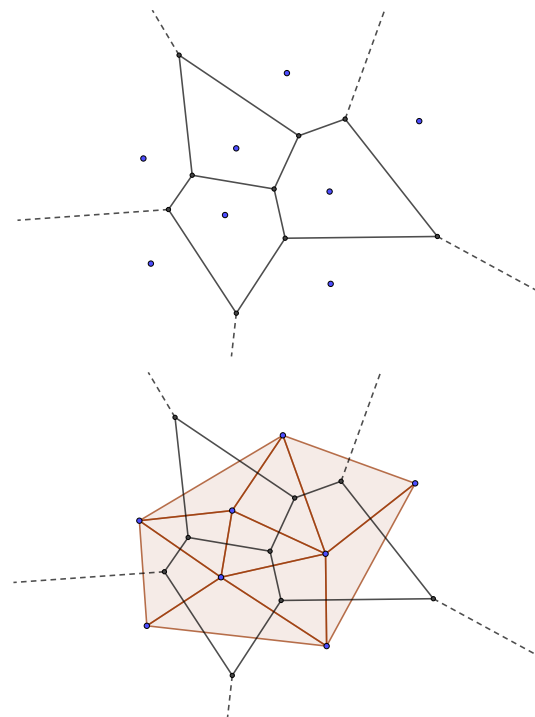


Figura 2: Acima, temos um diagrama de Voronoi e na imagem de baixo temos uma triangulação de Delaunay.

Chamamos de *circuncírculo* o círculo formado a partir dos 3 vértices de um triângulo, o qual é dito *vazio*, se não há nenhum ponto da malha em seu interior. Um teorema nos dá uma nova interpretação dos triângulos de Delaunay:

Teorema 5.1 Afirmação do Circuncírculo: *Seja $S \subset \mathbb{R}^2$ um conjunto finito de pontos, e considere $a, b, c \in S$. Então abc*

é um triângulo de Delaunay se, e somente se, o circuncírculo de abc é vazio.

Com isso, é possível transformar triangulações quaisquer em triangulações de Delaunay realizando uma "troca de arestas" para satisfazer a propriedade de ser Delaunay. Veja na Figura 3.

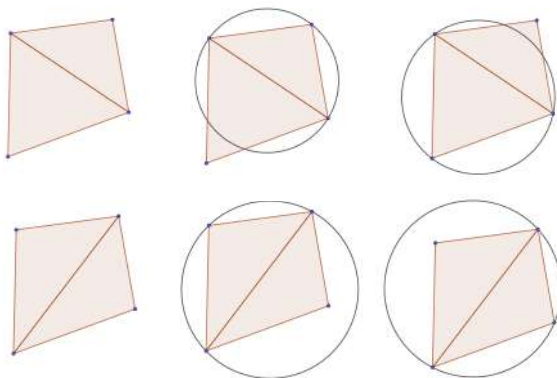


Figura 3: Na primeira linha nenhum triângulo é Delaunay, isto é, o circuncírculo de cada triângulo não é vazio. Na segunda linha, com uma mudança de arestas, todos os triângulos são Delaunay.

Contudo, o custo computacional para verificar se um triângulo é Delaunay pode ser consideravelmente alto. Intuitivamente, é necessário calcular duas mediatrizes do triângulo para encontrar o circuncentro, isto é, o centro do circuncírculo, calcular a distância entre o circuncentro e um vértice e a distância entre o circuncentro e o ponto para enfim compará-las.

Alternativamente, consideramos um espaço tridimensional. Sejam a' , b' , c' e d' as projeções verticais de a , b , c e d , no plano xy , em um parabolóide definido por

$\Pi : z = x^2 + y^2$, como ilustrado na Fig.4.

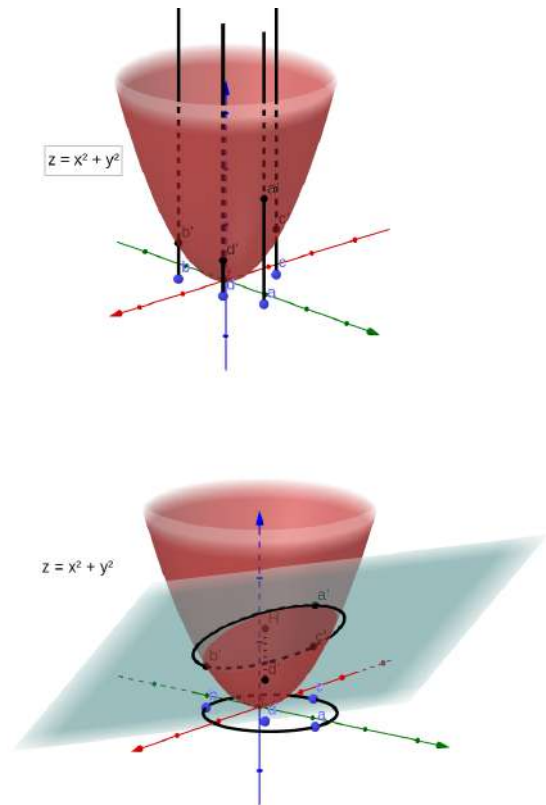


Figura 4: Parabolóide com as projeções verticais dos pontos no plano xy e o plano formado por três desses pontos.

Com essa noção, podemos apresentar o seguinte resultado.

Teorema 5.2 Afirmação do Círculo Elevado: *Um ponto d está dentro do circuncírculo de abc se, e somente se, o ponto d' está verticalmente abaixo do plano passando por a' , b' e c' .*

Assim, o cálculo para verificar se um triângulo é Delaunay se resume em verificar o sinal do determinante 4×4 para analisar a posição do 4º ponto em relação ao plano. Na matriz, a primeira coluna possui apenas

1, cada outra coluna possui as coordenadas de x , y e z referente aos 4 pontos. Se o ponto estiver abaixo do plano, então o sinal do determinante é negativo.

Com esses conceitos foi possível desenvolver e implementar um algoritmo para produzir triangulações e então transformá-las em triangulações de Delaunay trocando suas arestas.

Passamos também a estudar condições que poderiam ser impostas a essas triangulações. Imagine por exemplo que estamos usando uma malha para representar uma grande região e que há um rio que passa por essa região. Dependendo do que estamos querendo representar, a malha deverá se adequar ao rio, isto é, não poderão ser formados triângulos que sobrepõe o rio. Uma forma de representar uma situação com essa seria fazer com que alguns segmentos fossem fixos.

Triangulações construídas com imposições como esta são ditas *triangulações restritas*. Neste caso, nem sempre é possível criar triangulações de Delaunay para o conjunto de pontos, mas podemos considerar uma parte delimitada pela restrição e tentar construir uma triangulação de Delaunay para um certo conjunto, pensando que as regiões através das arestas fixas são "invisíveis" umas às outras. Chamamos triangulações como essas de

triangulações de Delaunay restritas.

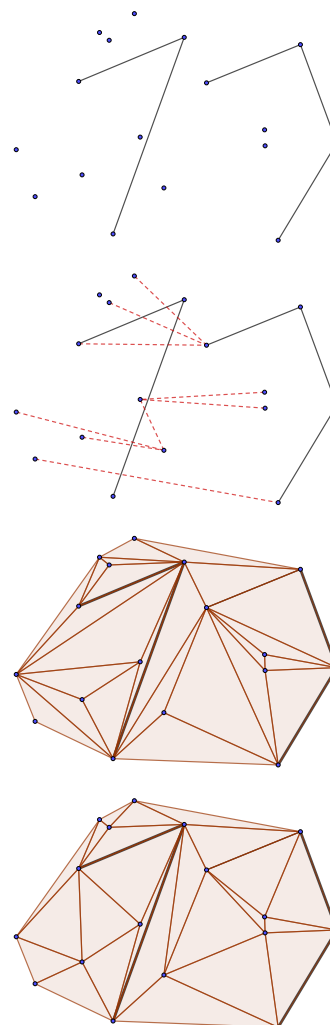


Figura 5: Na primeira linha apresentamos um conjunto de pontos e um conjunto de arestas fixas, além disso, a segunda imagem mostra um conjunto de segmentos que são "impossíveis". A terceira imagem apresenta uma triangulação restrita e por fim uma triangulação de Delaunay restrita para estes pontos, respectivamente.

Além de obter uma triangulação de Delaunay, era importante entender o processo de "trocar as arestas". Contudo, era necessário também implementar um programa que pudesse criar uma triangulação qualquer para um conjunto de pontos dados. Iniciamos com a ideia de delimitar a região da triangu-

lação pelo fecho. Em seguida, ignorávamos os pontos na fronteira da região e encontrávamos um novo fecho. Isso foi feito até que não fosse mais possível e, por fim, ligamos os fechados um a um. Essa ideia faz com que uma triangulação com muitos pontos fique parecida com uma rosa, cheia de camadas de pétalas em sequência.

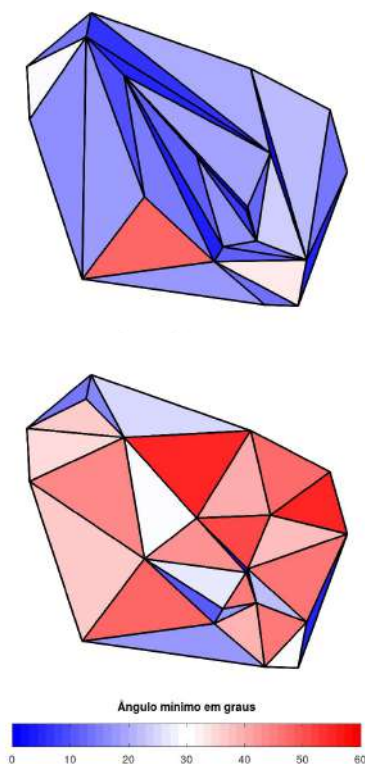


Figura 6: Acima, uma triangulação inicial produzida a partir de 20 pontos. Abaixo, uma triangulação de Delaunay para o mesmo conjunto de pontos.

Para a triangulação de Delaunay, fizemos um *loop* sobre as arestas. Para cada aresta considerávamos os dois triângulos que a possuíam e utilizávamos o resultado consequente do Teorema 5.2. Um exemplo de uma triangulação inicial e uma triangulação

de Delaunay podem ser visto na Figura 6.

Com isso, era possível criar uma malha triangular de Delaunay para qualquer conjunto de pontos dados. Um experimento inicial que fizemos foi explorar diversos conjuntos de pontos para visualizar suas triangulações. Veja, por exemplo, uma triangulação de Delaunay de vários pontos formando a logo da Unicamp na Figura 7.

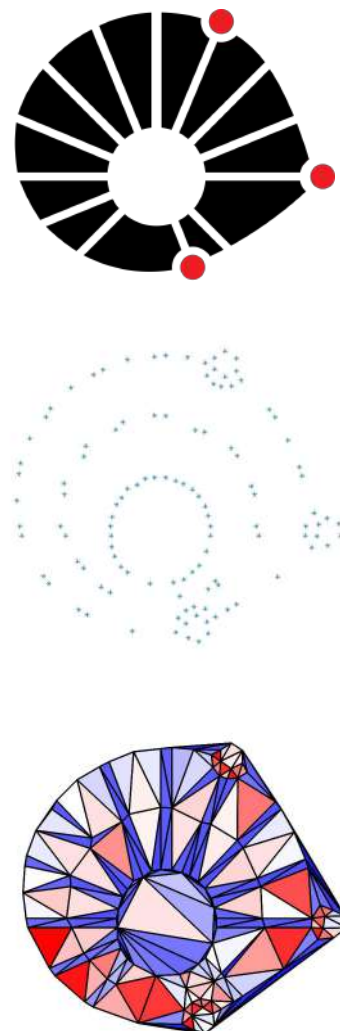


Figura 7: Triangulação produzida pelo Octave a partir de pontos escolhidos pelo aluno para representar o logo da Unicamp.

Neste momento, o foco do projeto passou



a ser aplicar os algoritmos que já havíamos desenvolvido. O problema que nos propomos a resolver consiste em explorar uma solução numérica da equações da onda pelo traçamento de raios em meios acústicos suaves discretizados em malhas triangulares. Espera-se também conseguir construir malhas menos densas e mais ajustadas aos contornos geológicos.

Neste caso, é suficiente utilizar aproximações assintóticas de alta frequência (raios) para a equação da onda. A cinemática e dinâmica de eventos de transmissão e reflexão são bem descritos por essas aproximações, mas isso não ocorre com difrações.

No traçamento de raios, cada raio é computado integrando-se um sistema com 19 equações diferenciais ordinárias de primeira ordem, mas em casos simples, como em meios acústicos homogêneos ou com velocidade afim, é possível encontrar solução exata para esse sistema de equações.

Além disso, para representar meios homogêneos na malha, devemos considerar que em cada célula a velocidade de propagação é descrita por uma função afim.

O primeiro passo para isso foi a utilização das ferramentas já implementadas no desenvolvimento de um algoritmo que pudesse de executar o método ilustrado em (Zaide,2001) [Zaide and Ollivier-Gooch, 2014]. O artigo apresenta uma maneira

de alterar uma malha pré-existente incorporando uma curva qualquer a ela.

Isso é útil para a simulação de contornos geológicos em um domínio. Então, com o estudo de campos escalares em células triangulares, é possível analisar o problema de traçado de raios em duas dimensões.

Computacionalmente, esse processo de ajuste da malha se divide em cinco etapas: inserir uma curva; definir uma escala de comprimento para a distância entre os pontos na curva para anexá-los á malha; remover pontos próximos a curva; inserir os pontos da curva e criar novos triângulos; ajustar a malha à curva. Esses passos foram ilustrados na página 10.

Então era necessário criar uma malha e, pela facilidade de implementação, foram utilizadas malhas triangulares regulares. Além disso, nos testes realizados, funções afim foram incorporadas às malhas, pois eram suficientes para analisar o comportamento da escala de comprimento na malha.

Como no artigo, precisamos definir essa escala, que é utilizada para determinar a distância entre um ponto e outro e é calculada considerando a posição do ponto no triângulo em que está inserido e de como a malha está organizada em torno deste triângulo. Para entender o cálculo e comportamento dessa função de escala de comprimento, realizamos diversas simulações utili-

zando o software *GeoGebra*.

A escala de comprimento de um ponto p é dada por

$$LS(p) = \lambda_1 \cdot LS(v_1) + \lambda_2 \cdot LS(v_2) + \lambda_3 \cdot LS(v_3)$$

Onde v_1, v_2 e v_3 são os vértices do triângulo que contém o ponto p e λ_1, λ_2 e λ_3 são as coordenadas baricêntricas do ponto. Quando v é um vértice de um triângulo:

$$LS(v) = \left(4 \cdot \frac{\sum_{i=1}^N A_i}{N} \bigg/ \sum_{i=1}^N \theta_i \right)^{1/2}$$

Em que cada A_i é a área de um triângulo que também tem como vértice o ponto v , e θ_i é o ângulo de cada triângulo no vértice v

Enfrentamos algumas dificuldades na implementação desse passo, pois a forma com que os dados da malha triangular eram dispostos não facilitavam a navegação entre triângulos. Em outras palavras, não era fácil analisar o contigüência dos pontos em triângulos da malha de forma eficiente.

Então nossa atenção se voltou a implementar uma estrutura de dados eficiente para esse tipo de problema: o *winged-edge*.

Por fim, utilizou-se o estudo da linguagem C com foco na estrutura de dados para implementar a versão final do programa no Octave, gerando uma tabela de informações particular á estrutura.

Quando essa de dados é utilizada para malhas triangulares, o ponto C e E coinci-

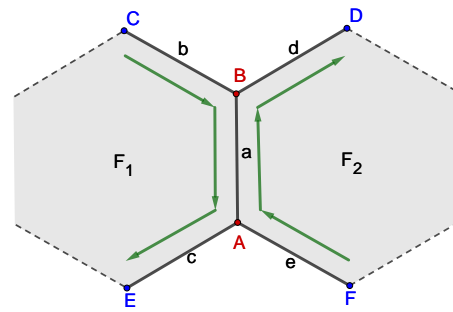


Figura 8: Estrutura de dados Winged-Edge.

dem, o mesmo ocorre para D e F.

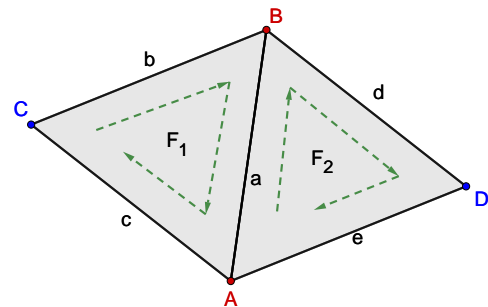


Figura 9: Triangulação com 5 arestas.

Para elucidar como a escolha dessa estrutura de dados é crucial para resolver o problema eficientemente, apresentaremos um exemplo. Sem utilizar a estrutura de dados, as informações que temos provenientes dessa triangulação, são descritos na tabela 1:

Nesse caso há apenas 4 pontos, então olhando para a tabela de faces podemos formar a triangulação. No entanto, aumentando a quantidade de pontos da malha, seria cada vez mais difícil obter informações sobre a topologia da triangulação apenas olhando as tabelas.

Tabela de pontos

Ponto	x	y
A	x_A	y_A
B	x_B	y_B
C	x_C	y_C
D	x_D	y_D

Tabela de arestas

Aresta	Pontos	
a	A	B
b	B	C
c	A	C
d	B	D
e	A	D

Tabela de faces

Face	Arestas		
F_1	A	B	C
F_2	A	B	D

Tabela 1: Tabelas utilizadas no problema de geração de malhas sem winged-edge.

Utilizando a estrutura *winged-edge* podemos formar uma tabela com muitas informações que nos guiam pela malha. É importante ressaltar que a tabela de pontos do caso anterior também se faz necessária nesse caso.

Aresta	Ponto		Face	
	inicio	fim	esquerda	direita
a	A	B	F_1	F_2
b	C	B	0	F_1
c	A	C	0	F_1
d	B	D	0	F_2
e	D	A	0	F_2

Aresta	Aresta esquerda		Aresta direita	
	pred.	suc.	pred.	suc.
a	b	c	e	d
b	0	0	c	a
c	0	0	a	b
d	0	0	a	e
e	0	0	d	a

Tabela 2: Tabela formada utilizando o Winged-Edge.

Dizer que a tabela fornece detalhes da topologia da triangulação, significa que pode-

mos retirar da tabela informações quanto ao formato da triangulação. Por exemplo, arestas que não possuem uma face à direita ou à esquerda estão, necessariamente, na borda da triangulação.

Além disso, olhando para uma aresta qualquer, podemos encontrar o triângulo à sua direita e esquerda, pois a aresta em questão e as arestas predecessoras e sucessoras em cada lado definem todas as arestas dos triângulos à esquerda e à direita. Aqui, apenas a primeira linha da tabela já diz como a triangulação é formada.

Assim, ao contrário do caso anterior, podemos encontrar os triângulos próximos uns dos outros e navegar na malha com mais facilidade. É claro que necessitamos guardar mais informações e portanto, há a necessidade de alocar mais memória para utilizar essa estrutura. Ainda assim, o tempo de operação se torna consideravelmente menor com esse método.

Por fim, ilustramos as principais etapas do método de ajuste de malhas abaixo:

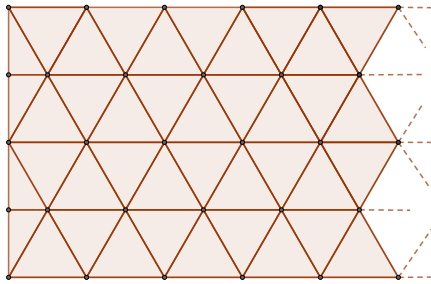


Figura 10: Malha triangular regular.

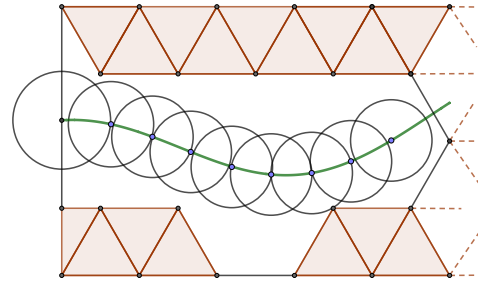


Figura 14: Passo 3 - Remoção dos pontos próximos à curva.

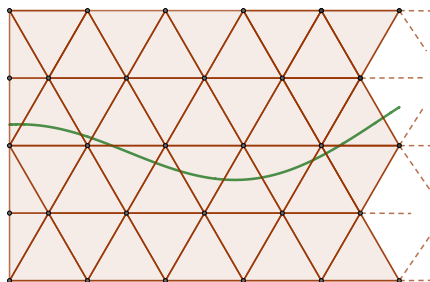


Figura 11: Passo 1 - Inserção de uma curva.

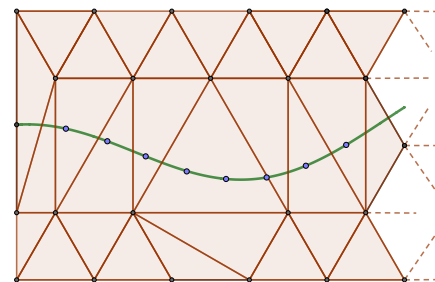


Figura 15: Passo 3 - Ajuste da malha sem os pontos.

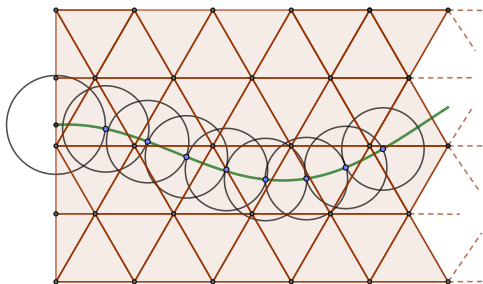


Figura 12: Passo 2 - Determinação dos pontos na curva considerando a escala de comprimento.

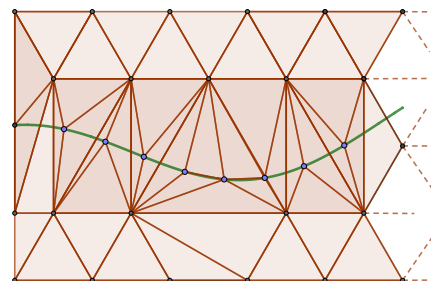


Figura 16: Passo 4 - Inserção dos pontos novos e *split* dos triângulos que contém um ponto em seu interior.

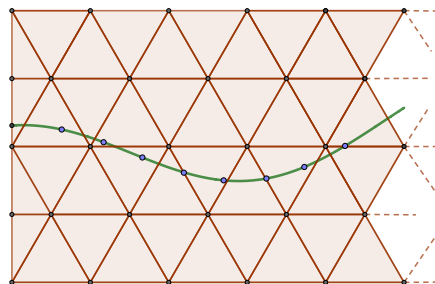


Figura 13: Passo 2 - Ajuste dos pontos usando uma iteração de Gauss-Seidel no espaçamento inicial de N pontos.

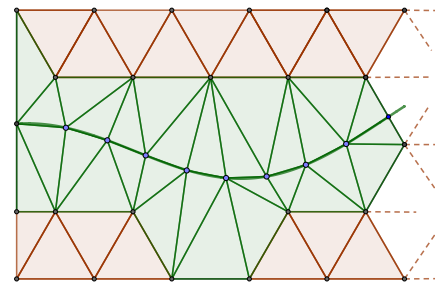


Figura 17: Passo 5 - Refinamento local para ajustar a malha e recuperar arestas de $co\eta$ torno



Assim, implementamos uma versão inicial do código para funcionar com funções algébricas. Isso é, trabalhamos com a suposição de que uma superfície poderia ser descrita algebricamente por uma curva. No entanto, nem sempre isso é possível e decidimos utilizar uma suposição mais forte.

Resolvemos propor uma nova entrada para o código: um conjunto de pontos. É importante que possamos trabalhar com entradas assim pois, em sísmica, é muito comum que a superfície que queremos representar nem mesmo possa ser representada por uma função.

O passo lógico para fazer uma curva que passa por todos esses pontos é fazer uma interpolação polinomial. No entanto uma interpolação desse tipo para um conjunto muito grande de pontos é computacionalmente caro, além de gerar problemas como o fenômeno de Hunge.

Além disso, ter que escolher um tipo de função para compôr o espaço de funções interpoladoras para representar a superfície de forma tão suave quanto queremos, em cada caso, necessitaria de uma análise prévia de cada superfície. Uma alternativa para evitar esse problema foi impor uma entrada adicional no programa, que seriam pontos de controle que descreveriam a curvatura entre dois pontos.

Assim, a proposta agora era utilizar *Cur-*

vas de Bezier para representar a superfície da nossa estrutura geológica. Uma curva de Bezier é definida por 3 pontos, dois pontos que serão interpolados e um ponto, chamado ponto de controle, que determina unicamente a curvatura. Em particular, o ponto de controle é o encontro das retas tangentes a curva nos dois pontos. Veja a figura 18:

Definimos as seguintes funções com um parâmetro u variando de 0 a 1.

$$B_1(u) = (1 - u) \cdot P_1 + u \cdot Q$$

$$B_2(u) = (1 - u) \cdot Q + u \cdot P_2$$

Além disso,

$$C(u) = (1 - u) \cdot B_1 + u \cdot B_2$$

Dessa forma, $C(u)$ representa a curva de Bézier entre os pontos P_1 e P_2 , com ponto de controle Q . Implementamos um código para produzir essa curva para cada dois pontos e então, utilizando uma *cell array* no Octave, foi possível armazenar cada uma dessas funções e chamá-las quando fosse necessário avaliar cada pontos valores entre os dois pontos. Com isso, possuímos uma curva de Bézier que define de forma suave uma superfície.

Utilizamos este método para representar alguns casos típicos em sísmica. A princípio, não atribuímos nenhuma propriedade física para caracterizar os triângulos em cada

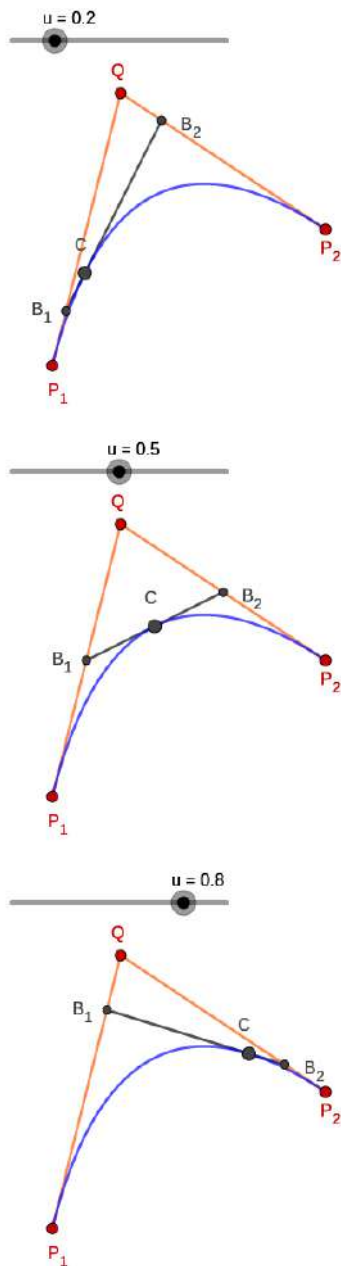


Figura 18: Curva de Bézier definida entre os pontos P_1 e P_2 , com ponto de controle Q e parâmetro u .

camada, apenas utilizamos uma coloração para indicar o ângulo mínimo de cada triângulo. A escala de coloração varia de azul a vermelho, onde azul representa um ângulo mínimo de 0° e vermelho representa um ângulo mínimo de 60° .

No primeiro exemplo, figura 19, tentamos representar a formação de uma estrutura salina em campos petrolíferos no oceano. O segmento em branco indica a curva que foi ajustada à malha. É interessante notar que essa curva não pode ser representada por uma função algébrica. Durante o desenvolvimento do projeto, utilizamos esse modelo como base para testes que permitiram implementar uma função para interpolar, a partir de curvas de Bézier, um conjunto de pontos que caracterizasse uma curva.

A segunda figura, 20, retrata a ocorrência de uma falha geológica, ou então, um deslizamento. Nesse caso, duas curvas foram ajustadas à malha.

Já a figura 21, representa simplesmente um aglomerado de camadas, que podem indicar rochas, fluidos ou ainda alguma combinação desses elementos. Para fazer esse ajuste, utilizamos três curvas distintas.

Por fim, na figura 22, resolvemos experimentar como seria representar um círculo em uma malha. Esse caso surgiu como uma curiosidade, mas se torna útil em situações em que desejamos explorar uma região com a presença de um cano ou túnel subterrâneo, por exemplo.

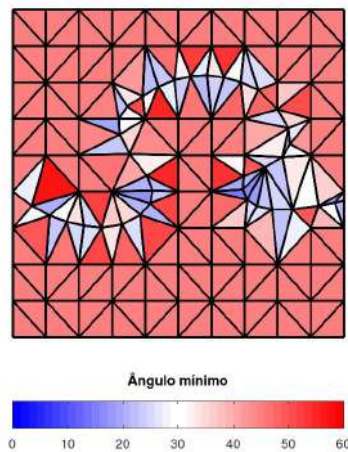


Figura 19: Representação de uma camada de sal.

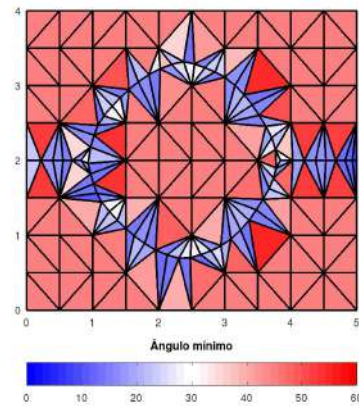


Figura 22: Representação do caso em que existe uma perfuração horizontal.

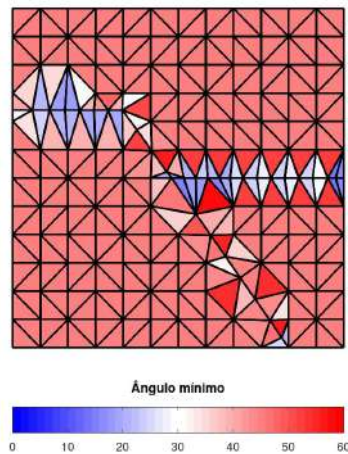


Figura 20: Representação de uma falha geológica.

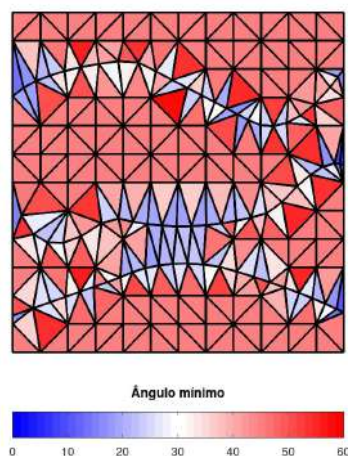


Figura 21: Representação de um aglomerado de camadas rochosas.

Todas essas figuras foram produzidas utilizando o programa que implementamos no Octave para ajustar malhas por uma curva. A princípio, não existe diferença na ordem com que ajustamos uma malha por mais de uma curva. No entanto, quando duas curvas se sobrepõem, há uma substituição de pontos de uma curva por outra. Em teoria, para qualquer ordem o resultado final do ajuste é uma curva suave na malha. Contudo, não sabemos se a remoção de alguns pontos, ou até mesmo a sobreposição de curvas, pode alterar significativamente a solução de problemas envolvendo uma EDO em malhas como essas.

Finalmente, o principal resultado do projeto configura a possibilidade de ajustar quaisquer malhas para quaisquer curvas, e tantas quanto forem desejadas, para representar uma estrutura, seja ela de origem geológica ou não.



6 Conclusões

Este projeto vêm sendo desenvolvido há dois anos e planejamos finalizá-lo com o próximo ano de pesquisa. Nosso objetivo é continuar estudando como gerar malhas ajustadas por curvas mas atribuindo características físicas que permitam a implementação do traçamento de raios.

Até então, estudamos a teoria de geração de triangulações de Delaunay, nos aprofundando no processo de construção e na análise de métodos eficientes para isso. Esse processo permitiu a criação de um vasto ferramental em geometria computacional.

Com isso passamos ao ajuste de malhas, a fim de criar triangulações para representar estruturas geológicas que pudessem fornecer um bom domínio para analisar a solução da equação da onda por meio do traçamento de raios. Agora, devemos focar em compreender os elementos referentes à resolução da equação da onda e como tratá-la computacionalmente. Além disso, precisamos estudar sobre a atribuição de propriedades físicas que caracterizam os meios em que haverá a propagação da onda. Por isso, devemos nos aprofundar também em conceitos específicos de sísmica.

Por fim, desejamos aplicar os conhecimentos adquiridos em geometria computacional neste trabalho não apenas na resolução de problemas em geofísica mas para

desenvolver abordagens em diversas outras áreas.

7 Bibliografia

Referências

- [Edelsbrunner, 2001] Edelsbrunner, H. (2001). *Geometry and Topology for Mesh Generation*. Cambridge University Press.
- [Hohenwarter et al., 2013] Hohenwarter, M., Borchers, M., Ancsin, G., Bencze, B., Blossier, M., Delobelle, A., Denizet, C., Éliás, J., Fekete, A., Gál, L., Konečný, Z., Kovács, Z., Lizelfelner, S., Parisse, B., and Sturr, G. (2013). GeoGebra 4.4. <http://www.geogebra.org>.
- [John W. Eaton and Wehbring, 2014] John W. Eaton, David Bateman, S. H. and Wehbring, R. (2014). *GNU Octave version 3.8.1 manual: a high-level interactive language for numerical computations*. CreateSpace Independent Publishing Platform. ISBN 1441413006.
- [O'Rourke, Joseph, 1998] O'Rourke, Joseph (1998). *Computational Geometry in C*. Cambridge University Press, USA, 2nd edition.
- [Zaide and Ollivier-Gooch, 2014] Zaide, D. W. and Ollivier-Gooch, C. F. (2014).



Inserting a curve into an existing two dimensional unstructured mesh. In Sarrate, J. and Staten, M., editors, *Proceedings of the 22nd International Meshing Roundtable*, pages 93–107, Cham. Springer International Publishing.

8 Financiamento

Ao longo dos dois últimos anos, o projeto foi financiado por duas agências de fomento, CNPq-PICME e PIBIC-SAE.

9 Agradecimento

Primeiramente ao meu orientador, que sempre me apoiou, incentivou e guiou em todos os momentos em que eu me sentia sem rumo. Por cada uma das correções que têm me ajudado a desenvolver um senso crítico, permitindo que eu explore ramos do meu interesse com mais facilidade.

Agradeço também aos meus amigos, pelo companheirismo e amizade em todos os momentos que meu curso ou meu projeto pareciam exigir demais de mim e eles estavam lá pra dizer que eu conseguiria e só precisava descansar um pouco.

Por fim, agradeço aos amigos que se dispuseram a ler meus textos com cuidado e me auxiliaram sugerindo correções semânticas e gramaticais durante cada um dos meus textos.

Aplicación in vivo de compuestos puros sobre bacterias del género *Xanthomonas* sp.
causantes de Bacteriosis común en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.)



C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Aplicación *in vivo* de compuestos puros sobre bacterias del género *Xanthomonas* sp. causantes de Bacteriosis común en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: Albarracín, Daniela Agustina; e.mail: agus.97albarracin@gmail.com

Co-autor: Stagnetto, Agustín; e.mail: astagnetto@hotmail.com

Tutores: Ale, Cesar Emmanuel; e.mail: cemmale1986@gmail.com

Fortuna, Antonio Mario; e.mail: mario095@gmail.com

Universidad Nacional de Tucumán - Facultad de Agronomía y Zootecnia

RESUMEN

El cultivo de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) es una actividad tradicional en el Noroeste Argentino (NOA) desde comienzos del siglo XX con destino final de exportación. Diversos factores afectan su rendimiento destacándose los problemas fitosanitarios, como la Bacteriosis Común, causada por *Xanthomonas axonopodis* (XA), y *Xanthomonas fuscans* (XF).

Para manejar esta enfermedad se usan biocidas cúpricos en altas concentraciones, conllevando a alteraciones del ecosistema, persistencia en el ambiente y aparición de resistencia. Esto pone de manifiesto la gran importancia de buscar otras alternativas, siendo los productos naturales de plantas una opción interesante debido a sus importantes funciones en la interacción con su entorno. En el presente trabajo se estudió la lactona sesquiterpénica Cnicina (Cn) obtenida de *Centaurea diffusa* que

crece en el centro de nuestro país, para su utilización como agente biocontrolador de las bacterias causantes de la bacteriosis común, en forma individual y combinada con oxiclóruo de cobre (Ox), debido a que ambos compuestos presentan antecedentes de propiedades antimicrobianas.

Así, se realizaron en condiciones de invernadero infecciones por punción aislada (Pa) de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. por triplicado con XA y XF y se trataron con Cn, Ox y su combinación Cn:Ox aplicados de manera preventiva (PR) o curativa (CU).

Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con Cn presentaron efectividades >40% en la reducción del área foliar infectada destacándose Cn:Ox. Se observó > sensibilidad XA respecto a XF siendo el régimen PR fue más eficiente que el CU. Estos resultados permiten

proponer una plataforma de trabajo para el futuro diseño de productos fitobióticos de aplicación agropecuaria.

INTRODUCCIÓN

Cultivo de poroto

El poroto es originario del sur de México, América Central y América del Sur. El cultivo del poroto seco (*Phaseolus vulgaris* L.) ha sido una actividad tradicional en el Noroeste Argentino (NOA) desde comienzos del siglo XX.

A partir de 1970, el poroto se convierte en un cultivo extensivo de gran importancia económica regional, cuyo destino final es la exportación.

Taxonomía

Nombre científico: *Phaseolus vulgaris* L.

Nombre común: La especie *Phaseolus vulgaris* L. recibe diversos nombres en los países de habla castellana: frijol, frisol, frejol, poroto, habichuela, habilla, caraota, judía, alubia, etc.

División: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Orden: Rosales

Familia: Fabaceae

Tribu: *Phaseoleae*

Género: *Phaseolus*

Características morfológicas

La planta de poroto es herbácea, anual e intensamente cultivada desde el trópico

hasta las zonas templadas por su característica de ser una especie termófila; es decir, no soporta las heladas. Es cultivada esencialmente para obtener la semilla, la cual posee un alto contenido de proteínas (22% en base a materia seca).

Las principales partes de la planta pueden mencionarse a continuación (Fig. N° 1):

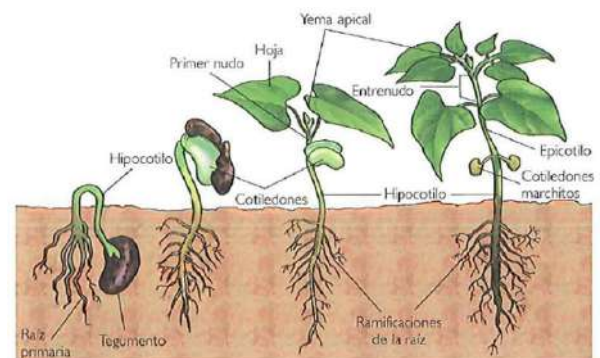


Figura N°1. Morfología de *Phaseolus vulgaris* L.

Ciclo biológico

El ciclo de vida completo de la planta puede variar aproximadamente entre 82 y 98 días. La duración del ciclo biológico del poroto depende, en primer término, de la constitución genética de la variedad considerada, y de los factores ambientales en el que se desarrolla el cultivo, especialmente los climáticos como temperatura, humedad y cantidad de luz.

Fenología del cultivo

En el ciclo biológico del poroto se distinguen dos fases bien diferenciadas: La fase vegetativa: se inicia con la germinación y culmina con la aparición del primer botón floral en las variedades determinadas o el primer racimo en las indeterminadas; y la fase reproductiva: que va desde el primer botón floral o racimo hasta la madurez de la cosecha. En la tabla N°1 puede observarse una clasificación de la fenología del cultivo.

Tabla 1. Tomada y adaptada de Getps y col. (1986)

ESTADIO	DESCRIPCIÓN
FASE VEGETATIVA	
V0	Germinación
V1	Cotiledones a nivel de suelo
V2	Hojas primarias expandidas
V3	Primera hoja trifoliada
V4	Tercera hoja trifoliada
FASE REPRODUCTIVA	
R5	Botones florales/racimos
R6	Abertura de la primera flor
R7	Aparición de las primeras vainas
R8	Primeras vainas llenas
R9	Modificación de color de las vainas

Requerimientos del cultivo

Térmicos:

El poroto es una especie termófila, es decir que soporta muy poco las bajas temperaturas. El desarrollo vegetativo normal se logra cuando las temperaturas medias mensuales se mantienen entre 16 y 25° C, siendo la mínima media mensual óptima de 10°C y la máxima media mensual óptima de 28°C. La temperatura óptima de crecimiento es de 25/20°C (día/noche).

Lumínicos:

Se puede decir que es un cultivo indiferente al fotoperíodo, aunque responde a días cortos y por lo cual los días largos causan demoras en la floración y en la madurez.

Hídricos

El requerimiento óptimo de agua durante el cultivo oscila entre 350 a 400 mm, distribuidos uniformemente.

Edáficos

Requiere suelos sin limitaciones o con limitaciones muy leves (bien drenados, permeabilidad moderada, texturas franco limoso grueso, franco o franco arenosos, estructura granular, con buen contenido de materia orgánica, ausente de salinidad y de alcalinidad).

Principales zonas productoras de poroto en Tucumán y provincias vecinas

Por las condiciones agroclimáticas adecuadas para el manejo del cultivo, en la Argentina se produce casi exclusivamente en la región del noroeste argentino (NOA), y comprende las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero y Catamarca (Vizgarra & Ghio, 2004). Estas características definieron al poroto como un cultivo regional desde la década de 1970 hasta la actualidad; aunque en los últimos años se han sumado algunas provincias como Córdoba en su zona norte. Ésta constituye una zona de producción eventual.

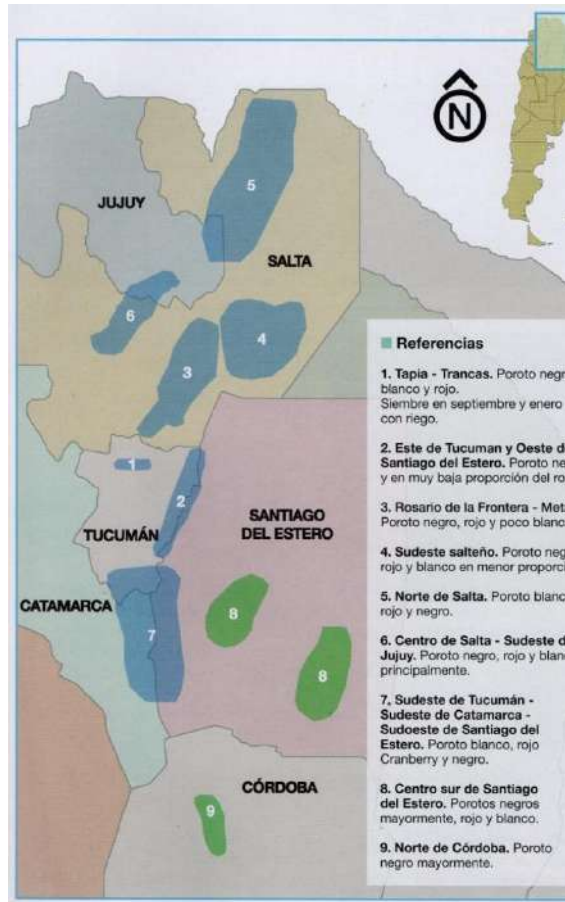


Figura N°2. Zonas productoras de poroto en Argentina

Enfermedades

Entre los diversos problemas fitosanitarios que afectan la producción de poroto en la Argentina están las enfermedades (Casalderrey y col., 2009).

La mayoría de las enfermedades del cultivo del poroto son de origen biótico (o infeccioso), es decir, se deben a la acción de otros seres vivos como hongos, bacterias y virus.

Entre las enfermedades causadas por bacterias, la más difundida es la bacteriosis común (o tizón bacteriano común), que en el NOA se manifiesta en niveles importantes en lotes con siembra temprana, y en aquellos donde el cultivo antecesor fue poroto. Es una enfermedad clave en el cultivo de poroto por su amplia distribución y su efecto directo sobre los rendimientos, además de su transmisión a través de las semillas.

La bacteriosis común es causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (sinónimo: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*), así como por *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (Vauterin y col., 1995), bacterias fitopatógenas que no producen esporos de resistencia. Todos los ambientes de la región NOA donde se produce poroto presentan condiciones conducentes para la presencia de la enfermedad, y en la mayoría de las zonas se presenta de forma endémica.

Género *Xanthomonas* spp.

Las bacterias del género son bacilos gram-negativos, aerobios obligados, pertenecientes a la subdivisión γ -proteobacterias (Bradbury, 1984).

Las colonias de las especies de *Xanthomonas* spp. presentan un aspecto mucoso debido a la elevada producción de un exopolisacárido (EPS), el xantano. Las

Xanthomonas, en general, son móviles y poseen un único flagelo polar que le permite introducirse dentro de la planta hospedadora. Muchas de las especies que componen el género pueden sobrevivir y multiplicarse epifíticamente (Starr, 1981). Estas bacterias son patógenos hemibiótrofos que inicialmente se alimentan del tejido vivo pero en los estadios avanzados de la infección causan la muerte de las células de la planta huésped (Buttner & Bonas, 2009).

Producen un pigmento característico de color amarillo asociado a la membrana plasmática e insoluble en agua: xanthomonadina (Starr, 1981). Este pigmento tendría un rol protector sobre la bacteria frente al daño fotobiológico (Jenkins & Starr, 1982; Rajagopal y col., 1997).

La bacteria sobrevive en el rastrojo infectado y en las semillas. Las infecciones primarias normalmente se originan a partir de focos de semillas infectadas, y a partir de ellos se dispersa por lluvias y vientos, riego por aspersión y probablemente por insectos, generando varios ciclos de infección.

Síntomas y daños

Los síntomas se observan en las hojas inicialmente como pequeñas manchas edematosas, que luego engrandecen y su

centro se vuelve castaño rojizo y necrótico. Las manchas se multiplican y aumentan su tamaño de manera irregular. Estas lesiones son normalmente rodeadas por un halo de color amarillo brillante. Las manchas pueden unirse produciendo áreas necróticas irregulares, causando la defoliación cuando los ataques son severos. En las vainas las lesiones son similares (Fig. N°3).



Figura N°3. síntomas típicos de bacteriosis común en partes aéreas y semillas de poroto.

Medidas de control

Agrotécnicas

- Empleo de semillas sanas, (libres del patógeno).
- Destrucción inmediata de los restos de cosecha.
- Empleo de variedades resistentes o tolerantes.
- Rotación de cultivos.



- Evitar las siembras en períodos lluviosos y de altas temperaturas.

Químicas

- Oxidocloruro de Cobre.
- Sulfato de cobre

Productos naturales

Los productos naturales son compuestos químicos producidos por organismos vivos entre los cuales están las plantas. Estos productos se denominan comúnmente metabolitos secundarios, ya que no son imprescindibles para el crecimiento y desarrollo de las plantas como los metabolitos primarios. Se piensa que los metabolitos secundarios les confieren a las plantas una ventaja adaptativa y son necesarios para su supervivencia. También cumplen funciones importantes en la interacción entre las plantas y su entorno biótico y abiótico. Pueden servir como compuestos de defensa contra herbívoros y patógenos (bacterias y protozoos), como pigmentos de flores que atraen polinizadores, como hormonas o moléculas de señal, entre muchas otras funciones esenciales.

Centaurea diffusa

Existen numerosas publicaciones sobre las investigaciones del género *Centaurea*, reportando numerosos metabolitos secundarios. Dentro de éstos, las lactonas

sesquiterpénicas son componentes muy característicos (Nowak y col., 1984). Los informes son escasos sobre la química de *C. diffusa*, una especie invasora de Eurasia que ha infestado pastizales y áreas de cultivo de América del Norte y del Sur, y que preocupa a los intereses agrícolas en el centro y noreste de Argentina. A la lactona sesquiterpénica cnicina, aislada de *C. diffusa*, cuyo nombre químico IUPAC es [(3aR, 4S, 6E, 10Z, 11aR) -10-(hidroximetil) -6- metil-3-metilideno-2-oxo-3a, 4,5,8,9,11a-hexahidrociclododeca [b]furan-4-il] (3R) -3,4-dihidroxi-2-metilidenebutanoato, se le han atribuido múltiples actividades biológicas, incluidos sus efectos antidiabéticos, antidiarreicos, antirreumáticos, antiinflamatorios, antipiréticos y antibacterianos (Chirstensen y col., 1991; Landau y col., 1994; Fortuna y col., 2002; Sesto Cabral y col., 2008; Jöhrer y col., 2012; Nowak y col., 2013).

Este trabajo está basado en la evaluación de los efectos de Cnicina (compuesto puro extraído de plantas de la región centro de nuestro país) como agente biocontrolador de las bacterias causantes de la Bacteriosis Común, debido a los antecedentes de actividad antimicrobiana de sus principios activos.

OBJETIVO GENERAL

Realizar ensayos *in vivo* con cnicina sobre cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 168 y *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* 190 sobre hojas de plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones controladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Optimizar un modelo de infección de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de invernadero.
- 2) Realizar ensayos de infección y posterior aplicación de tratamientos con compuestos puros propuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS I

Optimización de un modelo de infección *in vivo* (condiciones de invernadero)

Para llevar a cabo el objetivo N°1 se utilizaron diferentes materiales siguiendo la metodología que se detalla a continuación:

Invernaderos

Las plantas de poroto crecieron en invernaderos construidos con un sistema de iluminación artificial (3 tubos fluorescentes luz día 36W), suplementado con lámparas de luz cálida (lámparas halógenas R63 42W) para generar la temperatura requerida. Termohigrómetros digitales (HTC-1) permitieron monitorear

de forma permanente la temperatura y la humedad. Cuentan además con 2 aberturas frontales para el acceso al área de trabajo, así como dos aberturas laterales para garantizar ventilación (Fig. N°4).



Figura N°4. Vista frontal y lateral de invernaderos.

Siembra y desarrollo de las plantas

Se sembraron grupos de plantas de tres variedades: blanco alubia PERLA (B), negro NAG 12 (N) y rojo (R4 INTA), en macetas de telgopor de 300 mL (previamente desinfectadas) utilizando sustrato comercial preparado (Landiner). Se controló periódicamente el crecimiento y desarrollo de las plantas desde el día de siembra, hasta alcanzar los estadios fenológicos V2 (hojas primarias) y V3 (primera hoja trifoliada), correspondientes a la fase vegetativa de la planta.

Las condiciones del invernadero durante esta etapa se mantuvieron en un intervalo de temperatura de 24° a 29°C, y humedad relativa porcentual entre 53 - 86%.



Cada 48 h aproximadamente se regaron las plantas con 10 mL de agua corriente, previa evaluación del nivel de humedad del suelo.

Infección

Tomando una de las hojas primarias de cada planta se infectó con suspensiones de XA y XF (10^6 UFC/mL) por separado. Como control, se inocularon hojas de plantas con agua destilada estéril para someterlas al mismo estrés de las plantas con tratamiento. Se practicó una de las estrategias de inoculación descritas por el C.I.A.T. (Centro Internacional de Agricultura Tropical), según publican en el manual “Enfermedades Bacterianas del frijol: identificación y control” (Ospina & Schwartz, 1981), correspondiente a la punción aislada (Pa), que resultó ser la más efectiva para la reproducibilidad de los resultados en ensayos preliminares.

Estrategia de inoculación por punción aislada (Pa)

Consistió en tomar una de las hojas primarias, dividirla en 4 cuadrantes, y con una aguja esterilizada por incineración y sumergida en las suspensiones de XA y/o XF, practicarle 4 pequeños orificios aproximadamente equidistantes entre ellos. A las plantas control, se le realizaron punciones de forma similar a las de

tratamiento utilizando una aguja sumergida en agua destilada estéril.

Incubación y monitoreo de síntomas

A fin de garantizar las condiciones que predisponen el desarrollo de la enfermedad (elevada humedad y temperatura), asegurando un manejo controlado de la misma, las plantas infectadas fueron aisladas individualmente con bolsas de polipropileno transparentes perforadas para lograr un adecuado intercambio gaseoso y mantener la humedad. La incubación se extendió por un período de 14 días en los invernaderos, tomando como referencia lo propuesto por Popovic y col. (2010), y según lo descrito por Ospina & Schwartz (1981), bajo las condiciones de temperatura y humedad ya mencionadas.

En el tejido afectado se observa la aparición de las lesiones por formación de zonas necróticas de color castaño claro, aspecto seco y rodeadas de un característico halo amarillento, tal como describen Vizgarra y col. (2016).

El riego continuó realizándose como se describió anteriormente.

Procesamiento informático de datos

Transcurridos los 14 días a partir de la inoculación inicial, las hojas tratadas fueron retiradas de las plantas, escaneadas y

analizadas mediante un software de procesamiento de imágenes (ImageJ®). La cuantificación de la severidad de la enfermedad se realizó calculando la fracción de área afectada. Para ello se midió el área de infección, la cual fue comparada respecto del área foliar total, estableciéndose así una Relación de Infección foliar (RI), tal como se expresa a continuación:

Relación de Infección foliar (RI):

$$RI = \frac{\text{Área infectada}}{\text{Área foliar total}}$$

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y fueron evaluados estadísticamente mediante el análisis de la varianza y el Test de Fisher para las comparaciones de las medias de las Relaciones de Infección (RI) evaluadas en función de la variedad de planta, tipo de inoculación y fitopatógeno ensayado, utilizando el software InfoStat (2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN I

Las variables consideradas durante esta etapa experimental, así como las interacciones que entre ellas se establecieron, determinaron cuáles fueron los parámetros del modelo que debían ser tomados en consideración principalmente

para llevar adelante la optimización del proceso en condiciones controladas.

Al realizar la siembra de todas las variedades se observó que: El poder germinativo medio de la variedad B (95%) fue significativamente mayor que N (84%) Y R (55%) ($p > 0,01$), (Tabla N°2), sobre un total de 170 semillas analizadas durante esta etapa.

Tabla 2. Test de Fisher de Área foliar promedio de semillas de *Phaseolus vulgaris* L.

VARIEDAD	PG	N	E.E	
R	0,55	85	0,03	A
N	0,85	85	0,03	B
B	0,95	85	0,03	C

A-B-C Medias con una letra común no son significativamente

diferentes ($p \leq 0,01$)

Respecto al área foliar (AF), la variedad B presentó un valor promedio de $34,65 \pm 1,38$ cm², el cual fue significativamente mayor a los $17,84 \pm 1,37$ cm² y $19,18 \pm 1,37$ cm² presentados por la variedad R y N respectivamente (Tabla N°3) ($p > 0,01$). Las condiciones de trabajo favorecieron el desarrollo de una mayor área foliar debido a que se mantuvo la luz de manera permanente, según lo explicado por Vizcarra y col. (2016).

Tabla 3. Test de Fisher de Área foliar promedio de semillas de *Phaseolus vulgaris* L.

VARIEDAD	AF promedio	N	E.E	
R	17,84	85	1,37	A
N	19,18	85	1,37	B
B	34,65	85	1,38	C

A-B-C Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,01$)



Todas las variedades alcanzaron el estadio V2 alrededor de los 7 días, mientras que el estadio V3 se alcanzó a los 14 días.

A fines de analizar datos de forma informatizada mediante un procesamiento de imágenes, la variedad blanco inicialmente sería la más adecuada para continuar con el estudio, en base a sus parámetros fenológicos asociados al tamaño del área foliar.

MATERIALES Y MÉTODOS II

Evaluación de actividad antimicrobiana *in vivo* (condiciones de invernadero)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo de infección desarrollado en una primera instancia, considerando su significancia estadística y factores inherentes a la práctica, se seleccionaron las variables más apropiadas para continuar con el estudio *in vivo*: variedad de poroto **blanco** (B), en el estadio fenológico **V2** (debido a que este se alcanza en un menor tiempo) para llevar a cabo la infección con suspensiones acuosas 10^6 UFC/mL de ambos patógenos (**XA** y **XF**), utilizando la **punción aislada** (Pa) como estrategia de inoculación, para la aplicación de **Cnicina (Cn)**, junto con el **Oxicloruro de Cobre (Ox)** como control químico comercial.

Ensayo de infección con tratamientos

Invernaderos: construidos bajo condiciones especificadas anteriormente.

Siembra y desarrollo de plantas: se desarrolló un monitoreo de las plantas de acuerdo a lo ya especificado para cada ensayo realizado por quintuplicado según la combinación CEPA-RÉGIMEN-COMPUESTO.

Infección: se practicó la punción aislada (Pa) como método de inoculación del microorganismo.

Tratamientos

Las condiciones aplicadas fueron:

Compuestos: 1)-Cn 225 ppm, 2)-Ox 25 ppm y 3)-Cn 225 ppm + Ox 25 ppm, a fin de evaluar la capacidad inhibitoria del tratamiento combinado.

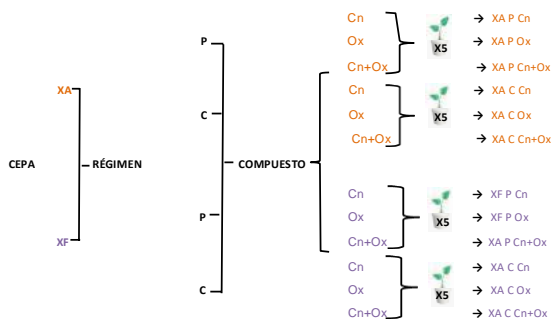
Estos tratamientos se ensayaron bajo dos **Regímenes:** Preventivo (**P**) y Curativo (**C**).

Régimen Preventivo (P): se procedió a sembrar el tratamiento 24 h antes del momento de la infección. Para ello, se colocaron con micropipeta 15 μ L de cada compuesto (Cn, Ox y Cn + Ox) en 4 puntos equidistantes de una hoja primaria sana (tomando como referencia la metodología ya descrita, sobre los que luego se realizó la inoculación con el microorganismo (24 h después) por punción aislada.

Régimen Curativo (C): se produjo la co-inoculación del compuesto y el microorganismo en forma conjunta. Para

ello, luego de la punción con el inóculo bacteriano, se sembraron el volumen de 15 μL de Cn, Ox y/o Cn + Ox, según la condición que se tratase.

Cada tratamiento con los compuestos mencionados se aplicó en ambas cepas por separado (XA y XF), bajo ambos regímenes (P y C), por quintuplicado. A continuación, se esquematiza la interacción entre las variables seleccionadas para llevar a cabo el ensayo de infección y tratamientos:



Procesamiento informático de datos:

El parámetro EFECTIVIDAD (E_f) fue calculado para cada tratamiento mediante la siguiente expresión:

$$E_f = \frac{\text{Área infectada}_{\text{control}} - \text{Área infectada}_{\text{tratamiento}}}{\text{Área infectada}_{\text{control}}}$$

En donde Área Infectada CONTROL corresponde al promedio de áreas infectadas de los controles para cada cepa. El valor adimensional de este parámetro que representa la reducción del área dañada según la capacidad antimicrobiana

que cada tratamiento exhibió, toma valores entre 0 y 1, siendo 1 una reducción total (sin síntomas) y 0 sin diferencias de daño (cm^2) respecto a los correspondientes controles infectados.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado y fueron evaluados estadísticamente mediante el análisis de la varianza y el Test de Fisher para las comparaciones de la efectividad media de los tratamientos y la respuesta de las plantas a la interacción patógeno-hospedador-tratamiento reflejada en los valores de RI. Para ello se utilizó el software InfoStat (2018).

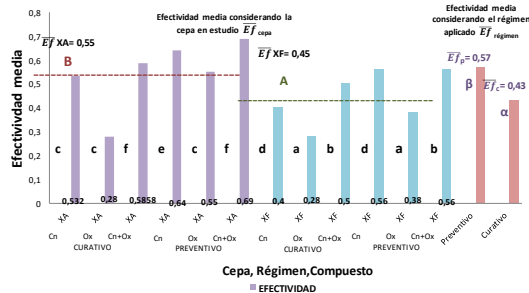
RESULTADOS Y DISCUSIÓN II

Teniendo en cuenta la respuesta de los tratamientos referida a ambas cepas indicadoras, los resultados indicaron que, en general, hubo una efectividad de los tratamientos del 55% al aplicarse sobre XA, y del 45% sobre XF, siendo esta diferencia significativa (Fig. N°5.) ($p \leq 0,01$).

Estos resultados estarían reflejando la mayor sensibilidad de XA respecto de XF. Durante el desarrollo de los ensayos *in vitro* se pudo inferir un mayor efecto inhibitorio de XA sobre XF ($>FI_{XA}$, $>\Delta K_{XA}$), lo que a su vez

está de acuerdo con lo informado por Mutluy col. (2008).

Al evaluar la eficacia de los tratamientos aplicados, se pudo observar que la administración de manera preventiva (24 horas previas a la inoculación con los patógenos) tuvo una respuesta significativamente mejor ($\bar{E}f=0,57 \pm 0,03$) en relación al régimen curativo ($\bar{E}f=0,43 \pm 0,03$) (Fig. N°5).



Referencias:

XA: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 168; **XF:** *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* 190. **P:** régimen Preventivo; **C:** régimen Curativo; **Cn:** Cnicina; **Ox:** Oxidocloruro de cobre. $\bar{E}f$: Efectividad media. (A-B) Letras distintas indican diferencias significativas entre valores de Efectividad media para las cepas consideradas ($p \leq 0,01$). (a-f) Letras distintas indican diferencias significativas entre valores de Efectividad media para la interacción considerada. (α - β) Letras distintas indican diferencias significativas entre valores de Efectividad media para cada régimen aplicado.

Figura N°5. Efectividad media ($\bar{E}f$) de los tratamientos teniendo en cuenta la interacción:

CEPA*RÉGIMEN*COMPUESTO

En cuanto a la variable COMPUESTO, se observa que la combinación Cn+Ox (225-25 ppm) es el más efectivo ($\bar{E}f=0,59 \pm 0,04$) al contemplar ambos regímenes de tratamiento aplicados (Tabla N° 4).

Tabla 4. Test de Fisher de la Efectividad media ($\bar{E}f$) de los tratamientos aplicados para controlar bacteriosis común en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. considerando el compuesto aplicado

COMPUESTO	$\bar{E}f$	N	E.E	
Ox	0,38	40	0,04	A
Cn	0,54	40	0,04	B
Cn+Ox	0,59	40	0,04	C

A-C Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,01$)

El desarrollo de los síntomas propios de la enfermedad se manifiesta con la aparición de áreas de lesión de color café. Al evaluar como una variable individual el AREA FOLIAR INFECTADA media ($\bar{A}fi$) [cm^2], se puso en evidencia que solo el RÉGIMEN de tratamiento aplicado ejerció un efecto significativo en la reducción de la misma (Tabla N°5.). pertenecientes a la subdivisión γ -proteobacterias (Bradbury, 1984).

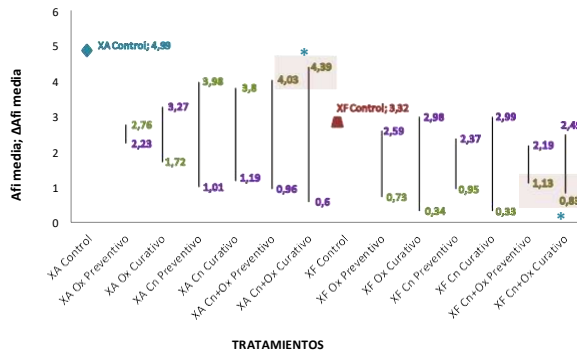
Tabla 5. Modelo experimental del Área Foliar Infectada desarrollada en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. por infección con *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 168 y *X. fuscans* subsp. *fuscans* 190

FUENTE DE VARIABILIDAD	SC	gl	MC	F	Valor de p
Modelo	109,99	7	15,71	11,42	<0,0001
RÉGIMEN	78,33	3	26,11	18,98	<0,0001
CEPA	1,2	1	1,2	0,87	0,3537
TRATAMIENTO*CEPA	31,63	3	10,64	7,66	0,0002
Error	88,04	64	1,38		
Total	198,04	71			

SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; MC: media de los cuadrados; F: valor del estadístico F.

Como se observa en la (Fig. N°6.), el tratamiento que produjo una mayor reducción de área infectada respecto de los controles fue Cn+Ox ($\Delta\bar{A}fi=2,15 cm^2$, valor medio indicado para ambas cepas, dato no

mostrado) (*), cuando se considera este en forma general.



Referencias:

(Afi) Media: área foliar infectada media. **Δ(Afi) media:** Variación del (Afi) media. **XA:** *Xanthomonas axonopodis*. **XF:** *Xanthomonas fuscans*. **Cn:** cnicina; **Ox:** oxiclورو de cobre. *: Indica valores del tratamiento que produce mayor reducción de área foliar infectada.

Figura N°6. Gráfico de dispersión de Área foliar infectada media (Afi) y su variación media (ΔAfi) respecto a los controles bajo diferentes tratamientos

El tratamiento mencionado (Cn+Ox) ($\Delta Afi=2,15 \text{ cm}^2$) mostró diferencias significativas en la reducción del área foliar infectada respecto a Cn y Ox puros ($\Delta Afi=1,58$ y $1,39 \text{ cm}^2$, respectivamente), con áreas infectadas promedio de $2,01 \pm 0,29$ y $2,77 \pm 0,29 \text{ cm}^2$ respectivamente (Tabla N° 6, Fig. N° 7.). Nuevamente, al considerar los valores de área infectada, XA mostró los menores tamaños de lesión bajo todos los tratamientos aplicados.

Tabla 6. Test de Fisher del Área Foliar Infectada media \overline{Afi} de infección en hojas de *Phaseolus vulgaris* considerando el compuesto aplicado

COMPUESTO	\overline{Afi}	N	E.E			
Cn+Ox	2,01	40	0,29	A		
Cn	2,58	40	0,29	A	B	
Ox	2,77	40	0,29	B		C
Control	4,16	40	0,24	C		

A-C Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,01$)

La reducción del área foliar dañada puede observarse de manera ilustrativa en la Figura N°7.

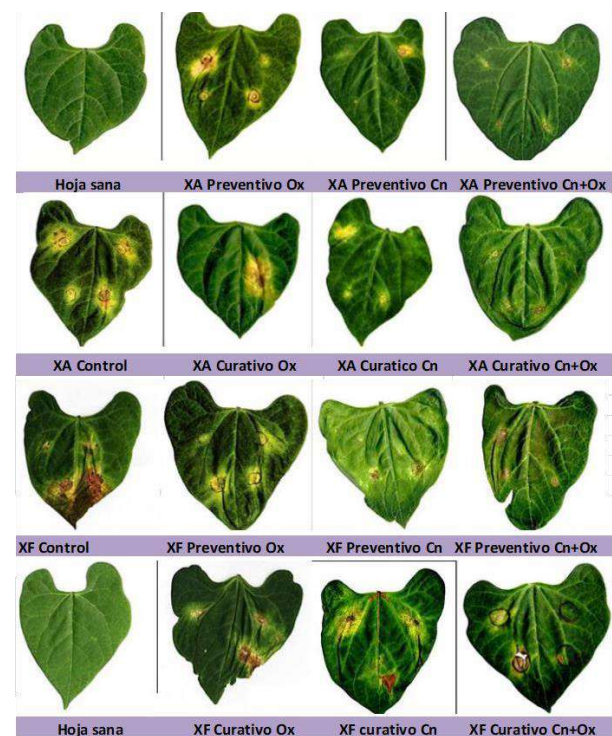


Figura N°7. Reducción del área foliar dañada bajo diferentes tratamientos

CONCLUSIONES

- Todos los tratamientos a partir de productos naturales aplicados presentaron efectividades >40% en la reducción del área foliar infectada.



- Los tratamientos aplicados fueron más efectivos sobre XA respecto a XF.
- El régimen preventivo fue más eficiente respecto al curativo.
- Cn+Ox fue el mejor tratamiento aplicado.
- La reducción de área foliar dañada respecto al control (promedio) fue ~2 cm² para cada tratamiento.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitirían el desarrollo de bases teórico- prácticas para la futura formulación de un producto de biocontrol que contenga compuestos naturales de plantas del norte y centro del país sin valor comercial, para la prevención de la bacteriosis común en porotos en la región del NOA.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Bradbury, J.F. (1984). Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187, pp. 199–210. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed. 9. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

- Büttner, D. & Bonas, U. (2009). Regulation and secretion of *Xanthomonas virulence factors*. FEMS Microbiology Reviews, 34: 107-133. 10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x.
- Casalderrey, N.; Alcoba, N.; Atlas, E.; Bejarano, N.; Gonzáles, V.; Maggio, M.E.; Plopper, L.D.; Rodríguez Pardina, P.; Díaz, C. y Zamorano, M.A. (2009). Enfermedades de *Phaseolus vulgaris* L. (poroto, poroto común, frijol, judía, alubia, chaucha). Atlas Fitopatológico Argentino, 2(2), junio 2009. Córdoba, Argentina. [En línea]. Disponible en: <http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?phospedante>.
- Christensen, L.P. & Lam, J. (1991). Acetylenes and other constituents from *Centaurea* species. Phytochemistry, 30(10): 3289-3292. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83195-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83195-Q)
- Debouck, D.G. e Hidalgo, R. (1984). Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). pp. 7-46. Centro



- Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Fortuna, A.M.; Riscala, E.; Catalán, C.; Gedris, T. & Herz, W. (2002). Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea diffusa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 805-808. 10.1016/S0305-1978(01)00115-6.
 - Jenkins, C.L.; Starr, M.P. (1982). The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Current Microbiology*, 7: 323–326. <https://doi.org/10.1007/BF01566872>.
 - Jöhrer, K.; Obkircher, M.; Neureiter, D.; Parteli, J.; Zelle-Rieser, C.; Maizner, E.; Kern, J.; Hermann, M.; Hamacher, F.; Merkel, O.; Wacht, N.; Zidorn, C.; Scheideler, M. & Greil, R. (2012). Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target. *Journal of Molecular Medicine* (Berlin), 90(6):681-93. doi: 10.1007/s00109-011-0848-x. Epub 2011 Dec 29.
 - Landau, I.; Mueller-Scharer, H. & Ward, P.I. (1994) Influence of cnicin, a sesquiterpene lactone of *Centaurea maculosa* (Asteraceae), on specialist and generalist insect herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 929–942.
 - Mutlu N.; Vidaver A.K.; Coyne D.P.; Steadman J.R.; Lambrecht P.A. & Reiser J. (2008). Differential Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* Strains on Bean Genotypes with Common Blight Resistance. *Plant Disease*; 92(4): 546-554. doi: 10.1094/PDIS-92-4-0546.
 - Nowak, A.; Drożdż, B. & eorgiadis, T. (1984). Sesquiterpene lactones. XXIX. Cnicin in species of the subgenus *Acrolophus* (Cass.) Dobroc. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 53: 199-205.
 - Nowak, G.; Urbanska, M.; Nawrot, J.; Bernard, M. & Dawid-Pać, (2013). Color and Chemical eactions of Selected Sesquiterpene Lactones and



- Ecdysones from Asteraceae on TLC Plates. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 26: 289-293. 10.1556/JPC.26.2013.3.15.
- Ospina O., H.F. & Schwartz, H.F. (eds.) (1981). *Enfermedades Bacterianas del Frijol: Identificación y Control*. pp 9-33. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
 - Popović, T.; Balaž, J.; Nikolic, Z.; Starović, M.; Veljko; Aleksić; Vasić, M. & Živković, S. (2010). Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. *African Journal of Agricultural Research*, 5(19): 2730-2736.
 - Rajagopal L.; Sundari, C.S.; Balasubramanian, D. & Sonti, R.V (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.*, 415(2):125-8.
 - Starr, M.P. (1981). The genus *Xanthomonas*. The Prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Springer, New York. (1):742–763. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds.
 - Vizgarra, O.N.; Beebe, S; Morales, F.C.; Bellone, C.H. y Plopper, D. (2012). Interacción genotipo por ambiente en cultivares de poroto para el Noroeste Argentino. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 89(2).
- FINANCIAMIENTO:**
“ESTUDIOS QUÍMICOS Y BIOACTIVIDAD DE ESPECIES VEGETALES DEL NOROESTE ARGENTINO (NOA). POTENCIALES USOS TERAPÉUTICOS” **PIUNT A618/1** en el marco del programa **PIUNT A618:** “BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS”. Período: 2018-2022. Director: Dr. Antonio Mario Fortuna.
- Agradecimientos:**
Se agradece a la Dra. Ing. Agr. María Elisa Maggio por proporcionar las cepas de *Xanthomonas* utilizadas en este trabajo.
-

Actividad antifúngica de la fracción de alcaloides obtenida de hojas de *Prosopis nigra*



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

C.28. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Actividad antifúngica de la fracción de alcaloides obtenida de hojas de *Prosopis nigra*

Autor: Torrent, Walter; walter.torrent@uner.edu.ar;

Co-autor(es): Aceñolaza, Pablo; pablo.acenolaza@uner.edu.ar; Appelhans, Stefania; stefania.appelhans@uner.edu.ar; Heis, Magali Soledad; magali.s.heis@gmail.com; Trossero, Julia; julia.trossero@fca.uner.edu.ar

Profesor/a guía: Sequin, Christian; christian.sequin@uner.edu.ar

Universidad Nacional de Entre Ríos

C.28 Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Resumen

El género *Prosopis* ha reportado actividad antifúngica frente a diversos hongos. El algarrobo negro (*Prosopis nigra* Griseb.) es un árbol nativo de la familia *Fabaceae* ampliamente distribuido en el centro y norte de Argentina. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica de una fracción de alcaloides *P. nigra* frente al patógeno de soja (*Glycine max* L.) *Cercospora kikuchi*. La extracción de la fracción de alcaloides se realizó tomando 100 g de hojas secas y molidas de *P. nigra*, se expusieron a HCl al 10% m/v durante 24 h a 70 °C, para luego ser filtrado. A la solución filtrada se agregó Na₂CO₃, hasta alcanzar pH 9. A continuación se realizó una partición líquido/líquido simple utilizando eter etílico por 72 h. La evaluación antifúngica de la fracción de alcaloides frente a *C. kikuchi* se realizó mediante el método de difusión en disco. Se evaluaron 3 dosis, para esto se agregaron 15 µl, 10 µl y 5 µl de una solución de alcaloides de 36,6 µg/µl. Se utilizó un control positivo de difenoconazol con una concentración de 0,1 µg/µl. Finalizado el ensayo se midió el halo de inhibición (en mm) para cada tratamiento. Los resultados muestran que la fracción de alcaloides presenta actividad antifúngica y que no hubo diferencias significativas entre las dosis ensayadas y el difenoconazol. Los tratamientos de 15 µl, 10 µl y el control positivo de difenoconazol presentaron una mediana igual a 9 mm mientras que el tratamiento de 5µl presentó una mediana de 7 mm. Los resultados obtenidos auspician la búsqueda de compuestos naturales para la utilización del control de enfermedades causadas por *Cercospora kikuchii*.

Palabras clave: alcaloides, antifúngico, *Cercospora*.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

Introducción

El género *Prosopis* pertenece a la subfamilia Mimosaceae, familia Leguminosae, comprendiendo 44 especies (Burkart, 1976), este género es de gran importancia en la composición arbórea y arbustiva de zonas áridas y semiáridas, abarcando su distribución el sureste de Asia, África tropical y América, donde se encuentran la mayoría de las especies, llegando en este último continente desde el S.O. de EE.UU. hasta la Patagonia Argentina y Chile (Galera, 2000).

El algarrobo negro, *Prosopis nigra* (Griseb) Hieron, es un árbol nativo ampliamente distribuido en el centro y norte de Argentina, comprendiendo las provincias de Córdoba, San Luis, La Pampa, Tucumán, Santiago del Estero, Salta, Jujuy, Chaco, Santa Fe, Entre Ríos y Formosa. Junto con el algarrobo blanco, es el “árbol por excelencia” de la región central de Argentina. (Giménez *et al.* 2003)

Las utilidades de esta especie son variadas, pasando desde su madera, aptitud forrajera, medicinal, colorantes y curtientes, hasta la fabricación de

alimentos y para consumo animal (Giménez *et al.* 2003). Diversos autores han reportado usos medicinales del género *Prosopis*, siendo esto un indicativo de la potencial utilidad de las diferentes especies frente a microorganismos. Carrizo *et al.* (2011) señalan que *P. rusCIFolia*, se emplea para tratar afecciones en ojos, hígado y para diabetes. Taisma (2016) indica que *P. juliflora* se emplea para tratar patologías traumatológicas, oftalmológicas, así como también diabetes, parasitosis y enfermedades eruptivas, entre otras. Samoylenko *et al.* (2009) encontraron que extractos de *P. glandulosa* poseen actividad antifúngica frente a los patógenos *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*; actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium intracellulare* siendo también efectivos contra los protozoarios *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum*.

El cultivo de soja (*Glycine max* L.) es de gran importancia económica en Argentina, alcanzando el 60% de la superficie sembrada del país (Strada Rodríguez y Villa, 2015). A nivel mundial se calcula que las pérdidas de rendimiento



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

en soja, ocasionadas por las enfermedades, oscilan entre el 10 y el 15 %. En Argentina los daños causados, anualmente, por las enfermedades de soja alcanzan del 8 al 10% del total de la producción (Ivancovich, 2011).

En la región núcleo de Argentina el complejo de enfermedades de final de ciclo está representado por “mancha marrón de la hoja” (*Septoria glycines* Hemmi.), “tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla” (*Cercospora kikuchii* T. Matsumoto y Tomoyasu) y “mancha ojo de rana” (*Cercospora sojina* Hara.) (Ivancovich, 2011).

El uso de productos químicos ha resultado muy eficaz para controlar las enfermedades fúngicas de las plantas, pero algunos problemas importantes amenazan el uso continuado de los fungicidas. En primer lugar, algunos hongos han desarrollado resistencia a los productos químicos, requiriendo el empleo de dosis más altas o nuevos fungicidas. En segundo lugar, algunos fungicidas no son fácilmente biodegradables y tienden a persistir durante años en el medio ambiente (Quiroga *et al.* 2009). Muchos investigadores han tratado de encontrar un control seguro y económico del

crecimiento de los hongos mediante el uso de extractos de diferentes partes de plantas (Quiroga *et al.* 2009).

Se ha encontrado que alcaloides extraídos de semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) poseen actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* (Zamora Natera *et al.* 2008). También se ha encontrado que los alcaloides extraídos de *Jatropha platyphylla* (Euphorbiaceae) poseen actividad inhibitoria contra el hongo fitopatógeno *Aspergillus parasiticus* (Leyva Acuña, *et al.* 2020).

Moro *et al.* (1975) encontraron, en hojas de *P. nigra*, los alcaloides triptamina, N-acetilriptamina, β -feniletilamina, tiramina y harmano, siendo el principal β -feniletilamina. En tanto, Samoylenko *et al.* (2009) encontraron los alcaloides juliprosina y juliprosopina en hojas, flores, tallos de *P. glandulosa*; estos mismos alcaloides fueron reportados por De Oliveira Carnerio *et al.* (2017) en *P. juliflora*.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica de los



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

alcaloides presentes en hojas de *P. nigra* frente al patógeno de soja *C. kikuchii*.

Materiales y métodos

Las muestras de *Prosopis nigra* (Griseb) Hieron para el presente trabajo fueron recolectadas en el departamento Diamante. Un ejemplar fue depositado en el Herbario Lorentz de Diamante (DTE005920).

La cepa de *C. kikuchi* fue adquirida del cepario perteneciente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

El material vegetal recolectado fue secado a la sombra a temperatura ambiente. Una vez seco se procedió a triturar hojas y pequeñas ramas o tallos de hasta 4 mm de diámetro en molinillo. Acondicionado el material se procedió a la extracción de la fracción de alcaloides según la técnica descrita por Moro *et al.* (1975).

Se tomaron 100 g de hojas y tallos secados al aire y pulverizados, los cuales se dejaron macerar con 300 ml de HCl al 10% durante 24 h a 70° C, se filtraron, y al residuo resultante se le agregaron 100 ml de la misma solución, dejándolo macerar

nuevamente por 24 h a 70° C. Posterior a la maceración se volvió a filtrar. Los extractos ácidos combinados se alcalinizaron mediante el agregado de Na₂CO₃ hasta alcanzar pH 9. Con la solución alcalina se realizó una partición líquido/líquido simple utilizando éter etílico por 72 h. El extracto etéreo que contenía la mezcla de los alcaloides se evaporó a sequedad al vacío a 40° C y el residuo se disolvió en etanol.

La evaluación antifúngica de la fracción de alcaloides frente a *C. kikuchi* se realizó mediante el método de difusión en disco utilizado por Sequin *et al.* (2019)

En las placas de Petri con 10 mL de medio YMDA (4 g.l⁻¹ de extracto de levadura, 4 g.l⁻¹ de extracto de malta, 10 g.l⁻¹ de glucosa y 15 g.l⁻¹ de agar bacteriológico) se sembraron 100 µL de solución de inóculo, obtenida mediante el raspado con ansa del cultivo del hongo en medio YMDA de 7 a 10 días de crecimiento, de manera tal que se asegurasen su pureza y viabilidad. Esta solución se distribuyó en toda la superficie del medio de cultivo contenido en la placa mediante hisopo esteril. A continuación se colocaron discos de papel Whatman No. 4, estériles, de 5 mm de diámetro, a los



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

cuales se le colocaron 3 diferentes dosis de la fracción de alcaloides, utilizando 15 μl , 10 μl o 5 μl por disco, de una solución de alcaloides de 36,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Además se incluyó un control positivo de 5 μl de difenoconazol con una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y uno negativo que contenía 15 μl de etanol. Los discos se colocaron en la superficie del medio contenido en las placas, espaciados regularmente en forma excéntrica. Se realizaron 3 repeticiones. Las placas fueron invertidas e incubadas en estufa por 7 días a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se midió el halo de inhibición del crecimiento micelial alrededor de cada disco a los 7 días de iniciado el ensayo.

Los datos obtenidos como halos de inhibición se sometieron a análisis de Kruskal Wallis . Los datos se procesaron utilizando el software estadístico Infostat, Version 2017I (Di Rienzo *et al.* 2017).

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

Análisis estadístico de los halos de inhibición del crecimiento de *C. kukuchi*.

Tratamiento	N	Media	D.E.	Mediana	H	p
5 μl	3	7,33	0,58	7,0	4,73	0,158
10 μl	3	8,67	0,58	9,0		
15 μl	3	9,33	0,58	9,0		
Dif.	3	14	10,4	9,0		

Los resultados muestran que la fracción de alcaloides presenta actividad antifúngica y que no hubo diferencias significativas entre las dosis ensayadas y el difenoconazol. Los tratamientos de 15 μl , 10 μl y el control positivo de difenoconazol presentaron una mediana igual a 9 mm, mientras que el tratamiento de 5 μl presentó una mediana de 7 mm. Los resultados muestran que las dosis entre 180 y 550 μg fueron bioactivas (figura 1). Estos valores están por debajo de los valores informados por Sequin *et al.* (2020) cuando evaluaron el extracto metanólico de hojas de *P. nigra*. Estos autores atribuyeron la bioactividad a la presencia de triptamina en el extracto. La triptamina es un alcaloide, con lo cual es probable que la fracción de alcaloides utilizada en este trabajo esté enriquecida en este compuesto, lo que explicaría los valores inferiores de dosis bioactivas



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

observadas, comparado con el extracto metanólico antes mencionado.

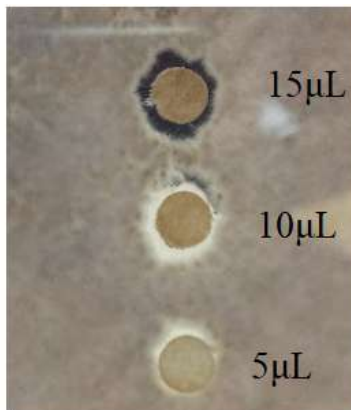


Figura 1

Halo de inhibición producido por la fracción de alcaloides frente a *C. kikuchi*.

Conclusiones

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que los extractos vegetales de hojas de *P. nigra* pueden ser utilizados en el control de *C. kikuchii*, siendo necesario considerar la investigación en cuanto a la purificación de las sustancias responsables de la actividad antifúngica y su aplicación a campo.

Bibliografía

Burkart, A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *J Arnold Arbor*. 57: 219-249; 450-455.

Carrizo, E. del V.; Palacio, M. O.; Roic, L.D.; Villaverde, A. A.; Soria Pereyra, M. L. y Torres, M.A.,. (2011) “Utilización de especies de *Prosopis l.* por pobladores rurales en Santiago Del Estero” Recuperado de: <https://fcf.unse.edu.ar/eventos/2-jornadas-forestales/pdfs/Utilizacion%20de%20Prosopis.pdf>

De Oliveira Carneiro, K. (2017). Isolamento e avaliação da atividade anticolinérgica de alcaloides de *Prosopis juliflora* obtida no semiárido baiano. *Anais dos Seminários de Iniciação Científica*, (21).

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., y Robledo C.W. (2017). *InfoStat* versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Argentina.

Galera, F. 2000. Las especies del género *Prosopis* (Algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. (Recopilación y Elaboración). Córdoba, Argentina.

Giménez, A. M., Ríos, N. A., & Moglia, J. G. (2003). Crecimiento de *Prosopis nigra* (Griseb.) Hieron (Algarrobo negro) en Santiago del Estero,



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

- Argentina. *Foresta Veracruzana*, 5(2), 17-22.
- Ivancovich, A. (2011). Enfermedades de soja: diagnóstico y manejo. *Buenos Aires*.
- Leyva Acuña, M. A., Quintana Obregón, E. A., Soto Landeros, F., Baez Parra, K. M., Montes Ávila, J., y Angulo Escalante, M. A. (2020). Actividad antifúngica de alcaloides del extracto metanólico de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*. *Biotecnia*, 22(3), 100-107.
- Moro, G. A., Graziano, M. N., & Coussio, J. D. (1975). Alkaloids of *Prosopis nigra*. *Phytochemistry*.
- Quiroga, E. N., Sampietro, D. A., Sgariglia, M. A., Soberón, J. R., & Vattuone, M. A. (2009). Antimycotic activity of 5'-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species. *International journal of food microbiology*, 132(1), 42-46.
- Samoylenko, V., Ashfaq, M. K., Jacob, M. R., Tekwani, B. L., Khan, S. I., Manly, S. P., y Muhammad, I. (2009). Indolizidine, antiinfective and antiparasitic compounds from *Prosopis glandulosa* Torr. Var. *glandulosa*. *Planta Medica*, 75(04), P-48.
- Sequín, C. J., Sampietro, D. A., Gomez, A. A., Catalán, C. A., & Aceñolaza, P. G. (2019). Antifungals from forest trees: Usefulness in the control of etiological agents of late season soybean diseases. *Annals of Applied Biology*, 174(3), 293-300.
- Sequín, C. J., Sampietro, D. A., Sgariglia, M. A., Soberón, J. R., Catalán, C. A., & Aceñolaza, P. G. (2020). Use of extracts from *Prosopis nigra* in the control of *Cercospora kikuchii* and *Septoria glycines*. *Industrial Crops and Products*, 158, 112979.
- Strada Rodríguez, Julia; Vila, Ignacio; La producción de soja en Argentina: causas e impactos de su expansión; Centro Cultural de la Cooperación Floreal Gorini; *La Revista del CCC*; 23; 12-2015; 1-11
- Taisma, M. A. (2017). Usos medicinales de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. en comunidades rurales de la península de Paraguaná, Venezuela. *Revista peruana de biología*, 24(1), 79-86.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

Zamora Natera, F., García López, P., Ruiz-López, M., y Salcedo Pérez, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia*, 42(2), 185-192.

Búsqueda de microorganismos biotransformadores de cannabinoides en el microbioma de dos variedades de *Cannabis sativa* L. cultivada en Uruguay



C 28 – Productos Naturales bioactivos y sus aplicaciones

Búsqueda de microorganismos biotransformadores de cannabinoides en el microbioma de dos variedades de *Cannabis sativa* L. cultivada en Uruguay

Autor: Piria, Franco; fpiria@fq.edu.uy

Co-autora: Cavallaro Florencia; florcav88@hotmail.com

Profesor/es guía: García, Carlos; e.mail: carlosga@fq.edu.uy;

Rodríguez, Paula; email: paularod@gfq.edu.uy;

Giorgi, Victoria; vgiorgi@fq.edu.uy

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Facultad de Química, UDELAR

- Resumen

Los fitocannabinoides son los principios activos mayoritarios del *Cannabis*. Se encuentran principalmente en las inflorescencias de plantas femeninas y presentan actividades farmacológicas que incluyen analgésica, antioxidante y antiinflamatoria, entre otras. Las biotransformaciones son una herramienta importante para el descubrimiento de nuevos compuestos con diferentes actividades biológicas. Dado que los microbiomas vegetales presentan sistemas enzimáticos que les permiten vivir en presencia de compuestos de defensa de la planta, se postula que su potencial biocatalítico es muy grande. El presente trabajo se centra en la búsqueda de biocatalizadores que permitan obtener nuevos compuestos mediante la

biotransformación de fitocannabinoides.

Se realizó el aislamiento de microorganismos de las inflorescencias de dos variedades de *Cannabis* (una rica en THCA, y otra en CBDA) cuyo perfil de cannabinoides se determinó mediante HPLC-DAD. Los aislamientos fueron realizados en medios nutrientes y mínimos utilizando el cannabinoide como fuente de carbono y energía. Los microorganismos fueron caracterizados morfológicamente, mediante pruebas bioquímicas, y actualmente están siendo identificados mediante técnicas moleculares. Se realizó un screening de la actividad biocatalítica de los microorganismos sobre CBD, seleccionándose un hongo filamentoso para continuar con los estudios de biotransformación. En este trabajo se presentan los resultados del aislamiento de

microrganismos desde las dos variedades de *Cannabis*, su caracterización, y el screening para evaluar su capacidad de biotransformar CBD.

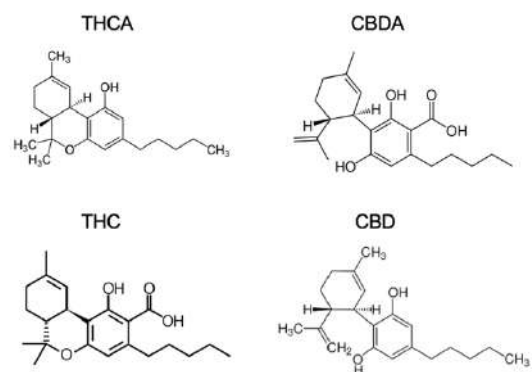
Palabras clave: Biotransformación, Cannabinoides, Microbioma, CBD

- Introducción

Cannabis sativa L., pertenece al género *Cannabis* de la familia Cannabaceae. Sus aplicaciones incluyen principalmente usos medicinales, religiosos y recreativos, hasta la producción de fibras textiles a partir de los tallos o la obtención de “aceites fijos” presentes en las semillas (Clarke and Merlin 2016). Las flores femeninas de la planta están cubiertas por pelos glandulares o “tricomas” (Farag and Kayser 2017). Es en estas estructuras donde se almacenan los cannabinoides (Gertsch, Pertwee, and di Marzo 2010). Según el quimiotipo, una planta de *Cannabis* tendrá como cannabinoide predominante al tetrahidrocannabinol (THC, variedad “tipo droga”) o el cannabidiol (CBD, variedad “tipo fibra”). Estos compuestos son biosintetizados en la planta a partir del CBGA. Los cannabinoides presentes en el material vegetal fresco suelen estar en su forma ácida. Al calentarse, los cannabinoides se descarboxilan dando sus

formas neutras (Shani A and Mechoulam 1974; Veress and Leisztner 1990).

Estos compuestos terpenofenólicos son de gran interés debido a sus múltiples propiedades medicinales y psicoactivas. Muchas de estas propiedades se deben a la interacción de los cannabinoides con los receptores CB1 y CB2 (Munro, L. Thomas, and Abu-Shaar 1993) del sistema endocannabinoide (Basavarajappa 2017; Maccarrone et al. 2015). Este sistema neuromodulador se encarga de regular varias funciones vitales, como ser apetito, sensación al dolor, humor y mediar los efectos psicoactivos del *Cannabis* (Aizpurua-Olaizola et al. 2017). A la fecha se han reportado más de 120 cannabinoides, que a su vez se pueden clasificar en once subclases estructurales (EISOhly et al. 2017; Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).



[Figura 1]



Tanto el THC como el CBD han mostrado diferentes actividades biológicas que los hacen fármacos con actividad terapéutica probada (Duncan, 2014a) o potencial (Duncan, 2014b). Pequeñas variaciones estructurales dan lugar diferentes actividades biológicas y mecanismos de acción, lo que amplía las posibilidades para el uso terapéutico de esta familia de compuestos. De esta forma, el hallazgo de nuevos derivados cannabinoideos es un área de investigación actual y de creciente interés.

El microbioma es un término que describe el genoma colectivo de las comunidades microbianas, la llamada microbiota, que se asocia con humanos, animales y plantas (Taghinasab and Jabaji 2020). Las plantas albergan distintas comunidades microbianas beneficiosas en sus tejidos. Además estas resultan una gran fuente de metabolitos secundarios interesantes tanto estructuralmente como por su actividad biológica. Es sabido que en ocasiones se observan vías metabólicas de la planta en los microorganismos que en ella habitan (Strobel et al. 2004). Se ha postulado que este hecho puede responder a la recombinación génica huésped-hospedero que se da a lo largo de mucho tiempo de coevolución (Stierle et al. 1995). Asimismo, estos microorganismos deben vivir en un ambiente con la presencia de compuestos

de defensa producidos por la planta por lo que necesitan estar adaptados mediante una maquinaria enzimática que biodegrade los mismos (Yue, Bacon, and Richardson 1998; Zikmundová et al. 2002). Ambos antecedentes sustentan la hipótesis de que los microorganismos endófitos pueden albergar enzimas con un enorme potencial en biocatálisis. El microbioma del *Cannabis* aún es un tema poco explorado. En 2013, Gautam et al. reportaron el aislamiento de hongos endófitos de hojas, tallos y pecíolo de *Cannabis*, encontrándose 12 especies de 8 géneros incluyendo *Aspergillus*, *Penicillium* y otros (Gautam, Kant, and Thakur 2013). Casi todos los hongos endofitos no simbióticos reportados por otros estudios son *Ascomycetes*, reportándose también algunos casos de *Basidiomycetes* (Scott et al. 2018). Respecto a las hojas del *Cannabis*, la mayor parte de cepas bacterianas detectadas son de los generos *Pseudomonas* y *Bacillus* (Afzal, Shinwari, and Iqar 2015; Gautam et al. 2013; McKernan et al. 2016; Taghinasab and Jabaji 2020). En un estudio reportado en 2020 se realizó metagenómica para estudiar el microbioma de diferentes plantas de *Cannabis*, observándose que las bacterias que habitan en mayor porcentaje las flores de *Cannabis* son: *Pseudomonas* (gen), *Lactococcus lactis*,



Enterobacter (gen) y *Bacillus cereus*, y los hongos: *T. washingtonensis*, Ascomycota (filo), *B. alba* y *Epicoccum* (gen) (Barnett et al. 2020). Cabe destacar que son pocos los estudios sobre el microbioma de las flores de *Cannabis* realizados hasta el momento, por lo que explorar la comunidad de microorganismos presentes en *Cannabis sativa* resulta de gran interés siendo una potencial fuente para obtener biocatalizadores novedosos.

Las biotransformaciones son modificaciones químicas producidas sobre un compuesto orgánico (sustrato) mediadas por organismos vivos (habitualmente microorganismos o cultivos celulares) o sus partes (Crueger & Crueger, 1990). El éxito de esta metodología se sustenta en las propiedades de estos catalizadores naturales de actuar en condiciones suaves de reacción, en ser las reacciones en las que participan altamente regio y estereoselectivas, y en proveer productos de difícil obtención por métodos tradicionales como la síntesis clásica o el aislamiento de metabolitos de su fuente natural (Moyna & Menéndez, 2001; de Carvalho, 2011). Los procesos biocatalíticos generan menos residuos tóxicos, emisiones y subproductos

comparados con los procesos químicos tradicionales (Gavrilescu and Chisti 2005). En tanto procesos naturales, las biotransformaciones integran un área de desarrollo dentro de la química verde que implica el uso de biosíntesis, biocatálisis y transformaciones químicas basadas en biotecnología para la selectividad y eficiencia (Tundo et al. 2000). En el área de la biocatálisis y las biotransformaciones existe continuamente la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos biocatalizadores que permitan diversificar el rango de productos obtenibles por métodos biocatalíticos (Rodríguez, Gonzalez, and Rodríguez Giordano, 2016).

La biotransformación de los cannabinoides surge como una herramienta importante para el descubrimiento de nuevos compuestos, metabolitos desconocidos con estructuras únicas y nuevas entidades terapéuticas. En este marco, existen algunos trabajos que describen la biotransformación de cannabinoides mediante el uso de diferentes biocatalizadores, como ser células de mamíferos, células vegetales y microorganismos (Akhtar, Shaari, and Verpoorte 2016). Estudios recientes reportaron la biotransformación de CBD utilizando una biblioteca de 31 microorganismos, encontrando que 3 hongos filamentosos fueron capaces de



metabolizar CBD dando diferentes productos de hidroxilación (Ahmed et al. 2021).

En este contexto es que surge el interés por la búsqueda de microorganismos de *Cannabis sativa* que puedan ser utilizados como biocatalizadores para la obtención de derivados de cannabinoides con actividad biológica. En este trabajo se realizó el aislamiento de los microorganismos que habitan dos variedades de inflorescencias de *Cannabis* cultivado en Uruguay, una rica en THCA y otra en CBDA. Los microorganismos fueron caracterizados morfológicamente, mediante pruebas bioquímicas y actualmente se está trabajando en la identificación por técnicas moleculares. Adicionalmente se determinó el perfil de cannabinoides de los materiales vegetales de partida mediante HPLC-DAD y se trabajó en la purificación de THC a partir del material vegetal. Se realizó un screening de actividad biocatalítica de los microorganismos sobre el CBD, seleccionándose un hongo filamentoso para seguir trabajando en estudios de biotransformación. Actualmente se está realizando también el screening de actividad biocatalítica de los microorganismos sobre el THC purificado. En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos hasta el momento

- **Objetivos**

El objetivo general de esta investigación es obtener nuevos productos a partir de la biotransformación de THC y CBD mediante biocatalizadores aislados del microbioma de plantas de *Cannabis*. En este trabajo se presentan las actividades realizadas para cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinación del contenido de cannabinoides en dos variedades de *Cannabis sativa* L., una rica en THCA (variedad A) y otra en CBDA (variedad B).
- 2) Obtención de THC con pureza mayor al 70% para realizar los aislamientos de los microorganismos en la variedad A.
- 3) Aislamiento de microorganismos constituyentes del microbioma de dos variedades de *Cannabis*.
- 4) Identificación y caracterización de los microorganismos aislados
- 5) Screening de la capacidad de los microorganismos aislados de la variedad B para la biotransformación de CBD



- Materiales y métodos

Determinación de cannabinoides en inflorescencias de Cannabis:

El material vegetal es secado en estufa a 35 °C hasta masa constante. Se muele hasta presentar tamaño homogéneo y se realiza un cuarteo.

Se realiza por duplicado una maceración dinámica durante 30 min a partir de 0,5 g del material molido con 40 mL de una mezcla metanol:cloroformo 9:1. Luego se sonica durante 15 min y se filtra por papel para luego llevarse a un volumen final de 50 mL. A partir de esta solución se preparan dos diluciones para inyectar en el HPLC, una para determinar cannabinoides principales y otra para los minoritarios. Los cannabinoides son cuantificados mediante el uso de una curva de calibración con estándar interno diazepam en el rango de 1 a 100 ug/mL ($r^2 > 0,99$). Los cannabinoides neutros se miden a 228 nm, los ácidos a 270 nm y el ácido cannabícroménico (CBCA) a 253 nm en caso de detectarse.

Los extractos a analizar son inyectados en un cromatógrafo Shimadzu DGU 205R Ultra HPLC-DAD con una columna Hypersil C18 (150 mm 4,6 mm, i.d. 3 um), precolumna Hypersil BDS C18 (10 mm x 4 mm, i.d. 3 um) (ThermoFisher Scientific,

Inc.) equipado con bomba cuaternaria, autoinyector, horno termostatzado para la columna y un detector de arreglo de diodos para el rango UV-vis. La temperatura del horno se fijó a 25 °C, el volumen de inyección fue 10 uL y el tiempo total de la corrida fue de 18 min usando como fase móvil un gradiente de solventes compuesto de ácido fórmico 0,1 mM a pH 3,53 (solvente A) y acetonitrilo (solvente B) con un flujo de 1 mL/min. El gradiente comenzó con 70% de B por 7 min, luego subió a velocidad constante hasta 83,5% por 1 min, luego subió hasta 88,5% en 3 min, luego hasta 99% en 1 min, manteniéndose constante por 2 min.

A 0,5 mL de las soluciones metanólicas a cuantificar se les agrega igual volumen de una solución de diazepam 0,02 mg/mL, este compuesto es utilizado como estándar interno y su concentración final al ser inyectado es de 0,01 mg/mL. Luego las soluciones son filtradas e inyectadas. El espectro de absorción se obtiene en el rango de 200 a 400 nm y los datos se obtienen a través del software LabSolutions.

Aislamiento de THC:

La metodología de aislamiento planteada implica realizar la misma en presencia del cannabinoide sustrato de la posterior



biotransformación. Para ello se consideró disponer de THC de pureza mayor al 70%. Para obtener esta muestra se comenzó por la descarboxilación de 30 g de material vegetal rico en THCA a 110 °C durante 1 h. El material descarboxilado fue macerado dinámicamente con 500 mL de EtOH absoluto. Este extracto fue luego winterizado a -18 °C durante 48 h para precipitar ceras y posteriormente filtrarlas. Una vez filtradas las ceras el extracto fue evaporado a presión reducida, obteniéndose 4,37 g de una resina marrón. Para purificar THC se ingresó la resina (previamente retomada en 4 mL de hexano) a una columna de cromatografía líquida a vacío (VLC) de 4 cm de radio y 10,5 cm de altura. La fase estacionaria elegida fue silica flash y la misma fue compactada con hexano hasta 4 cm de altura. La fase móvil fue una mezcla de Hex:AcOEt, las fracciones obtenidas fueron de 200 mL el gradiente realizado fue el siguiente:

F1 y F2: Hexano

F3, F4 y F5: Hex:AcOEt 9:1

F6, F7 y F8: Hex:AcOEt 8:2

Metodología de aislamiento de microorganismos de las inflorescencias:

Los medios de cultivo elegidos para bacterias son Caldo de Tripton de Soja

(TSB) como medio nutriente y M9 como medio mínimo. Para levaduras y hongos filamentosos se utilizaron Caldo Papa Dextrosa (PDB) como medio rico y Base de Nitrógeno de Levadura sin Aminoácidos (YNB) como medio mínimo.

En un matraz de 50 mL se agregan en condiciones asépticas 10 mL de medio de cultivo, 0,7 g de inflorescencias troceadas a tijera y el cannabinoide neutro principal del material vegetal del cual se realiza el aislamiento (THC para el aislamiento de la variedad A y CBD para la variedad B). En cada caso el cannabinoide fue agregado a partir de una solución etanólica al 20%. En el caso del CBD, esta solución se preparó a partir de CBD comercial (95%, Global Cannabinoids™), mientras que para el THC, se hizo a partir de una resina de pureza mayor al 70%. En el caso de los medios nutrientes se agregaron 200 uL de esta solución, mientras que para los medios mínimos se agregaron 50 uL. Con estos agregados se llegó a concentraciones finales de 0,4% y 0,1% del cannabinoide para los medios nutrientes y mínimos respectivamente.

Los microorganismos se cultivaron en un agitador orbital a 30 °C, a 150 rpm y tapados con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz. Los cultivos se observaron cada 24 h y al detectarse turbidez en los matraces se tomó un



inóculo (vol.1/10) y se sembraron en matraces nuevos con medio de cultivo y cannabinoide. Se incubaron en las condiciones mencionadas anteriormente. Estos enriquecimientos se llevaron a cabo por dos repiques sucesivos para los aislamientos de la variedad A y tres para la variedad B.

En cada etapa de los cultivos los mismos fueron crioconservados, para ello se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo crecido, se agregaron 500 mL de glicerol y se conservaron a -70 °C.

Para los aislamientos se realizó una siembra por estrías en placas con medio de cultivo Triptona de Soja Agar (TSA) para recuperar cepas bacterianas y en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) para levaduras y hongos filamentosos. Las placas se incubaron a 30 °C y se observaron a diario. A medida que se observaron colonias nuevas se aislaron en medios nutrientes para obtener cultivos puros. Una vez obtenidos cultivos puros, se sembraron las bacterias en medio TSB y las levaduras en PDB para luego crioconservarlas según la metodología descrita anteriormente. Los hongos filamentosos se conservaron en placas de PDA a 4°C.

Caracterización morfológica y pruebas bioquímicas:

Todos los microorganismos aislados fueron observados en placas de cultivo puro, determinándose el tamaño, tipo y color de colonias para las bacterias y levaduras, y observando el color y tipo de crecimiento para los hongos filamentosos. Se realizaron observaciones al microscopio, en el caso de las bacterias y levaduras se realizó el método de tinción de Gram, mientras que los hongos se observaron como cultivo fresco. Se realizaron pruebas bioquímicas primarias para las bacterias: Catalasa, Oxidasa, Oxido/Fermentación de glucosa, crecimiento en Caldo Tioglicolato y movilidad.

Screening de biotransformación del CBD por microorganismos aislados de la variedad B:

Para el caso de las bacterias se sembró cada microorganismo a partir del cultivo crioconservado a una placa de TSA y se incubó a 30 °C durante 24 h. Se tomó una colonia y se inoculó en medio TSB y se incubó a 30 °C durante 18 h (precultivo). Para las bacterias que fueron aisladas utilizando medio nutriente se realizó el ensayo de biotransformación en el mismo medio, mientras que para las aisladas en medio mínimo se realizó el ensayo tanto en medio mínimo como en medio nutriente. En



todos los casos se agregaron 50 uL del precultivo y 125 uL de una solución etanólica al 8% del cannabinoide a estudiar a 5 mL de medio, llegándose a una concentración final de CBD de 0,2%. Las biotransformaciones se incubaron en agitador orbital a 150 rpm y 30 °C. A las 48 h se realizó la extracción de los compuestos con acetato de etilo (x3).

Para el caso de las levaduras, se sembraron a partir del cultivo conservado en placas con medio PDA y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Se tomó una colonia y se sembró en 10 mL de PDB, se incubó durante 48 h a 30 °C y 150 rpm para generar el precultivo. Este precultivo fue luego centrifugado a 10000 rpm durante 10 min y el pellet celular se lavó con suero fisiológico. La biomasa generada se inoculó en un matraz con 10 mL de una solución de glucosa al 10% con CBD al 0,2%. Este matraz se incubó en agitador orbital a 30 °C y 150 rpm envuelto en papel de aluminio. A las 48 h se realizó la extracción completa con AcOEt (x3).

En el caso de los hongos filamentosos, se inocularon dos bocados del micelio crecido en placa de PDA a 10 mL de medio de cultivo con CBD al 0,2%. Se incubaron en agitador orbital, a 30 °C y 150 rpm. Se realizó una microextracción a partir de 400 uL del medio a los 7 días y la extracción completa a los 12 días con AcOEt (x3).

Todos los extractos fueron secados con MgSO₄ anhidro y filtrados por papel, para luego ser llevados a un volumen de 1 mL. Para todos los casos se realizaron tanto controles de microorganismo como de CBD en el medio de cultivo.

Los extractos fueron analizados por cromatografía en capa fina (TLC), usando una fase Hex:AcOEt 8:2 y revelando por UV y anisaldehído. Para aquellos en los que se vieron manchas con un R_f diferente al del CBD se realizó otra placa en la que también se reveló con Fast Blue. Posteriormente se procedió a la inyección de estos extractos en HPLC-DAD para poder comparar el perfil de las biotransformaciones. El cromatograma se observó a 228 nm y se analizaron visualmente los espectros de los picos de interés.

- Resultados y discusión

Determinación de cannabinoides en ambas variedades de Cannabis:

Se determinó el perfil de cannabinoides principales para ambas variedades obteniéndose los siguientes resultados:

Compuesto	Varietad A	Varietad B
THCA	10,75	1,034
CBDA	nd	4,182
CBGA	0,556	0,265
THC	0,271	nd
CBD	nd	0,185
CBCA	0,187	nd
THCVA	0,063	nd

Se confirma que los cannabinoides principales eran los que se suponía.

Respecto a la variedad A, que al momento de ser cosechado no estaba del todo avanzada su etapa de floración, resulta interesante notar que el segundo cannabinoide principal sea el ácido cannabigerólico (CBGA) y que este se encuentre en mayor concentración que en la variedad B, que sí estaba en una etapa más avanzada. Teniendo en cuenta que el CBGA es el cannabinoide precursor tanto del THCA como del CBDA, se podría suponer que esta transformación se da en mayor proporción en la etapa de floración.

El material B, si bien presenta como cannabinoide principal al CBDA, cuenta con una cantidad apreciable de THCA. Teniendo en cuenta el marco de la ley 19172, decreto N° 372/014, Capítulo 1, que

cataloga como “*Cannabis* psicoactivo” a aquel que cuenta con una cantidad total de THC mayor al 1% ($THC_{total} = THC + 0,887 * THCA$) podemos clasificar a esta variedad como “no psicoactiva”.

Purificación de THC:

Las fracciones 4, 5 y 6 presentaron una tonalidad amarilla/naranja, el resto fueron transparentes. Las fracciones fueron concentradas en rotavapor y analizadas por TLC (Hex:AcOEt 8:2, revelador anisaldehído), viéndose una mayor concentración de THC para las fracciones 4, 5 y 6. Estas fracciones fueron rotavaporadas a sequedad y el contenido de THC fue determinado por el método de estándar interno (Diazepam) mediante HPLC, obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	m (g)	THC (%)
F4	0,2526g	73,8
F5	2,7208	77,6
F6	0,1593	26,2

F6 fue descartada y para los aislamientos se decidió juntar F4 con 185 mg de F5, obteniéndose una muestra de %THC = 75,5%.



Aislamientos de microorganismos de ambas variedades de *Cannabis*:

De la variedad B se aislaron un total de 7 bacterias, 3 levaduras y 4 hongos filamentosos. Se llevó a cabo una caracterización preliminar de las bacterias aisladas mediante la realización de pruebas bioquímicas primarias para bacterias heterótrofas según Cowan & Steel (Cowan & Steel, 2003). De esta forma se caracterizaron 4 cepas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae: M4A, Y4C, PHiiA y M2A; dos bacterias aerobias: M2B e Y2A y una cepa perteneciente al género *Pseudomonas* (T4B). Asimismo, se aislaron 3 cepas de levaduras: P1A, Y4A y PHA y 4 hongos filamentosos: P4C, PHH, Y2C (*Fusarium*) y Y4B (*Trichoderma*).

De la variedad A se aislaron un total de 5 bacterias, 3 levaduras (IIP3A, IY3A e IY3B) y 4 hongos filamentosos (IY3C, IY3D, IY3E y IY3F). Luego de llevadas a cabo las pruebas bioquímicas descritas anteriormente se caracterizaron 4 cepas bacterianas de la familia Enterobacteriaceae: IIP7A, IY7A, IIM3B, IIT3A y una *Micrococcus* IIM3A.

Screening de biotransformación del CBD por microorganismos aislados de la variedad B:

Una vez analizados los extractos de las biotransformaciones y los blancos por TLC y observados los cromatogramas obtenidos mediante HPLC se llegó a las siguientes conclusiones:

Los organismos PHiiA, M2A y M4B, P1A y PHA fueron descartados como potenciales biotransformadores del CBD por no observarse manchas diferentes al CBD en las respectivas TLCs.

En el extracto de la levadura Y4A, cultivada en PDB con CBD se observa que el consumo del mismo fue bajo, de modo que es posible que los picos nuevos correspondan a transformaciones de otros compuestos presentes en la muestra. Además, los picos nuevos tienen un área muy baja, de modo que se descartó esta levadura como potencial biotransformadora. La bacteria Y4C dio un perfil muy parecido al de esta levadura, pero sí se observó una disminución del pico del CBD respecto al blanco. Igualmente se decide no seguir trabajando con este microorganismo debido a que los picos nuevos resultan insignificantes.

T4B e Y2A no presentaron picos diferentes a los de los blancos. Se descartaron como potenciales biotransformadores. De igual manera se descartaron los hongos P4C y

PHH como potenciales biotransformadores.

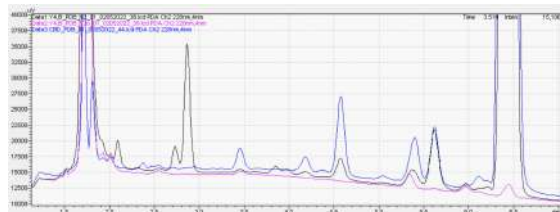
La bacteria M4A presenta un pico relevante a 1,98 min que no aparece en el blanco.

Se elige seguir trabajando con este organismo por ser la cepa bacteriana biotransformadora más prometedora.

Asimismo, se seleccionan los hongos Y2C e Y4B para seguir trabajando. Y2C presentó dos picos de biotransformación de *r_f* 8,7 y 9,9. Y4B presentó dos picos nuevos relativamente grandes a 2,8 en PDB y uno a 1,8 en YNB.

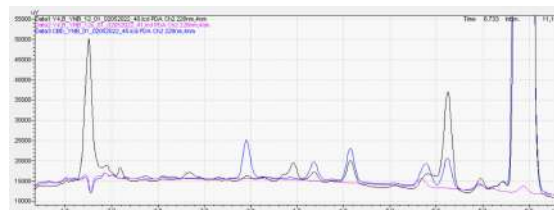
De todos los microorganismos aislados de las flores del material B, el hongo filamentoso Y4B parece ser el candidato más prometedor. Al realizar el ensayo de biotransformación en PDB se observan un par de picos nuevos a 2,7 y 2,9 min. **[figura 2]** En el ensayo en YNB se observa un gran pico nuevo a 1,75 min. **[figura 3]**.

Cromatogramas de Y4B en PDB:



[figura 2]

Cromatogramas de Y4B en YNB:



[figura 3]

En estas figuras el cromatograma negro corresponde al extracto de la biotransformación, mientras que el azul y el rosa son los controles de sustrato y microorganismo respectivamente.

Perspectivas:

Se seguirá trabajando para caracterizar a nivel molecular los microorganismos aislados.

Se realizarán nuevos procesos de purificación sobre las fracciones ricas en THC obtenidas por VLC con el objetivo de obtener un extracto con una pureza en THC mayor al 90% para utilizarlo en el screening de biotransformaciones con los microorganismos aislados del material A.

Se trabajará en optimizar las condiciones del ensayo de biotransformación para lograr obtener los productos en mayores cantidades en pos de caracterizarlos estructuralmente y realizar ensayos de actividad biológica de los mismos.



- Conclusiones

Se determinó el perfil de cannabinoides de ambas variedades de *Cannabis*.

Se logró obtener una muestra con pureza de THC mayor al 70%.

De la variedad A se aislaron un total de cuatro enterobacterias, un *Micrococcus*, tres levaduras y cuatro hongos filamentosos, encontrándose el género *Fusarium*.

De la variedad B se aislaron un total de cuatro enterobacterias, una *Pseudomona*, una bacteria oxidante de glucosa, una inactiva ante la glucosa, tres levaduras y cuatro hongos filamentosos, encontrándose también el género *Fusarium*.

Enterobacterias, *Pseudomonas* y *Fusarium* están reportadas en publicaciones anteriores como pertenecientes al microbioma de las flores de *Cannabis*.

El microbioma del *Cannabis* resulta una fuente interesante de microorganismos con potencial poder biocatalizador de sustratos cannabinoides. Se seleccionaron dos hongos filamentosos (Y2C e Y4B) y una bacteria (M4A) para seguir realizando

estudios sobre la biotransformación del CBD.

- Bibliografía

- Afzal, Imran, Zabta K. Shinwari, and Irum Iqrar. 2015. *Selective Isolation and Characterization of Agriculturally Beneficial Endophytic Bacteria from Wild Hemp Using Canola*. Vol. 47.
- Ahmed, Safwat A., Amany K. Ibrahim, Mohamed M. Radwan, Desmond Slade, Suman Chandra, Ikhlas A. Khan, and Mahmoud A. Elsohly. 2021. “Microbial Biotransformation of Cannabidiol (CBD) from Cannabis Sativa.” *Planta Medica*. doi: 10.1055/a-1468-3781.
- Aizpurua-Olaizola, Oier, Izaskun Elezgarai, Irantzu Rico-Barrio, Iratxe Zarandona, Nestor Etxebarria, and Aresatz Usobiaga. 2017. “Targeting the Endocannabinoid System: Future Therapeutic Strategies.” *Drug Discovery Today* 22(1):105–10.
- Akhtar, Muhammad T., Khozirah Shaari, and Robert Verpoorte. 2016. “Biotransformation of Tetrahydrocannabinol.” *Phytochemistry Reviews* 15(5):921–34.
- Barnett, Samuel E., Ali R. Cala, Julie L. Hansen, Jamie Crawford, Donald R. Viands, Lawrence B. Smart, Christine D.



- Smart, and Daniel H. Buckley. 2020. "Evaluating the Microbiome of Hemp." *Phytobiomes Journal* 4(4):351–63. doi: 10.1094/PBIOMES-06-20-0046-R.
- Basavarajappa, Balapal S. 2017. "Cannabinoid Receptors and Their Signaling Mechanisms." Pp. 25–62 in *The Endocannabinoid System: Genetics, Biochemistry, Brain Disorders, and Therapy*. Elsevier Inc.
- de Carvalho, Carla C. C. R. 2011. "Enzymatic and Whole Cell Catalysis: Finding New Strategies for Old Processes." *Biotechnology Advances* 29(1):75–83.
- Cowan, S. T. (2003). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge university press.
- Clarke, Robert C., and Mark D. Merlin. 2016. "Cannabis Domestication, Breeding History, Present-Day Genetic Diversity, and Future Prospects." *Critical Reviews in Plant Sciences* 35(5–6):293–327. doi: 10.1080/07352689.2016.1267498.
- EISohly, Mahmoud A., Mohamed M. Radwan, Waseem Gul, Suman Chandra, and Ahmed Galal. 2017. "Phytochemistry of Cannabis Sativa L." *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 103:1–36.
- Farag, S., and O. Kayser. 2017. "The Cannabis Plant: Botanical Aspects." Pp. 3–12 in *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*. Elsevier Inc.
- Flores-Sanchez, Isvett Josefina, and Robert Verpoorte. 2008. "Secondary Metabolism in Cannabis." Pp. 615–39 in *Phytochemistry Reviews*. Vol. 7.
- Gautam, Ajay Kumar, Mona Kant, and Yogita Thakur. 2013. "Isolation of Endophytic Fungi from Cannabis Sativa and Study Their Antifungal Potential." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46(6):627–35. doi: 10.1080/03235408.2012.749696.
- Gavrilescu, Maria, and Yusuf Chisti. 2005. "Biotechnology - A Sustainable Alternative for Chemical Industry." *Biotechnology Advances* 23(7–8):471–99.
- Gertsch, Jürg, Roger G. Pertwee, and Vincenzo di Marzo. 2010. "Phytocannabinoids beyond the Cannabis Plant - Do They Exist?" *British Journal of Pharmacology* 160(3):523–29.
- Maccarrone, Mauro, Itai Bab, Tamás Bíró, Guy A. Cabral, Sudhansu K. Dey, Vincenzo di Marzo, Justin C. Konje, George Kunos, Raphael Mechoulam, Pal Pacher, Keith A. Sharkey, and Andreas



- Zimmer. 2015. “Endocannabinoid Signaling at the Periphery: 50 Years after THC.” *Trends in Pharmacological Sciences* 36(5):277–96.
- McKernan, Kevin, Jessica Spangler, Lei Zhang, Vasisht Tadigotla, Yvonne Helbert, Theodore Foss, and Douglas Smith. 2016. “Cannabis Microbiome Sequencing Reveals Several Mycotoxic Fungi Native to Dispensary Grade Cannabis Flowers.” *F1000Research* 4. doi: 10.12688/f1000research.7507.2.
- Munro, Sean, Kerrie L. Thomas, and Muna Abu-Shaar. 1993. “Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids.” *Nature* 365:61–65.
- Rodriguez, Paula, David Gonzalez, and Sonia Rodríguez Giordano. 2016. “Endophytic Microorganisms: A Source of Potentially Useful Biocatalysts.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133:S569–81.
- Scott, Maryanne, Mamta Rani, Jamil Samsatly, Jean Benoit Charron, and Suha Jabaji. 2018. “Endophytes of Industrial Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Cultivars: Identification of Culturable Bacteria and Fungi in Leaves, Petioles, and Seeds.” *Canadian Journal of Microbiology* 64(10):664–80. doi: 10.1139/cjm-2018-0108.
- Shani A, and Raphael Mechoulam. 1974. *Cannabielsoic Acids Isolation and Synthesis by a Novel Oxidative Cyclization.*
- Stierle, Andrea, Gary Strobel, Paul Grothaus, and Gary Bignami. 1995. *THE SEARCH FOR A TAXOL-PRODUCING MICROORGANISM AMONG THE ENDOPHYTIC FUNGI OF THE PACIFIC YEW, TAXUS BREVIFOLIA*. Vol. 58.
- Strobel, Gary, Bryn Daisy, Uvidelio Castillo, and James Harper. 2004. “Natural Products from Endophytic Microorganisms.” *Journal of Natural Products* 67(2):257–68.
- Taghinasab, Meysam, and Suha Jabaji. 2020. “Cannabis Microbiome and the Role of Endophytes in Modulating the Production of Secondary Metabolites: An Overview.” *Microorganisms* 8(3).
- Tundo, Pietro, Paul Anastas, David StC. Black, Joseph Breen, Terrence Collins, Sofia Memoli, Junshi Miyamoto, Martyn Polyakoff, and William Tumas. 2000. “Synthetic Pathways and Processes in Green Chemistry. Introductory Overview.” *Pure Appl. Chem.* 72(7):1207–28.
- Veress, T., and L. Leisztner. 1990. *Determination of Cannabinoid Acids by High-Performance Liquid Chromatography of Their Neutral Derivatives Formed*



Thermal Decarboxylation I. Study of the Decarboxylation. Vol. 520.

Yue, Quin, Charles W. Bacon, and Michael D. Richardson. 1998. “Biotransformation of 2-Benzoxazolinone and 6-Methoxy-Benzoxazolinone by *Fusarium Moniliforme*.” *Pytochemistry* 48(3):451–54.

Zikmundová, M., K. Drandarov, L. Bigler, M. Hesse, and C. Werner. 2002. “Biotransformation of 2-Benzoxazolinone and 2-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-One by Endophytic Fungi Isolated from *Aphelandra Tetragona*.” *Applied and Environmental Microbiology* 68(10):4863–70. doi: 10.1128/AEM.68.10.4863-4870.2002

- **Financiamiento**

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto “Biotransformación de cannabinoides mediante microorganismos constituyentes del microbioma de *Cannabis sativa*” financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (CSIC-UdelaR).

Parte de los insumos fueron adquiridos a través del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Este proyecto se viene llevando a cabo bajo la licencia otorgada para tal fin por el Instituto de Regulación y Control del Cannabis (IRCCA)

- **Agradecimientos**

Al Lic. Búrix Mechoso por la donación del material vegetal.

A los y las compañeras del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones y del Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, UDELAR. Por amenizar los espacios de trabajo y por la disponibilidad para dar una mano cuando es preciso.

Casca da jabuticaba liofilizada reduz os sinais clínicos e a incidência de tumores em camundongos com câncer colorretal



CASCA DA JABUTICABA LIOFILIZADA REDUZ OS SINAIS CLÍNICOS E A INCIDÊNCIA DE TUMORES EM CAMUNDONGOS COM CÂNCER COLORRETAL

Autora: Rizzato, Julia Soto; jsotorizzato@gmail.com

Co-autor: Do Nascimento, Roberto de Paula, roberto_beto1@hotmail.com

Profesor: Júnior, Mario Roberto Marostica; mmarosti@unicamp.br

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Resumo

O câncer colorretal (CCR) vem mostrando cada vez mais a sua importância com o passar dos anos, ocupando atualmente o terceiro lugar em incidência e o segundo em mortalidade dentre todos os tipos de cânceres no mundo. Este crescimento está fortemente atrelado aos hábitos de vida dos países bem desenvolvidos. Entretanto, em países em desenvolvimento como o Brasil também é possível observar um número crescente nos casos de CCR, evidenciando a necessidade de pesquisas de caráter preventivo, para que seja possível o planejamento de políticas públicas para o seu controle. Por outro lado, uma dieta repleta de frutas ricas em fibras e compostos fenólicos pode reduzir significativamente as chances de desenvolvimento de CCR. A partir dessas informações, este projeto visa avaliar a ação da jabuticaba, fruto nativo brasileiro rico nos compostos citados acima, na atividade clínica, incidência e tamanho de tumores, bem como na concentração de

proteínas associadas em um modelo robusto de CCR associado à inflamação. Para isso, foram realizados dois experimentos animais. No primeiro deles, os camundongos receberam o pó liofilizado da casca da jabuticaba através de dieta AIN93M na concentração de 5% e passaram pelo processo de indução de CCR através da inflamação aguda. Para isso, após 14 dias do início do experimento, a indução de CCR foi realizada através de uma injeção intraperitoneal de azoximetano a 10mg/kg e sete dias depois, as garrafas de água dos animais foram preparadas de forma a conter uma solução de dextran sulfato de sódio a 2% na água por um período de uma semana. A partir do início do processo de indução de CCR, iniciou-se a avaliação do Índice de Atividade da Doença (IAD). No dia 100, os animais foram eutanasiados e as amostras do cólon foram retiradas para as análises necessárias. Já no segundo experimento, os animais receberam a dieta nas concentrações de 2,5% e 5% do pó

liofilizado da casca de jabuticaba e passaram pelo processo de indução de CCR através da inflamação crônica. Para isso, foram realizados dois ciclos com DSS a 2% na água de beber, com um intervalo de sete dias entre cada um deles. Todo o restante do experimento foi igual ao primeiro.

A análise do pó liofilizado da casca de jabuticaba evidenciou a sua alta concentração de polifenóis totais (80-90 mg/g), antocianinas (5-7 mg/g) e sua alta capacidade antioxidante (800 umol Trolox equivalente/g, matéria seca). Além disso, as dietas acrescidas da casca de jabuticaba, possuíam consideravelmente

mais polifenóis ($p < 0,05$) (0,7-1,5 mg/g) e maior capacidade antioxidante (10-20 umol/g, matéria úmida) quando comparadas à dieta controle.

Em ambos os experimentos a adição do pó liofilizado da casca de jabuticaba a 5% na dieta dos animais foi capaz de inibir sintomas de inflamação colônica, como perda de peso, sangramento e diarreia, mortalidade e piora do IAD. Além disso, a dieta foi capaz de inibir a formação dos adenomas, bem como a sua progressão para carcinomas.

A **Figura 1** representa o resumo gráfico do trabalho.

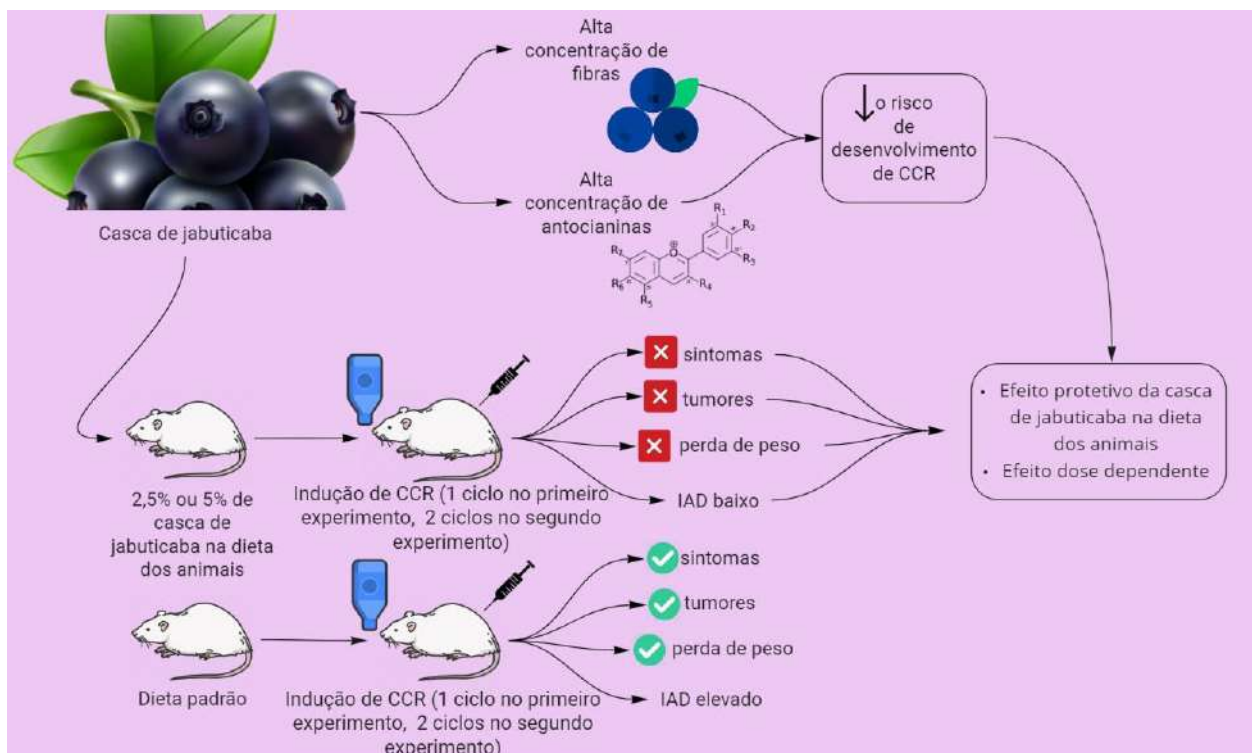


Figura 1: Figura mecânica dos experimentos 1 e 2.



Introdução

O câncer colorretal (CCR) é uma doença que vem se mostrando cada vez mais importante com o passar dos anos. Desde a metade do século passado, o CCR vem apresentando um aumento expressivo na incidência e mortalidade (Kuipers et al., 2015). Historicamente, o CCR apresenta índices maiores nos países desenvolvidos e existe uma forte correlação entre os hábitos de vida e o desenvolvimento desta doença (Bernard & Christopher, 2014). O aumento da massa corpórea, o consumo de carnes vermelhas e processadas, bem como o consumo de álcool e o tabagismo são fatores que aumentam consideravelmente o risco de desenvolvimento de CCR (Guraya, 2015; Mingyang Song, Wendy S. Garrett, 2015). Da mesma forma, devido aos hábitos de vida mais ocidentalizados, os países em desenvolvimento, como o Brasil, vêm apresentando um crescimento alarmante nos índices de CCR na última década (Sierra & Forman, 2016). Esses números evidenciam a necessidade de estudos que visem o maior controle da doença através de sua prevenção e a aplicação de melhores políticas públicas de saúde. Neste sentido, uma dieta rica em frutas com altas concentrações de fibras e compostos fenólicos pode ser uma aliada importante na prevenção do CCR, uma

vez que seu consumo vem sendo fortemente associado à diminuição do risco de desenvolvimento deste tipo de câncer (Chang, Lei, Zhou, Ye, & Zhao, 2018; Choi et al., 2017; Kinzler & Vogelstein, 1996; Kunzmann et al., 2015; Li, Zhang, & Chen, 2018; Wang et al., 2019).

A jabuticaba (família Myrtaceae, gênero Myrciaria) é um fruto nativo brasileiro que possui em abundância em sua casca compostos bioativos como as antocianinas e fibras dietéticas (Inada et al., 2015; Leite-Legatti et al., 2012; Wu, Long, & Kennelly, 2013). Tais substâncias possuem capacidade anti-inflamatória, antioxidante e anticâncer, sendo a jabuticaba uma potencial aliada na prevenção do CCR.

A associação de azoximetano (AOM) e dextran sulfato de sódio (DSS) é um método de notável importância e com alto custo-benefício em estudos pré-clínicos que visam avaliar os efeitos de compostos quimiopreventivos, como a casca da jabuticaba, no desenvolvimento de CCR associado à inflamação INSERIR CITAÇÃO.

Objetivos

Objetivo geral: avaliar o potencial preventivo da casca de jabuticaba em



modelo experimental de CCR induzido em camundongos.

Objetivos específicos: A. caracterização química e nutricional do pó liofilizado da jaboticaba. B. determinação dos efeitos da casca de jaboticaba em modelo experimental de CCR na(o): 1. Índice de Atividade da Doença; 2. Medidas teciduais do cólon; 3. Incidência, multiplicidade, tamanho e profundidade de adenomas e carcinomas no cólon.

Materiais e métodos

Inicialmente, os frutos da árvore *Myrciaria jaboticaba* (Verg.) Bell foram coletados, higienizados e a casca foi separada do restante do fruto. A casca da jaboticaba foi liofilizada, sendo mantida sob refrigeração (-20°C). Visando a realização de posteriores análises para a caracterização da composição e atividade antioxidante da casca da jaboticaba, uma amostra foi separada. A casca da jaboticaba foi analisada quanto ao conteúdo de umidade e cinzas (IAL, 2008), lipídeos (Bligh & Dyer, 1959), proteínas pelo método de Kjeldahl, compostos fenólicos totais (Roesler, Malta, Carrasco, & Pastore, 2006), antocianinas monoméricas (Lees, D.H.; Francis, 1972), flavonóides totais (Batista et al., 2016), Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) (Pellegrini et

al., 2003) e Capacidade de Absorbância do Oxigênio Radicalar (ORAC) (Ou, Chang, Huang, & Prior, 2013). A dieta dos animais, acrescida ou não da casca de jaboticaba, também foi analisada pelos métodos descritos, exceto flavonoides e antocianinas monoméricas por geralmente não apresentarem leitura dentro da curva padrão.

O experimento animal foi inicialmente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (protocolo nº 5246-1/2019).

Este estudo contou com dois experimentos animais. O primeiro deles contou com 18 animais em um modelo de inflamação aguda que gera CCR, objetivando avaliar a eficácia de 5% do pó liofilizado da casca da jaboticaba nos animais. Os camundongos foram divididos nos grupos: *controle* (C – dieta padrão), *controle câncer* (CC – dieta padrão com indução de câncer) e *jaboticaba câncer* (J – dieta acrescida de 5% do pó liofilizado da casca da jaboticaba e indução de câncer). Após o período preventivo de 2 semanas, os animais do grupo câncer passaram pelo processo de indução de CCR, sendo iniciado por uma injeção intraperitoneal de azoximetano (AOM) 10mg/kg. Após uma semana, a água de beber dos animais foi substituída por uma solução contendo 2% de dextran sulfato



de sódio (DSS) durante 7 dias. Após esse período, a água dos animais voltou a ser água filtrada comum.

Já o segundo experimento visou avaliar a atividade de 2,5% e 5% do pó liofilizado da casca da jabuticaba em um modelo de inflamação colônica crônica (ou colite crônica) que gera CCR. Para isso, foram utilizados 63 camundongos BALB/c machos de 8 semanas de idade, divididos nos seguintes grupos: controle (CONT - dieta padrão), controle câncer (CONT_{CCR} - dieta padrão e indução de câncer), jabuticaba₂₅ (JAB₂₅ - dieta adicionada de 2,5% da jabuticaba), jabuticaba_{25CCR} (JAB_{25CCR} - dieta adicionada de 2,5% da jabuticaba e indução de câncer), jabuticaba₅₀ (JAB₅₀ - dieta adicionada de 5% da jabuticaba) e jabuticaba_{50CCR} (JAB_{50CCR} - dieta adicionada de 5% da jabuticaba e indução de câncer). Passadas as quatro semanas iniciais do período preventivo apenas recebendo a dieta acrescida ou não da casca da jabuticaba, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de azoximetano (AOM) (10mg/kg) e, 7 dias depois, uma solução de dextran sulfato de sódio (DSS) a 2% substituiu a água de beber durante o período de 7 dias. Após este período, os animais receberam água comum por 7 dias, seguido por mais um ciclo de 7 dias com DSS a 2%. Passado este período, os

animais voltaram a receber água comum até o final do experimento.

O momento escolhido para o início do tratamento considera o período de formação de carcinomas. O protocolo de indução de CCR por AOM/DSS se baseia em um modelo de inflamação que evolui para tumorigênese (Tanaka et al., 2003), de Rosenberg, Giardina e Tanaka (2009).

Durante todo o experimento, os animais não deixaram de receber as dietas de seus respectivos grupos experimentais. Utilizando o critério de avaliação de Gommeux et al.(2007), o Índice de Atividade da Doença (IAD) foi avaliado durante o experimento. Este índice considera a perda de massa corpórea; a consistência das fezes; bem como o sangramento anal e nas fezes, uma vez que estas alterações estão frequentemente associadas ao desenvolvimento de colite e CCR (Sánchez-Fidalgo et al., 2010). Na **Tabela 1** estão descritos os critérios do escore.

A mortalidade dos animais também foi avaliada. Os animais foram eutanasiados na semana 16 com uma solução de quetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Na eutanásia, as medidas teciduais do cólon (comprimento, peso/comprimento) foram analisadas e a quantidade de tumores vistos foi contada.



Aproximadamente 2 cm de amostras da região distal do cólon foram coletados, abertos e conservados em formaldeído 4%. Posteriormente, essas amostras foram submetidas a processamento histológico e coradas com hematoxilina-eosina.

Para o estudo das lâminas, um especialista em histopatologia do CCR realizou a análise de forma cega, considerando a incidência, multiplicidade, tamanho e profundidade dos adenomas e carcinomas (De Simone et al., 2015).

A classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde foi considerada para diferenciar entre adenoma e carcinoma. Nela estabeleceu-se que adenomas são caracterizados pela presença de células de Paneth difusas, células neuroendócrinas ou pequenos focos de células escamosas em diferenciação. Já os tumores malignos são apenas aqueles que penetram a muscularis mucosae, chegando até a camada submucosa (WHO, 2000).

Os resultados estão expressos em média aritmética \pm erro padrão. One-way ou Two-Way ANOVA seguido de Tukey foram utilizados para as análises, considerando um $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos a partir das análises de composição e atividade antioxidante do pó liofilizado da casca da jabuticaba em ambos os experimentos confirmam a sua abundância em compostos fenólicos totais (80-90 mg/g), antocianinas (5-7 mg/g) e alta capacidade antioxidante (800 μ mol Trolox equivalente/g, matéria seca). Além disso, as análises evidenciam que os compostos fenólicos, as antocianinas e a maior capacidade antioxidante da dieta são conferidas pelo pó liofilizado da casca da jabuticaba, uma vez que estes foram proporcionais à concentração do pó liofilizado da casca da jabuticaba na dieta, apresentando valores de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante maiores que as dietas controle ($p < 0,05$). Em um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo, também foi realizada a caracterização química e antioxidante da casca de jabuticaba. Neste estudo, a concentração de flavonoides totais no pó liofilizado da jabuticaba foi de 9.51 ± 0.04 (mg QE/g), enquanto a concentração das antocianinas monoméricas foi de 1.52 ± 0.15 (mg C3G/g) (Nascimento et al., 2021), resultados os quais também se aproximam daqueles obtidos nos experimentos 1 e 2.

A pouca diferença nos resultados podem ser provenientes pela época de

colheita da jabuticaba utilizada em cada experimento. Enquanto as jabuticabas do experimento 1 foram colhidas em maio de 2019, as do segundo experimento foram colhidas entre agosto e outubro do mesmo ano. Os resultados das análises de composição e atividade antioxidante estão contidos nas **Tabelas 2 e 3**.

Durante o experimento 1, a ingestão da dieta dos animais entre os grupos não diferiu durante a maior parte do estudo. Por outro lado, o grupo J apresentou maior ingestão de água durante o período em que esta continha a solução de DSS ($p < 0,05$).

Ao mesmo tempo, os animais deste grupo não apresentaram sintomas de inflamação colônica ($p < 0,05$), como perda de peso (**Figura 2**), sangramento e diarreia (**Figura 3**), mortalidade (**Figura 4**) e piora do IAD (**Figura 5**).

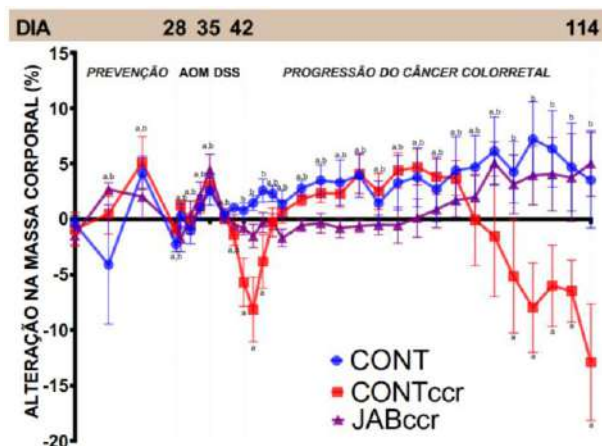


Figura 2: alteração da massa corporal do experimento 1.

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

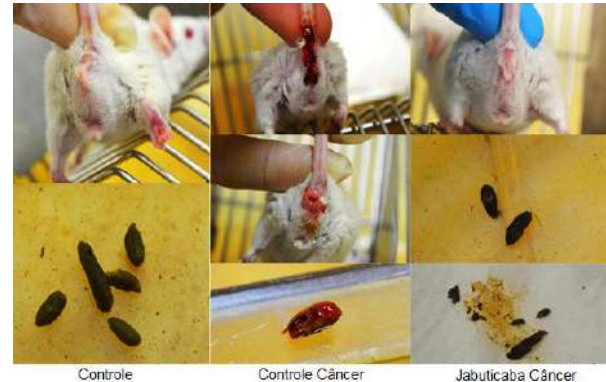


Figura 3: Sangramento e consistência das fezes do experimento 1. Divulgação não permitida.

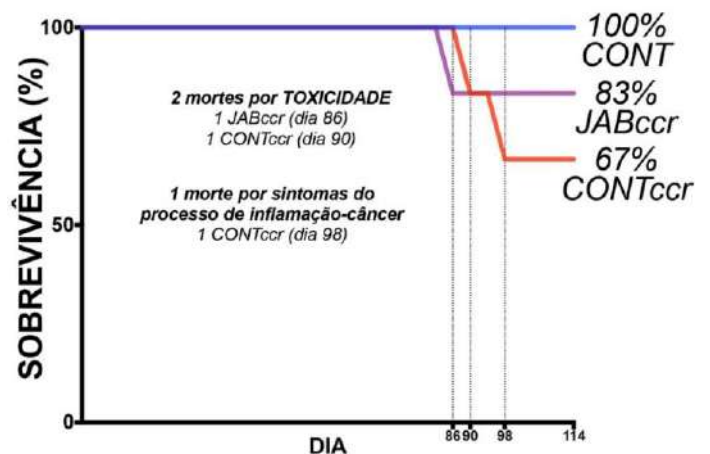


Figura 4: Sobrevivência dos animais ao longo do experimento do experimento 1.

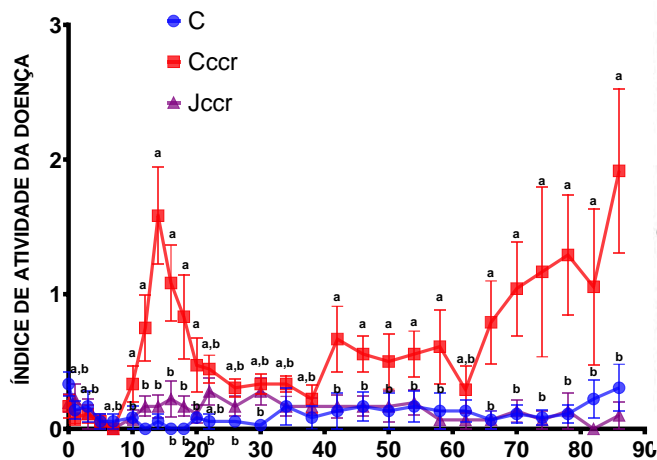


Figura 5: Índice de Atividade da Doença do experimento 1.

Também não foi possível observar nenhuma lesão macroscópica de CCR no grupo *J*, assim como no grupo *C*, como esperado (**Figura 6**). Ao mesmo tempo, os animais do grupo *CC* desenvolveram pontos de tumor com incidência significativamente maior ($p < 0,05$) (**Figura 7**).

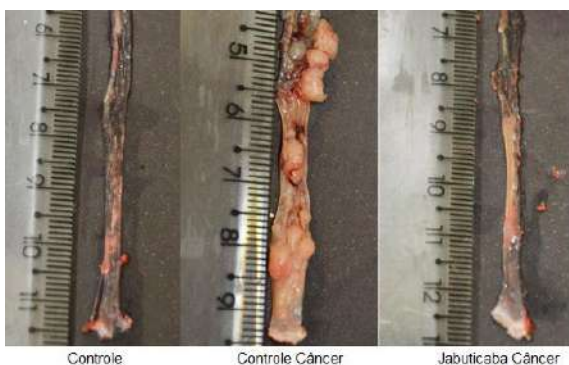


Figura 6: Aspecto e comprimento do cólon no dia da eutanásia do experimento 1. Divulgação não permitida.

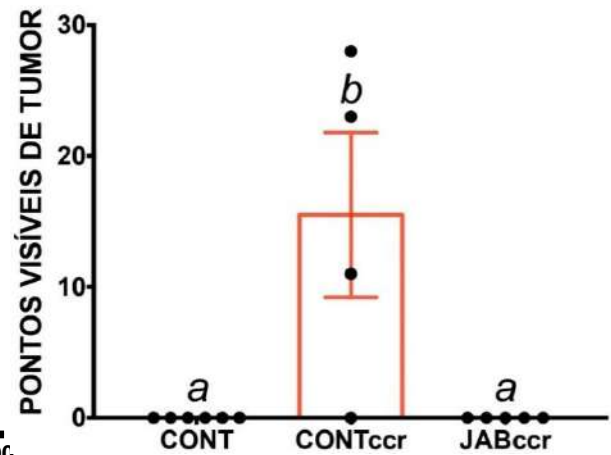


Figura 7: Pontos visíveis de tumor do experimento 1.

Ao realizar a relação massa/comprimento do cólon, utilizada como indicador de processo inflamatório (Sánchez-Fidalgo et al., 2010), o grupo *CC* apresentou um resultado significativamente maior ($p < 0,05$). Por outro lado, os grupos *C* e *J* apresentaram resultados estatisticamente iguais (**Figura 8**), sendo esta mais uma evidência da eficácia da casca da jabuticaba na prevenção do CCR.

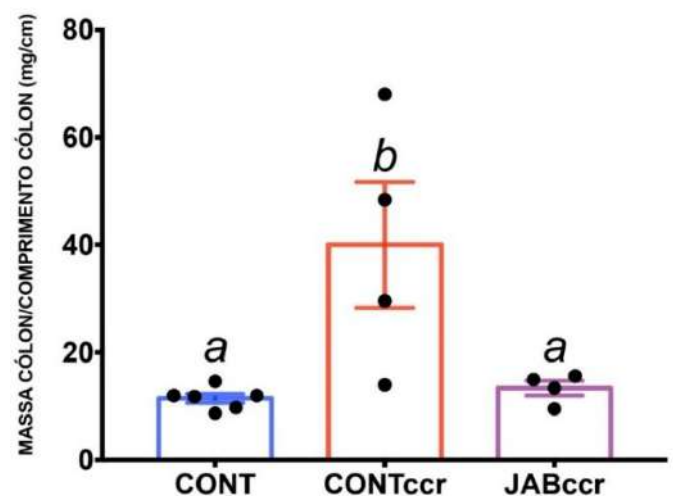


Figura 8: Relação massa/comprimento do cólon (mg/cm) do experimento 1.

A análise histológica também corrobora com os resultados até aqui apresentados. Os animais que receberam a dieta acrescida de 5% da casca da jabuticaba não apresentaram quaisquer alterações (formação de adenomas ou carcinomas) (**Tabela 4**). Como resultado, ao analisar o escore histopatológico, parâmetros como infiltrado inflamatório, dano de cripta, depleção de células caliciformes e edema também foram reduzidos ($p < 0.05$).

Os resultados do experimento 2 de inflamação crônica que leva à formação de CCR também foram promissores. Mais uma vez, a ingestão da dieta entre os grupos não diferiu durante o experimento. Entretanto, os animais que continham 5% da casca da jabuticaba em sua dieta tiveram uma inibição visível dos sintomas clínicos típicos da doença ($p < 0,05$) (**Figuras 9 e 10**). A dieta a 2,5%, por outro lado, não foi tão eficaz quanto a de 5%, apresentando resultados mais similares ao do grupo $CONT_{CCR}$.



Figura 9: Sangramento e consistência das fezes do experimento 2. Divulgação não permitida.

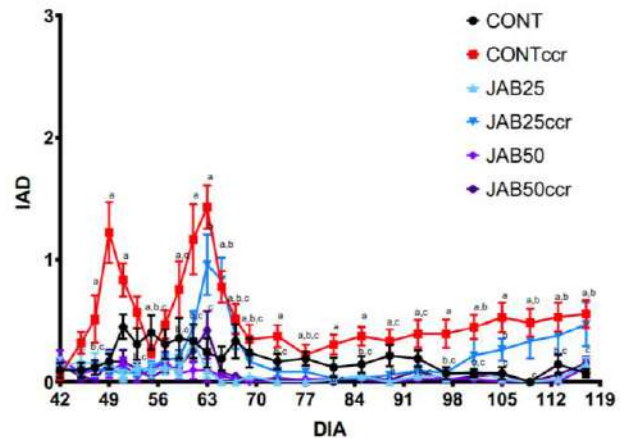


Figura 10: Índice de Atividade da Doença do experimento 2.

Com relação ao número de tumores visíveis, foi possível notar uma redução considerável com o aumento da concentração da casca da jabuticaba na dieta dos animais. Em média, os grupos $CONT_{CCR}$, JAB_{25CCR} e JAB_{50CCR}

apresentaram 11, 12,7 e 4,2 tumores por animal, respectivamente (**Figura 11**). Estatisticamente, os grupos JAB_{50CCR} e JAB_{25CCR} não apresentaram diferença em relação ao grupo $CONT_{CCR}$. Entretanto, o grupo JAB_{50CCR} também não apresentou diferença estatística em relação aos grupos sem câncer, aproximando-se mais de uma condição sem alteração. Ademais, o aspecto do cólon dos animais do grupo JAB_{50CCR} também se mostrou visivelmente melhor do que os outros grupos (**Figura 12**).

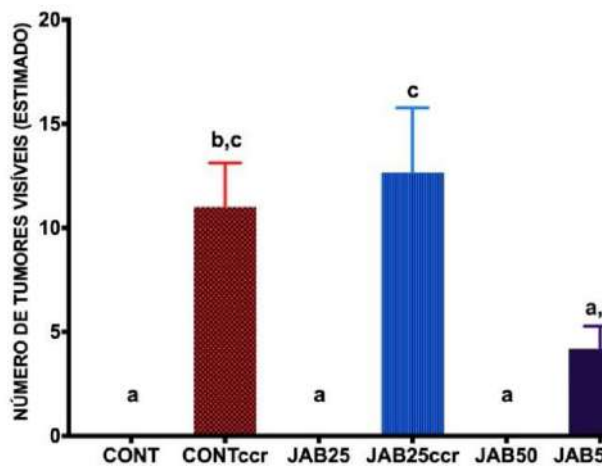


Figura 11: Número de tumores visíveis do experimento 2.

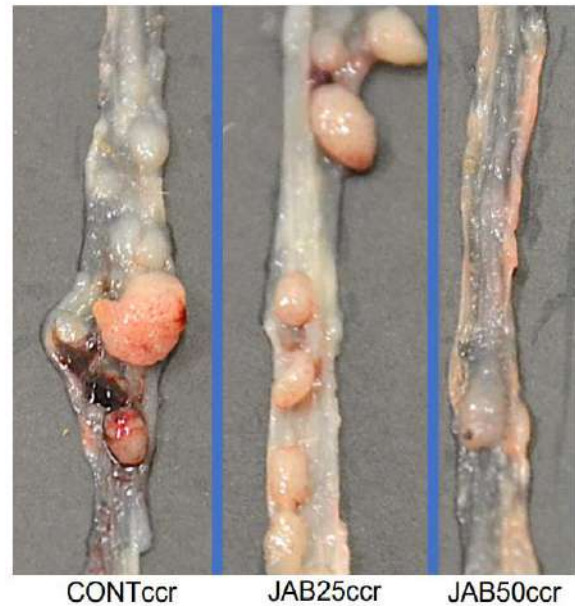


Figura 12: Aspecto do cólon dos animais do experimento 2.

Ao analisar a relação massa/comprimento do cólon, foi possível observar uma tendência inversamente proporcional à dosagem de jabuticaba na dieta dos animais com CCR (**Figura 13**). Ou seja, quanto maior a concentração de jabuticaba, menor esta relação. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

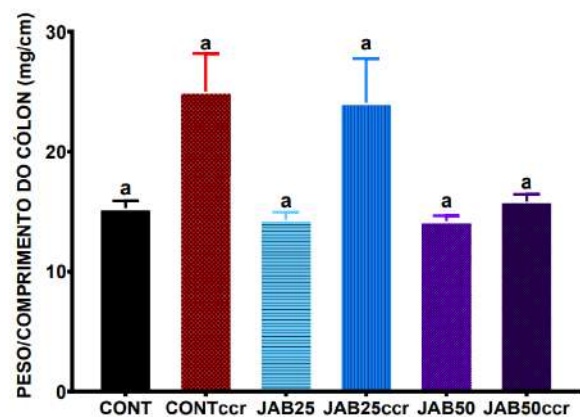


Figura 13: Relação massa/ comprimento do cólon do experimento 2.

A análise histológica revelou a eficácia do modelo experimental utilizado na formação de adenomas e carcinomas no grupo controle, com 16,66% e 66,66% dos animais com as condições acima citadas, respectivamente. Por outro lado, o pó liofilizado da casca de jabuticaba da dieta dos animais foi capaz de suprimir a formação de adenomas e a progressão para carcinomas em ambos os grupos. No grupo acrescido de 2,5% de casca de jabuticaba na dieta, 45,45% dos animais não apresentaram quaisquer alterações e no grupo de 5% esse número foi ainda maior, chegando a 75%. Com relação a formação de adenomas, o grupo *JAB_{25CCR}* apresentou uma diminuição expressiva, na qual nenhum dos animais apresentou esta condição. Por outro lado, 54,54% dos animais desenvolveram carcinomas. Este, portanto, seria um indício de que a adição de 2,5% de casca de jabuticaba na dieta dos animais foi capaz de suprimir a formação de adenomas, mas uma vez instaurados, o fruto não foi capaz de inibir a sua evolução para carcinoma. O grupo *JAB_{50CCR}*, por sua vez, apresentou 12,5% dos animais com adenomas e 12,5% dos animais com carcinomas. Este resultado evidencia a capacidade da casca de

jabuticaba a 5% na dieta dos animais em inibir tanto o início quanto a progressão do CCR, corroborando com o resultado encontrado na avaliação do IAD. Os resultados da histologia estão enunciados na **Tabela 5**.

Conclusão

Com base nos resultados deste estudo, evidencia-se um efeito protetivo da casca da jabuticaba a 5% no modelo de indução à inflamação aguda e crônica que leva ao CCR. Além disso, este efeito parece ser dose dependente, uma vez que a adição de 5% do pó liofilizado da casca de jabuticaba na dieta dos animais apresentou melhores resultados do que a adição de 2,5%.

Bibliografia

Batista, Â. G., Ferrari, A. S., Da Cunha, D. C., Da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Correa, L. C., ... Maróstica Júnior, M. R. (2016). Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry*, 197, 1153–1159. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.093>

Bernard, W. S., & Christopher, P. W. (2014). *World cancer report 2020*. World Health Organization. Retrieved from <http://publications.iarc.fr/Non-Series->



Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. Retrieved from <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Chang, H., Lei, L., Zhou, Y., Ye, F., & Zhao, G. (2018). Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer: An updated meta-analysis of epidemiological studies. *Nutrients*, 10(7). Retrieved from <https://doi.org/10.3390/nu10070950>

Choi, Y. J., Choi, Y. J., Kim, N., Nam, R. H., Lee, S., Lee, H. S., ... Lee, D. H. (2017). Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Gut and Liver*, 11(2), 243–252. Retrieved from <https://doi.org/10.5009/gnl16068>

De Simone, V., Franzè, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M. C., Di Fusco, D., ... Stolfi, C. (2015). Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 34(27), 3493–3503. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/onc.2014.286>

Gommeaux, J., Cano, C., Garcia, S., Gironella, M., Pietri, S., Culcasi, M., ... Carrier, A. (2007). Colitis and Colitis-Associated Cancer Are Exacerbated in

Mice Deficient for Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2215–2228. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/MCB.01454-06>

Guraya, S. Y. (2015). Association of type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 21(19), 6026–6031. Retrieved from <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i19.6026>

IAL, I. A. L. (2008). 1ª Edição Digital. *Métodos Físicos-Químicos Para Análise de Alimentos*, 9, 453–460.

Inada, K. O. P., Oliveira, A. A., Revorêdo, T. B., Martins, A. B. N., Lacerda, E. C. Q., Freire, A. S., ... Monteiro, M. C. (2015). Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, 17, 422–433. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*, 87(2), 159–170. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1)

Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., ... Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*,



- 1, 1–25. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kunzmann, A. T., Coleman, H. G., Huang, W. Y., Kitahara, C. M., Cantwell, M. M., & Berndt, S. I. (2015). Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 102(4), 881–890. Retrieved from <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.113282>
- Lees, D.H.; Francis, F. J. (1972). Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. *HortScience*, 7, 83–84.
- Leite-Legatti, A. V., Batista, A. G., Dragano, N. R. V., Marques, A. C., Malta, L. G., Riccio, M. F., ... Maróstica, M. R. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, 49(1), 596–603. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.044>
- Li, Y., Zhang, T., & Chen, G. Y. (2018). Flavonoids and colorectal cancer prevention. *Antioxidants*, 7(12), 1–27. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/antiox7120187>
- Mingyang Song, Wendy S. Garrett, A. T. C. (2015). Nutrients and Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 148(6), 1244–1260. Retrieved from <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.12.035>
- Nascimento, R. de P. do, Polezi, G., Rizzato, J. S., Batista, P. B., Santos, N. M. dos, Loubet Filho, P. S., ... Maróstica Junior, M. R. (2021). Brazilian berries prevent colitis induced in obese mice by reducing the clinical signs and intestinal damage. *Food Bioscience*, 44(November). Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101447>
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1372–1376. Retrieved from <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel.



Industrial Crops and Products. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.059>

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., & Pastore, G. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*, 71(2), 102–107. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08882.x>

Rosenberg, D. W., Giardina, C., & Tanaka, T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30(2), 183–196. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn267>

Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., Cárdeno, A., Talero, E., Sánchez-Hidalgo, M., Motilva, V., & Alarcón de la Lastra, C. (2010). Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clinical Nutrition*, 29(5), 663–673. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.03.003>

Sierra, M. S., & Forman, D. (2016). Burden of colorectal cancer in Central and South America. *Cancer Epidemiology*, 44, S74–S81. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.03.010>

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003).

A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, 94(11), 965–973. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>

Wang, X., Yang, D.-Y., Yang, L.-Q., Zhao, W.-Z., Cai, L.-Y., & Shi, H.-P. (2019). Anthocyanin Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(5), 470–477. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1531084>

WHO. (2000). *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. (L.A. Hamilton, S.R.; Aaltonen, Ed.) (3rd ed.).

Wu, S. B., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54(1), 148–159. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.021>

Financiamento e agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil

(CAPES) – Código de financiamento 001; CNPq (403976/2021-9; 301496/2019-6) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº de protocolo 2015/50333-1; 2018/11069-5; 2015/13320-9, 2019/13465-8)”. MRMJ reconhece Red Iberoamericana de Alimentos Autoctonos Subutilizados (ALSUB-CYTED, 118RT0543).

Agradeço por toda a ajuda e ensinamentos passados pelo Ms. Roberto de Paula e pelo Prof. Dr. Mario Roberto, assim como pelo apoio de todos e todas do Laboratório de Nutrição e Metabolismo durante a realização do projeto.

Informações suplementares - Tabelas

Tabela 1: Critérios do escore para o Índice de Atividade da Doença.

Critério			
Escore	Percentual de perda de peso	Consistência das fezes	Sangramento retal
0	<1%	Fezes normais, com péletes formados.	Nenhum.
1	1 a 4,99%	Fezes moles não aderindo ao ânus.	Pequenas manchas de sangue nas fezes, região anal seca.
2	5 a 10%	Fezes muito moles aderindo ao ânus.	Grandes manchas de sangue nas fezes; região anal úmida.
3	>10%	Diarreia aquosa e ânus úmido	Fezes vermelhas escuras e sangue em todo o orifício anal.

Tabela 2 – Composição química e nutricional, e potencial antioxidante da casca da jabuticaba e dieta dos animais (experimento 1)

Análise	Pó liofilizado da casca da jabuticaba (matéria seca)	Dieta controle (matéria úmida)	Dieta 5% da jabuticaba (matéria úmida)
UMIDADE (%)	11,61 ± 0,77 (casca não liofilizada: 72,40 ± 0,30)	10,81 ± 0,13	7,99 ± 0,30
LIPÍDIOS (%)	1,55 ± 0,08	3,97 ± 0,47	3,58 ± 0,25
PROTEÍNAS (%)	6,47 ± 0,51	11,50 ± 0,65	11,28 ± 0,56
CINZAS (%)	2,18 ± 0,13	2,35 ± 0,07	2,42 ± 0,03
CARBOIDRATOS TOTAIS (%)*	89,80 ± 0,24	82,18 ± 0,40	82,72 ± 0,28
FLAV (mg Q/g)**	6,92 ± 0,17	ND	ND
AM (mg C3G/g)**	5,64 ± 0,12	ND	ND
FRAP (µmol TE/g)**	915,90 ± 20,19	0,50 ± 0,03	11,19 ± 0,60
FOLIN (mg AG/g)**	87,34 ± 6,64	0,46 ± 0,06	1,44 ± 0,04
ORAC (µmol TE/g)**	821,8 ± 38,61	6,73 ± 0,43	13,41 ± 0,44

Tabela 3 – Composição química e nutricional, e potencial antioxidante da casca da jabuticaba e dieta dos animais (experimento 2).

ANÁLISE	Pó liofilizado da casca de jabuticaba (matéria seca)	Dieta controle	Dieta acrescida de 2,5% de jabuticaba	Dieta acrescida de 5% de jabuticaba
UMIDADE (%)	17,149 ± 0,498	8,970 ± 0,407	9,056 ± 0,067	9,168 ± 0,170
LIPÍDEOS (%)	1,333 ± 0,0003	4,398 ± 0,109	4,398 ± 0,287	3,687 ± 0,125
PROTEÍNAS (%)	4,509 ± 0,481	11,107 ± 1,507	10,354 ± 1,120	10,698 ± 0,388
CINZAS (%)	1,908 ± 0,156	3,212 ± 0,489	2,865 ± 0,182	1,814 ± 0,124
CARBOIDRATOS TOTAIS (%)*	76,989 ± 0,245	75,493 ± 0,507	76,163 ± 0,369	76,422 ± 0,172
FLAV (mg/Q/g)**	12,621 ± 0,190	ND	ND	ND
AM (mg C3/g)**	7,148 ± 0,282	ND	ND	ND
FRAP (µmol TE/g)**	1130,588 ± 34,123	2,419 ± 0,083	5,080 ± 0,373	8,894 ± 0,295
FOLIN (mg AG/g)**	84,367 ± 1,318	0,386 ± 0,019	0,627 ± 0,054	0,928 ± 0,039
ORAC (µmol TE/g)**	806,175 ± 41,095	5,970 ± 0,181	9,637 ± 0,862	20,699 ± 0,419

Abreviaturas: FOLIN: método Folin-Ciocalteu para determinação de compostos fenólicos totais; AG: ácido gálico; FLAV: flavonóides; Q: quercetina; AM: antocianinas totais; C3G: cianidina 3-glucosídeo; ND: não detectável com base no menor ponto da curva padrão. *Calculado a partir da soma dos outros componentes (umidade, lipídios, proteínas, cinzas). **Análise realizada a partir de extrato 46% etanol HCl pH 1 (Rodrigues, Fernandes, de Brito, Sousa, & Narain, 2015).

Tabela 4: Incidência de tumores do experimento 1.

Conclusão (%)	Grupo experimental	
	Controle câncer	Jabuticaba câncer
Sem alteração	25	100
Adenoma	0	0
Carcinoma	75	0

Tabela 5: Resultados da análise histológica do experimento 2.

Conclusão (%)	Grupo experimental		
	CONT CCR	JAB 25CCR	JAB 50CCR
Sem alteração	16,66	45,45	75
Adenoma	16,66	0	12,5
Carcinoma	66,66	54,54	12,5

Composición de residuos de granos de quinua para la recuperación de metabolitos
y aplicación como biopesticida



C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Composición de residuos de granos de quinua para la recuperación de metabolitos y aplicación como biopesticida

Autor: Tomei, Carlos E.¹

carlosenriquetomei3@gmail.com

Profesores guías: Oviedo, Andrea¹;

Lizárraga, Emilio^{1,2}

¹Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. ²Fundación Miguel Lillo.

elizarraga@csnat.unt.edu.ar

Resumen

Para la comercialización de la quinua se realiza una remoción mecánica de saponinas del grano, el residuo obtenido se denomina “mojuelo” no reviste valor comercial alguno y poco se conoce acerca de su complejidad. El objetivo del presente trabajo fue establecer la composición del mojuelo, evaluar la citotoxicidad y el efecto sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* de sus extractos.

El mojuelo procesado fue de la variedad Regalona Baer y se maceró con etanol 80 y 50% (EHA). Otra porción de mojuelo fue extraída secuencialmente con solventes de polaridad creciente en un equipo Soxhlet. El análisis preliminar fue con una marcha analítica cualitativa de reacciones al tubo, en base a estos resultados se cuantificaron

compuestos fenólicos, saponinas, azúcares y proteínas. La citotoxicidad se determinó mediante hemólisis de eritrocitos humanos y con el *brine shrimp test*. Para la actividad insecticida, se emplearon larvas de *S. frugiperda* 2er instar (L2) (n=150), con tres dosis del EHA aplicadas en hojas de “sorgo de Alepo”. Se analizaron los datos con un ANOVA de una vía. Los tratamientos aplicados se separaron del control $F(3,8) = 62,881$; $p < 0,01$.

El EHA no posee actividad hemolítica ni citotóxica, se caracterizó por su contenido de saponinas, proteínas, azúcares y compuestos fenólicos. El ensayo mostró que las larvas de *S. frugiperda* fueron afectadas por el extracto y no aumentaron de tamaño comparadas con el control. Mediante el fraccionamiento se observó que este residuo es rico en grasas, saponinas triterpénicas y proteínas. El aprovechamiento de este residuo reafirma la idea de la quinua como un cultivo multipropósito, además de reducir el impacto contaminante que el mojuelo genera en cursos de agua potable.

Palabras clave: quinua, mojuelo, composición.

1. Introducción

La revaloración de la quinua como alimento en los últimos años ha llevado a generar interés en su producción ya que el consumo se ha generalizado nivel mundial. Sabemos



que se trata de una planta con excelentes propiedades alimenticias y ha tenido un importante papel en la economía de los pueblos andinos durante, al menos los últimos tres milenios (Dillehay *et al.*, 2007; Babot, 2011).

Actualmente los principales países productores de quínoa son Perú y Bolivia seguidos por Ecuador, Colombia, Argentina y Chile. Es destacable la expansión de su cultivo en Estados Unidos, Canadá, Francia, Holanda, Dinamarca, Italia, India, Kenia, Marruecos, China, Egipto e Inglaterra, entre otros países. Se estima que actualmente se cultiva en más de 50 países alrededor del mundo (Aguilar *et al.*, 2019). Sin embargo, la producción genera un volumen importante de desechos tales como restos de panojas, hojas, ramas y tallos. Además de estos residuos se debe tener en cuenta que para el proceso de comercialización y según la legislación vigente, los granos de quínoa cosechados son sometidos a un proceso de remoción de saponinas ya que estos compuestos le otorgan sabor amargo. Las saponinas se acumulan en el episperma y tradicionalmente son eliminados en forma parcial mediante abrasión y lavados. Un proceso moderno de desaponificado consiste en la remoción mecánica de la superficie del grano, el pulverizado obtenido se denomina "mojuelo" y no reviste valor comercial alguno.

En general, la producción y acondicionamiento genera residuos agroindustriales, que a nivel mundial éstos representan cantidades significativas y altos costos de disposición, que deben ser asumidos por las empresas generadoras, permitiendo que se transformen en un problema no solo ambiental, sino económico (Yepes *et al.*, 2008). El aprovechamiento de estos residuos brinda solución a las diferentes problemáticas originadas por su generación y disposición final y se enfoca como una estrategia base para el manejo de los mismos. Es de suma importancia el correcto manejo del mojuelo ya que por ejemplo su llegada a cursos de agua generaría un problema ambiental severo, no sólo en la calidad de los cuerpos de aguas sino que la formación de espuma afectaría tanto a la productividad primaria y secundaria de los mismos.

Tomando en cuenta que actualmente el mojuelo no reviste valor comercial, es que el objetivo del presente trabajo fue establecer la composición química del mojuelo, evaluar la citotoxicidad y el efecto sobre larvas del "gusano cogollero" (*Spodoptera frugiperda*) de sus extractos.

2. Metodología

2.1. Análisis químico preliminar

Se realizó una marcha analítica general con diferentes reacciones al tubo a los fines



de determinar la presencia de metabolitos primarios y secundarios concentrados en el residuo de limpieza. Para ello, alícuotas del mojuelo fueron resuspendidas en diferentes solventes y en cada extracto se determinó la presencia de constituyentes empleando diferentes reacciones de carácter cualitativo. En cada caso se usó su correspondiente testigo de referencia. Los resultados fueron expresados como presencia (+) o no detectado (nd).

2.2. Preparación y caracterización del extracto hidroalcohólico

En base a los resultados positivos de la marcha analítica general, es que se procedió a realizar la cuantificación de metabolitos mediante diferentes métodos fotocolorimétricos.

Se pesaron 20 gramos de mojuelo y fueron macerados con etanol al 80% y luego con etanol 50% durante 24 horas respectivamente. Los extractos obtenidos fueron reunidos y el solvente se eliminó en un evaporador rotatorio. El remanente acuoso fue liofilizado obteniendo así un extracto de aspecto sólido.

2.3. Cuantificación de metabolitos primarios y secundarios

2.3.1. Compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales (FT) se estimó mediante el método de Folin-Ciocalteu con ligeras modificaciones (Singleton *et al.*, 1999). El contenido de fenoles en cada caso se estimó por comparación con los valores de densidad óptica obtenidos con diferentes concentraciones de ácido gálico utilizado como standard. Los resultados se expresaron como mg Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por gramo de material vegetal (mgEAG/gmv) y/o por gramo de extracto (mgEAG/gext). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.2. Saponinas totales

El contenido de saponinas totales (ST) fue determinado mediante la reacción con vainillín en medio ácido con modificaciones según las especificaciones de Helaly *et al.*, (2001). El método está basado en reacciones colorimétricas por la generación de grupos cromofóricos de las saponinas, los cuales son visibles en longitudes de onda alrededor de los 544 nm. Los resultados se expresaron como mg Equivalentes de Ácido Oleanólico (EAO) por gramo de material vegetal (mgEAO/gmv) y/o por gramo de extracto (mgEAO/gext). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.3. Azúcares totales

El dosaje de azúcares se realizó mediante el método de Antrona (Dreywood, 1946), que permite la cuantificación de una amplia gama de azúcares. En presencia de ácido sulfúrico concentrado, los azúcares son deshidratados a furfurales (o hidroximetilfurfurales) los cuales condensan con Antrona (10-ceto-9,10-dihidroantraceno) dando un complejo azul verdoso.

El contenido de azúcares totales se estimó por comparación con los valores de densidades ópticas obtenidas con diferentes concentraciones de glucosa utilizada como estándar. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de glucosa por gramo de extracto (mg EG/g extracto). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2.3.4. Determinación de proteínas totales

El contenido de proteínas totales fue determinado mediante el método de Bradford (1976). El mismo consiste en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul a 595 nm que se forma por la interacción Van der Waals entre los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos y el colorante Comassie Blue G-250 del reactivo de Bradford.

El contenido de PT se estimó por comparación con los valores de densidad óptica obtenidos con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) empleada como standard. Los resultados se expresaron como miligramos Equivalentes BSA por gramo de extracto (mgEBSA/g ext) y por gramo de material vegetal seco (mgEBSA/g mv).

2.4. Recuperación de metabolitos en fracciones de diferente polaridad

2.4.1. Extracción de grasas

Un tratamiento previo que se realizó al mojuelo fue la extracción de grasas del material crudo, para ello 34 gramos de la muestra fue sometida a un extracción con n-hexano en equipo Soxhlet durante 24 hs.

Trascurrido ese tiempo, luego del filtrado, el solvente se evaporó y se obtuvo un residuo de aspectos ceroso insoluble en agua y en etanol. Por diferencias de peso, se obtuvo el porcentaje de grasas en la muestra. Los resultados se expresaron como gramos de grasas por gramo de mojuelo o porcentaje de grasas en la muestra. El extracto obtenido fue rotulado como extracto hexánico (EH).

El residuo libre de componentes liposolubles fue secado en estufa durante 48 horas para su posterior extracción de otros sol-



ventes de polaridad media y alta. Este fraccionamiento se realizó a los fines de concentrar metabolitos de polaridad similar, facilitar el proceso de separación de aquellos constituyentes mayoritarios y su aislamiento.

2.4.2. Extracción con acetato de etilo

El mojuelo seco y libre de grasas fue extraído en un equipo Soxhlet durante 48 hs con acetato de etilo. Luego de cumplido ese tiempo, el solvente fue evaporado y se obtuvo un extracto que fue nombrado extracto acetato de etilo (EA). Del mismo modo que en el caso anterior el residuo sólido extraído fue secado durante 48 horas en estufa.

2.4.3. Extracción con etanol

El mojuelo seco y sometido a dos procesos de extracción previos, fue extraído nuevamente en un equipo Soxhlet durante 48 hs con etanol 96°. Luego de cumplido ese tiempo, el solvente fue evaporado y se obtuvo un extracto que fue nombrado extracto etanólico (EE). Del mismo modo que en el caso anterior el residuo sólido extraído fue secado durante 48 horas en estufa.

2.4.4. Extracción con agua

Finalmente el mojuelo seco y sometido a tres procesos de extracción previos fue extraído por maceración con agua hirviente. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró. El extracto fue liofilizado para eliminar el agua y fue rotulado como extracto acuoso (EAc).

2.4.5. Caracterización química de las fracciones

La cuantificación de los metabolitos en cada fracción se realizó siguiendo las mismas especificaciones detalladas los puntos 2.1 y 2.3 respectivamente.

2.5. Actividad citotóxica

Se emplearon dos métodos para determinar la citotoxicidad, en primer lugar se ensayó con glóbulos rojos aislados y luego con un ensayo de citotoxicidad aguda empleando un microinvertebrado marino.

2.5.1. Determinación de la Actividad Hemolítica

Se evaluó el efecto de los extractos vegetales sobre eritrocitos humanos a los fines de determinar la acción hemolítica por medición de hemoglobina libre y su correlación con el contenido de saponinas totales de acuerdo con las especificaciones de Cantillo *et al.* (2007) y Lizárraga *et al.* (2012).

Se empleó una muestra de sangre de eritrocitos humanos, a la que se adiciono heparina al 10%. En el ensayo se midió la liberación de hemoglobina a 450 nm en espectrofotómetro.

El porcentaje de hemólisis se estimó mediante la fórmula propuesta por Guerra y colaboradores (2001).

2.5.2. Ensayo de citotoxicidad aguda

La evaluación preliminar de la toxicidad de los extractos se determinó mediante el "brine shrimp test", empleando larvas del crustáceo *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982). La concentración letal media (CL₅₀) se calculó con el uso del programa Probit. El grado de toxicidad de los extractos se definió en función del rango de los valores de CL₅₀ de acuerdo con las siguientes categorías: extremadamente tóxico (CL₅₀< 10 µg/mL), muy tóxico (10< CL₅₀ <100), moderadamente tóxico (100< CL₅₀ <1000) y no tóxico (CL₅₀> 1000 µg/mL) (Solís *et al.*, 1993).

2.6. Actividad biopesticida

Para determinar el efecto biopesticida de mojuelo de quinoa (rico en saponinas) se utilizaron 150 individuos de *Spodoptera frugiperda* del 2er instar (L2). Se aplicó tres dosis del EHA al 0,1%; 0,5% y 1%. El mismo fue aplicado en hojas de sorgo de

Alepo (*Sorghum halepense* L.) previamente lavadas y cortadas en rectángulos de 2 x 8 cm, las hojas asperjadas fueron colocadas en tubos de vidrio junto con 10 larvas. Diariamente se contabilizo el número de larvas vivas y el daño foliar. En este ensayo también se observó el desarrollo larval. Se analizaron los datos con un ANOVA de una vía. Los tratamientos aplicados se separaron del control F (3,8) = 62,881; p<0,01.

3. Resultados y discusión

La marcha analítica general determinó de manera cualitativa la presencia de: lípidos, proteínas, azúcares, compuestos fenólicos y saponinas. Se destacó la presencia de saponinas y se confirmó la detección mediante tres reacciones diferentes empleando métodos físicos y químicos. Dado que el proceso de limpieza mecánica de los granos es principalmente para la remoción de saponinas, particularmente el residuo analizado nos permitiría estimar que los granos quedan libres o con bajo contenido de esta sustancias consideradas tradicionalmente como antinutrientes. Esta última propiedad de las saponinas está en discusión ya que se han descrito múltiples beneficios relacionados a su consumo. Las saponinas disminuyen el nivel lípidos en la sangre, reducen los riesgos de ciertos tipos

de cáncer y reducen la respuesta de la glucosa en sangre. Una dieta adecuada en saponinas puede usarse para inhibir la agregación plaquetaria y como antídoto contra el envenenamiento agudo por plomo (Shi *et al.*, 2004).

El extracto hidroalcohólico tuvo un rendimiento del 58% (p/p) y saponinas fueron los metabolitos que se cuantificaron en mayor cantidad (24,07%). El resultado obtenido es coincidente con lo observado en la marcha analítica general. En la tabla 1 se detalla el dosaje de los diferentes constituyentes del extracto hidroalcohólico:

Tabla 1: Cuantificación de metabolitos en el extracto hidroalcohólico de mojuelo.

	mgE / gramos de ex- tracto	mgE / gramos de mo- juelo	%
Fenoles	8,12	4,09	0,41
Totales ^a	± 0,40	± 0,15	
Saponinas	417,60	240,7	24,07
Totales ^b	± 2,67	± 1,14	
Azúcares	193,04	111,96	11,19
Totales ^c	± 1,21	± 0,98	
Proteínas	255,53	148,21	14,82
Totales ^d	± 2,74	± 2,41	

Referencias. a: mg equivalentes de ácido gálico; b: me equivalentes de ácido oleanólico; c: mg equivalentes de glucosa, d: mg equivalentes de albúmina sérica bovina.

El extracto hidroalcohólico del mojuelo en diferentes concentraciones no exhibió actividad hemolítica frente eritrocitos humanos, es decir que el contenido de saponinas presentes en el extracto no fue suficiente para generar hemólisis de las células sanguíneas. Se conoce que estos metabolitos poseen propiedad hemolítica en contacto con la sangre porque interaccionan con el colesterol de la membrana. Se postula que esta capacidad es característica de saponinas triterpénicas, pero varía de acuerdo con los sustituyentes de la estructura principal. La administración vía intravenosa de estos compuestos genera efecto hemolítico, mientras que cuando el suministro es por vía oral, la toxicidad es muy baja o nula (Keller, 2009).

El ensayo de actividad citotóxica aguda indicó que el extracto hidroalcohólico no exhibe toxicidad frente a nauplios de *Artemia salina* ya que el valor de CL₅₀ fue superior a 1000 µg/mL. El *brine shrimp test* como también es conocido este ensayo ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción citotóxica de plantas (Solís *et al.*, 1993; Valdés-Iglesias *et al.*, 2003) y ha demostrado buena correlación

con ensayos de toxicidad aguda oral en ratones (Lagarto *et al.*, 2001).

El fraccionamiento del mojuelo mediante extracciones con solventes de polaridad creciente permitió separar diferentes grupos de metabolitos primarios y secundarios con polaridad similar. Esta extracción sólido-liquido generó una purificación preliminar que permitirá optimizar el aislamiento de los constituyentes bioactivos. A cada fracción se ensayó de manera cualitativa para determinar la presencia de grupos de metabolitos mediante reacciones al tubo (Tabla 2).

Tabla 2: Determinación cualitativa de metabolitos en las fracciones de polaridad creciente de mojuelo.

	EH	EA	EE	EAc
Compuestos fenólicos	-	+	+	+
Saponinas	-	-	+	+
Azúcares	-	-	+	+
Proteínas	-	-	+	+
Grasas	+	-	-	-

Referencias: (+): presencia, (-): no detectado.

De acuerdo con el perfil cualitativo obtenido, se procedió al dosaje de estos componentes en cada extracto obtenido. Es

significativo el agrupamiento de los componentes de acuerdo con su polaridad y principalmente en las fracciones de mayor polaridad (extractos etanólico y acuoso) donde se destaca el contenido de saponinas. Teniendo en cuenta que el desaponificado es la principal razón por la cual se realiza la escarificación mecánica de los granos estos resultados demuestran que el procedimiento aplicado en esta variedad de semillas es el correcto.

Tabla 3: Cuantificación de metabolitos en extractos de polaridad creciente.

	EH	EA	EE	EAc
Fenoles	-	28,90	28,12	6,37
Totales ^a				
Saponinas	-	-	484,95	859,20
Totales ^b				
Azúcares	-	-	189,15	318,01
Totales ^c				
Proteínas	-	-	320,06	189,98
Totales ^d				
Grasas	82,9	-	-	-
Totales				

Fenoles Totales: mgEAG/g mojuelo, Saponinas Totales: mgEAO/g mojuelo., Azúcares Totales: mgEGlu/g mojuelo., Proteínas Totales: mgEASB/g mojuelo., Grasas Totales: mg de grasa/ g ext.



Los tratamientos aplicados se separaron del control $F(3, 8) = 62,881$; $p < 0,01$. El ensayo mostró que las larvas de *S. frugiperda* fueron afectadas por la saponina. Las larvas en contacto con el producto no aumentaron de tamaño comparadas con el control. Las larvas al no aumentar de tamaño se alimentaron sólo de la hoja, mientras que las larvas del control al consumir todo el material vegetal, se alimentaron de otras larvas presentes en el tubo (presentan conducta carnívora frente a la falta de alimento o competencia).

4. Conclusiones

Este es el primer estudio realizado para la revalorización de un residuo que no solo concentra saponinas sino también otros metabolitos de relevancia. Un tratamiento adecuado de recuperación de grasas y luego el uso de solventes polares permitirá la obtención de extractos con saponinas los cuales pueden tener un amplio uso ya que las mismas poseen diversas aplicaciones. El contenido de grasas, proteínas y ausencia de toxicidad nos permite pensar en un uso sustentable del mojuelo o sus extractos como un biopesticida de bajo costo. El aprovechamiento de estos residuos reafirma la idea de la quinua como una planta multipropósito además de reducir el impacto contaminante que este residuo puede generar en cursos de agua potable.

Por otro lado, el efecto biopesticida mostró un cambio en la conducta de las larvas y un efecto antialimentario. Por lo cual, se recomienda más estudios para determinar efectos en larvas y desarrollo de pupa y adultos.

5. Bibliografía

- Aguilar, J., Miano, A., Obregon, J., Soriano-Colchado, J. y Barraza Jauregui, G. (2019). Malting process as an alternative to obtain high nutritional quality quinoa flour. *Journal of Cereal Science*, 90, 102858.
- Babot, M. del P. (2011). Cazadores-recolectores de los andes centro-sur y procesamiento vegetal. Una discusión desde la puna meridional argentina (ca. 7.000-3.200 años AP). *Chungara*, 43 (1), 413-432.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cantillo, J., Güete, J., Baldris, R., Jaramillo, B. y Olivero, J. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda (LC50) frente a *Artemia franciscana* y la actividad hemolítica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanólico parcial de Justicia secunda (Vahl.) *Scientia et Technica*, 8, 257-258.



Dillehay, T., Rossen, J., Andrés, T. y Williams, D. (2007). Pre-ceramic adoption of peanut, squash, and cotton in northern Perú. *Science*, 316, 1890-1893.

Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18 (8), 499-499.

Guerra de L., J., Nogueiras, L., Delgado, C. y Hernández, S. (2001). Determinación cuantitativa de saponinas y azúcares reductores del *Agave brittoniana* T. *Revista Cubana de Química*, XIII (3), 37-42.

Helaly, F., Soliman, H., Soheir, A. y Ahmed, A. (2001). Controlled release of migration of molluscicidal saponin from different types of polymers containing *Calendula officinalis*. *Advances in Polymer Technology*, 20 (4), 305-311.

Keller, H. (2009). El "yvyraro", un árbol icotóxico de los guaraníes de Misiones, Argentina. *Darwiniana*, 47 (1), 31-34.

Lagarto, A., Silva, R., Guerra, I. y Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8 (5), 395-400.

Lizárraga, E., Castro, F., Fernández, F., P. de Lampasona, M. y Catalán, C. (2012). Antioxidant, hemolytic and cytotoxic activities of *Senecio* species used in traditional medicine of northwestern Argentina. *Natural Product Communications*, 7 (5), 607-608.

Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G. y Jiang, Y. (2004). Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *Journal of Medicinal Food*, 7 (1), 67-78.

Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Solís, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P. y Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Planta Médica*, 59, 250-252.

Valdés-Iglesias, O., Díaz, N., Cabranes, Y., Acevedo, M. E., Areces, A. J. y Araña, L. (2003). Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*, 16, 36-45.



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

Yepes, S., Montoya, L. y Orozco, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales – frutas en Medellín y el sur del Valle del Aburrá, Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín, Colombia*, 61 (1), 4422-4431.

Distintas aproximaciones hacia la síntesis total de Quindolina

C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Distintas aproximaciones hacia la síntesis total de Quindolina

Autor: Thobokholt, Elida N.; thobokholt@iquir-conicet.gov.ar

Co-autor(es): Kaufman, Teodoro S.; kaufman@iquir-conicet.gov.ar; Larghi, Enrique L.;

larghi@iquir-conicet.gov.ar;

Bracca, Andrea B. J.; bracca@iquir-conicet.gov.ar;

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

Las indoloquinolinas, tanto naturales como sintéticas, son de gran interés debido a que presentan un amplio abanico de actividades biológicas útiles. Si bien se encuentran disponibles varios métodos para la síntesis de indoloquinolinas, éstos suelen requerir condiciones drásticas, gran exceso de reactivos, protección de grupos funcionales o prolongados tiempos de reacción. Por este motivo, debido al interés del grupo de trabajo en la síntesis de productos naturales bioactivos y estructuralmente singulares (Heredia, et al., 2016; Silveira, et al., 2009), se propuso desarrollar una nueva síntesis total de Quindolina a través de dos estrategias sintéticas diferenciadas en la última etapa de la secuencia (Pergomet, et al., 2016; Pergomet, et al., 2017). Entre las transformaciones que se utilizaron se destacan la reacción de Henry, una condensación tipo Friedländer, reacciones de oxidación y reducción y una ciclación de Buchwald-Hartwig en la última etapa de la síntesis para una de las vías y una ciclación vía nitreno para la otra vía. De esta manera, se logró desarrollar la síntesis total del alcaloide Quindolina mediante dos secuencias, de 6 o 5 etapas, partiendo de 2-bromobenzaldehído o benzaldehído respectivamente. En ambas vías, la síntesis total del producto natural se logró de manera eficiente y sin emplear grupos protectores.

Introducción y objetivos

Quindolina (**Figura 1**) es uno de los diversos alcaloides aislados de *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr. (Hutchinson & Dalziel, 1963), un arbusto trepador oriundo de África occidental y central (**Figura 2**).

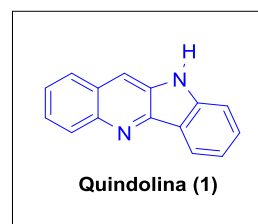


Figura 1. Estructura química de Quindolina.

Esta particular molécula pertenece a la familia de las indoloquinolinas, que comprende heterociclos caracterizados por poseer un anillo indólico y otro quinolínico fusionados entre sí de diversas formas.

La actividad biológica de los diferentes alcaloides indoloquinolínicos, sus análogos y derivados, ha sido informada en varios trabajos, siendo las más relevantes para nuestro interés las propiedades antitumorales y antiparasitarias (Larghi, et al., 2015).



Figura 2. Planta y flor de *Cryptolepis sanguinolenta*.

Estos compuestos han despertado gran interés en la comunidad química tanto por su destacada bioactividad como por el desafío que representan las transformaciones sintéticas necesarias para preparar estas singulares estructuras.

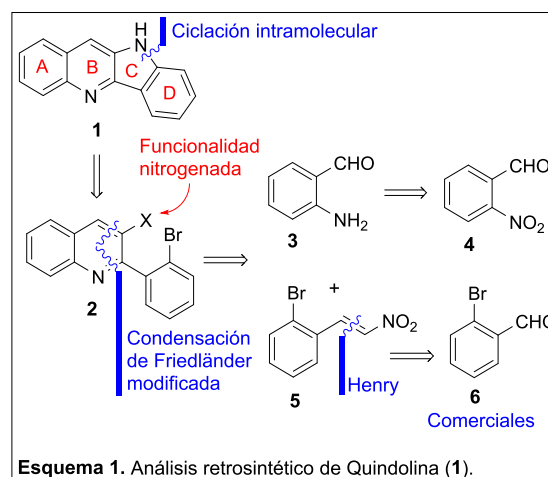
Es por tales motivos que se propuso como objetivo realizar la síntesis total de **1** utilizando dos aproximaciones sintéticas diferentes orientadas a construir el anillo indólico: (a) mediante una ciclación de Buchwald-Hartwig y (b) a través de la ciclación de un intermediario de tipo

nitreno.

Materiales y métodos - Análisis retrosintético

La aproximación a **1** a través de la construcción del anillo indólico mediante una ciclación de Buchwald-Hartwig se muestra en el **Esquema 1**.

El análisis retrosintético de quindolina (**1**), que fundamenta la estrategia hacia su síntesis total, propone desconectar la unión C-N en el anillo indólico, lo cual revela el precursor **2**. Esta quinolina podría conducir a **1** mediante una aminación intramolecular promovida por catálisis de Pd o Cu (Ramann & Cowen, 2016).

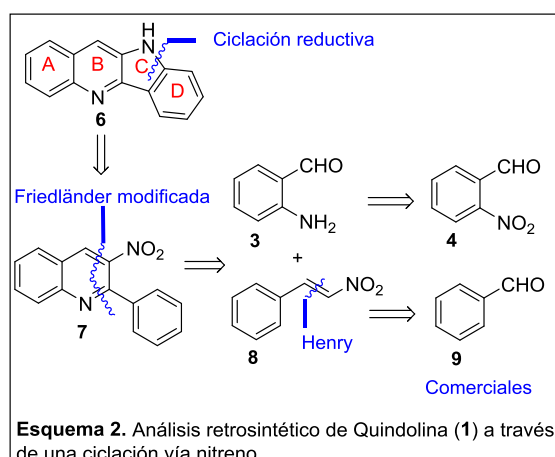


A su vez, el derivado quinolínico **2** podría ser desconectado a nivel de los enlaces N-C2 y C3-C4 surgiendo así los fragmentos **3** y **5**, los cuales se especula podrían generar **2** mediante una reacción

de Friedländer modificada (Ming-Chung, et al., 2003).

Finalmente, los precursores **3** y **5** podrían obtenerse a partir de los benzaldehídos comerciales **4** y **6** respectivamente. Esto se conseguiría mediante la reducción selectiva del grupo NO₂ presente en el primero y vía reacción nitroaldólica (condensación de Henry) del segundo con nitrometano.

La aproximación a **1** a través de la construcción del anillo indólico mediante una ciclación por intermedio de un nitreno se muestra en el **Esquema 2**. En el análisis retrosintético del producto natural (**1**), se propone desconectar la unión C-N en el anillo indólico, asumiendo que el mismo puede ser construido mediante una ciclación reductiva vía nitreno desde el compuesto nitroderivado **7**.



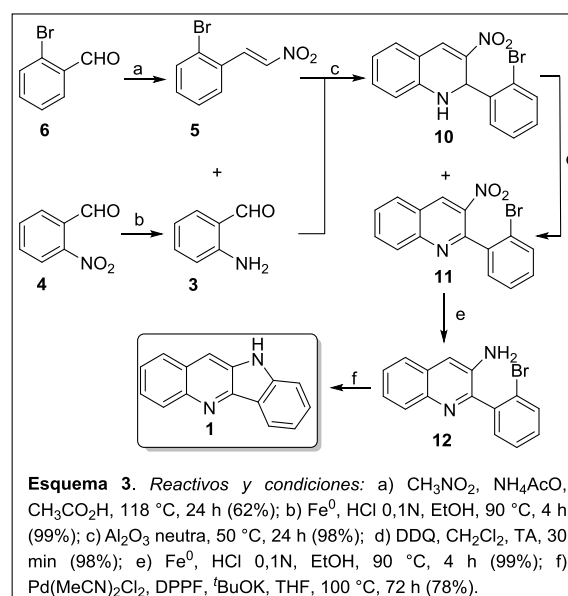
A su vez, la desconexión de la nitroquinolina **7** en los enlaces N-C y C3-

C4, revela los precursores **3** y **8**, ya que se asume que una reacción de Friedländer modificada de éstos puede proveer **7**. Estos precursores podrían obtenerse a partir de los compuestos comerciales **4** y **9** mediante la reducción de un grupo nitro y una reacción de Henry, respectivamente.

Resultados

Aproximación hacia **1** vía Buchwald-Hartwig

Se sometió 2-bromobenzaldehído (**6**) a una reacción de Henry (CH₃NO₂, NH₄AcO) vía calentamiento térmico (Kolarovic, et al., 2014) obteniéndose **5** con 62% de rendimiento (**Esquema 3**).



En paralelo se obtuvo 2-aminobenzaldehído (**3**) mediante reducción

de **4** en condiciones eco-amigables, con virutas de hierro elemental (Fe^0) y HCl. (Mendez, et al., 2019).

Luego, **3** y **5** fueron acoplados mediante una reacción de Friedländer modificada para dar una mezcla de productos, la 2-bromofenil-3-nitrodihidroquinolina (**10**) junto con la nitroquinolina **11**.

De las opciones disponibles para realizar esta transformación química, se optó por un acoplamiento en condiciones de ausencia de solvente mediante el uso

de Al_2O_3 neutra, (Ballini, et al., 2005) obteniéndose una mezcla de **10** y **11** con 98% de rendimiento.

Para continuar con la secuencia planeada era necesario aromatizar el anillo heterocíclico de **10**. Por lo tanto, se intentó oxidar la dihidroquinolina **10** para obtener la nitroquinolina **11**. Vale resaltar que ésta fue una etapa dificultosa, lo cual se refleja en la diversidad de condiciones ensayadas, las más relevantes de las cuales se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones ensayadas para la reacción de oxidación de **10**.

Entrada N°	Condiciones de reacción				Rend. (%)
	Reactivos	Solvente	Temp. (°C)	Tiempo (h)	
1	KHSO_4 , K_2CrO_4 , SiO_2	CH_2Cl_2	25	20	38
2	I_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	EtOH	25	3	4
3	KMnO_4	Me_2CO	25	10	6
4	<i>p</i> -Benzoquinona	Dioxano	Reflujo	72	35
5	MnO_2	CH_2Cl_2	MO	0,5	NI
6	CuI , HCl 0,5N	DMSO	120	1	78
7	$\text{Mn}(\text{OAc})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DDQ catalítico	CH_2Cl_2	25	12	51
8	FeCl_3 , DDQ catalítico	CH_2Cl_2 : H_2O (10:1)	25	22	29
9	DDQ	CH_2Cl_2	25	0,5	98

^a NI: Productos no Identificados



Con las condiciones de la entrada 1, utilizando KHSO_4 , K_2CrO_4 y SiO_2 , se obtuvo **11** con un modesto rendimiento de 38%. Tanto la entrada 2, que involucra una reacción con I_2 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en EtOH (Forrest, et al., 1985) como la entrada 3, donde el oxidante es KMnO_4 en acetona (Landmesser, et al., 2008) reflejan las condiciones que dieron lugar a los rendimientos más bajos (4% y 6%, respectivamente).

En ambos casos se obtuvieron otros productos de reacción que no fueron identificados. La entrada 4 corresponde al tratamiento con *p*-benzoquinona (Palacios, et al., 2004), el cual dio el producto con un rendimiento del 35%, generándose también otros productos de reacción que no pudieron ser identificados.

En el caso de la entrada 5, donde se utilizó MnO_2 en CH_2Cl_2 bajo irradiación de microondas (Plodex, et al., 2012), se observó que el sistema era incompatible con el equipo ya que, debido al calentamiento extremo, se notó la perforación del tubo de reacción por fusión del vidrio.

Afortunadamente, al ensayar la aromatización con CuI, HCl 0,5N y DMSO (Shenghai, et al., 2015) (entrada 6), se obtuvo un rendimiento más cercano a nuestras expectativas (78%). Los experimentos representados en las

entradas 7 y 8 tienen en común que en ambos se utilizó DDQ catalítico (Cosner, et al., 2011; Chandrasekhar, et al., 1996) pero las mismas cursaron con rendimientos del 51% y 29%, respectivamente.

Tras evaluar diversas condiciones de reacción se encontró una transformación de características superadoras, la que es mostrada en la entrada 9. El empleo de DDQ en diclorometano a temperatura ambiente (Kishor, et al., 2018) resultó en la obtención del intermediario **11** con 98% de rendimiento.

Posteriormente, **10** fue sometido a una reducción con hierro elemental (Fe^0) en medio de HCl, obteniéndose la aminoquinolina **12** con 99% de rendimiento.

Con el objeto de culminar la síntesis de **1**, a partir de **12** se probaron distintas condiciones de reacción para llevar a cabo la ciclación intramolecular, las que se muestran en la **Tabla 2**.

Sin embargo, con las condiciones mostradas en la entrada 1, se obtuvo **1** con un 56% de rendimiento del producto, a través de una *N*-arilación catalizada con CuI. También se utilizó una reacción con tBuOK en DMSO (entrada 2) lográndose un rendimiento más modesto.

De estas condiciones, la mostrada en la entrada 3, corresponde a un proceso tipo Buchwald-Hartwig (Lin & Sun, 2013), una

reacción catalizada por complejos de Pd.

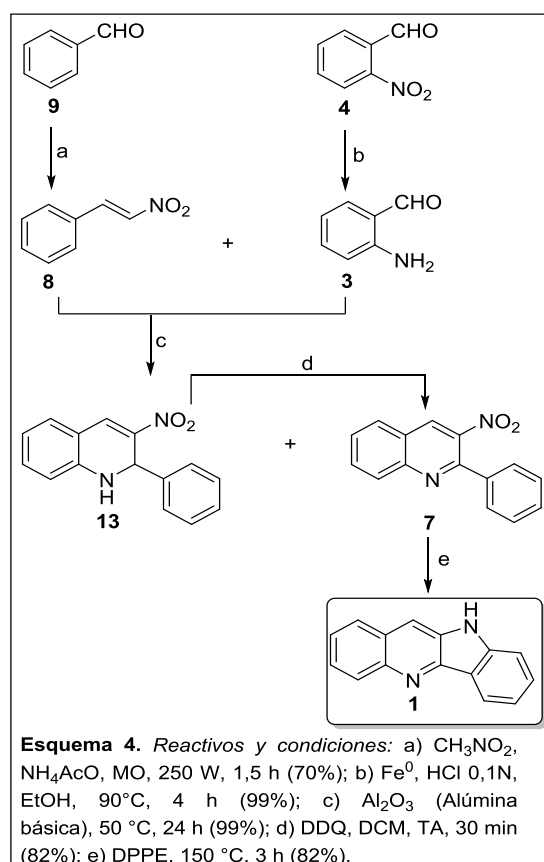
Tabla 2. Condiciones utilizadas para la reacción de ciclación intramolecular de **19**.

Entrada N°	Condiciones de reacción				Rend. (%)
	Reactivos	Solvente	Temp. (°C)	Tiempo (h)	
1	CuI, Prolina, K ₂ CO ₃ , DMF	DMF	110	24	56
2	^t BuOK	DMSO	130	24	43
3	Pd(MeCN) ₂ Cl ₂ , DPPF, ^t BuOK	THF	100	72	78
4	^t BuOK, DMSO, luz led violeta	DMSO	25	48	57

En este caso fue posible obtener el producto natural con un rendimiento del 78%, siendo ésta la condición que dio lugar más eficientemente al producto buscado.

Cabe destacar además que se probó una reacción promovida por luz led (Kishor, et al., 2018) (entrada 4), pero el rendimiento de esta reacción fue inferior al alcanzado mediante la reacción de Buchwald-Hartwig.

En vista de cumplir con el objetivo sintético **1** se exploró la aproximación sintética b (**Esquema 4**). Para ello se sometió a **9** a una reacción de Henry utilizando calentamiento por microondas (Rodríguez & Dolores Pujol, 2011) con CH₃NO₂, obteniendo **8**.



En paralelo se obtuvo 2-amino benzaldehído (**3**) mediante reducción de **4** como ya se mencionó anteriormente.

A continuación, disponiendo de los intermediarios **8** y **3**, se procedió con la síntesis de la dihidroquinolina **13**. Para ello, **8** fue condensado con el 2-amino benzaldehído **3** (obtenido a partir de la reducción previa de **4** con Fe⁰ y HCl) mediante una reacción de Friedländer modificada.

Es importante mencionar que inicialmente se probó la reacción libre de solvente bajo promoción de Al₂O₃ neutra de igual manera que con la bromo-dihidroquinolina **10**. Sin embargo, la

reacción no prosperó, razón por la cual buscamos una alternativa probando con Al₂O₃ básica (Ballini, et al., 2005). De esta forma se obtuvo una mezcla de **13** y **7** con 99% de rendimiento.

Luego se oxidó la dihidroquinolina **13** para obtener la nitroquinolina deseada **7** con DDQ en diclorometano a temperatura ambiente, permitiendo obtener **7** con 82% de rendimiento.

Con el objeto de culminar la síntesis del producto natural **1**, se probaron distintas condiciones de reacción para llevar a cabo la ciclación reductiva de **7**, las que se muestran en la **Tabla 3**.

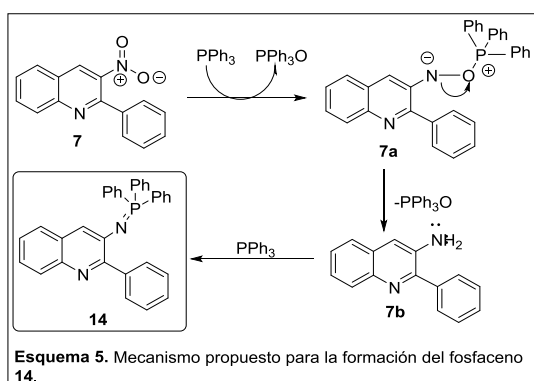
Tabla 3. Condiciones utilizadas para la reacción de ciclación reductiva de **7** hacia **1**.

Entrada N°	Condiciones de reacción				Rend. (%)
	Reactivos	Solvente	Temp. (°C)	Tiempo (h)	
1	PPh ₃ , MoO ₂ Cl ₂ (DMF) ₂	PhMe	120	24	52 (aminoquinolina)
2	P(C ₆ H ₁₁) ₃	-	150	4	Descomposición
3	P(OMe) ₃	-	150	120	Descomposición
4	PPh ₃	-	150	4	38 (fosfazeno, 14)
5	DPPE	-	150	4	82

Aproximación hacia **1** vía nitreno

Con las condiciones mostradas en la entrada 1, utilizando PPh_3 , tolueno y $\text{MoO}_2\text{Cl}_2(\text{DMF})_2$ (Vigante, et al., 1991) se obtuvo la aminoquinolina correspondiente con un rendimiento del 52%, por lo que se decidió intentar con otros métodos. Tanto el protocolo que utiliza $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_{11})_3$ (entrada 2) como el que emplea $\text{P}(\text{OMe})_3$ (Sanz, et al., 2007) (entrada 3) condujeron a la descomposición del material de partida.

Por otra parte, al llevar a cabo la reacción con PPh_3 (Freeman & Urvoy, 2005) (entrada 4) se obtenía un producto que siguiéndolo por CCD poseía el mismo R_f que **1**, pero luego de haberlo analizado por técnicas de RMN y espectrometría de masas de baja resolución, se concluyó que se había obtenido el fosfazeno **14** (Freeman & Urvoy, 2005) con un 38% de rendimiento. En el **Esquema 5** se muestra un mecanismo propuesto para la obtención de **14**.



Finalmente, luego de varios intentos fallidos, se decidió probar con DPPE (Peng, et al., 2011), obteniendo el producto deseado **1** con un 82% de rendimiento.

Conclusiones

Se realizó la síntesis total del alcaloide indoloquinolínico Quindolina (**1**, 46 % de rendimiento global) a través de una ciclación de Buchwald-Hartwig y mediante una secuencia de 6 etapas, robustas y eficientes, muchas de ellas de naturaleza eco-consciente y evitando el uso de grupos protectores.

Además, se logró acceder de forma alternativa a Quindolina (**1**, 46 % de rendimiento global), a través de una ciclación vía nitreno en el último paso de síntesis. Es destacable esta ruta complementaria ya que es un paso más corta (5 etapas) y evita el uso de catalizadores basados en metales preciosos.

Mediante esta aproximación sintética modular se espera que, utilizando precursores derivados de **9**, **6** y **4**, se pueda generar una pequeña quimioteca orientada a su evaluación como potenciales compuestos antichagásicos.

Bibliografía

Ballini, R.; Bosica, G.; Fiorini, D. & Palmieri, A. (2005). Neutral alumina catalysed



synthesis of 3-nitro-1,2-dihydroquinolines and 3-nitrochromenes, under solvent-free conditions, via tandem process, *Green Chemistry*, **7**, 825-827. doi: 10.1039/B511003C

Chandrasekhar, S.; Sumithra, G. & Yadav, J. S. (1996). Deprotection of mono and dimethoxy phenyl methyl ethers using catalytic amounts of DDQ. *Tetrahedron Letters*, **37** (10), 1645-1646. doi: 10.1016/0040-4039(96)00081-0

Cosner, C.C.; Cabrera Ventura, P.; Byrd, K. M.; Thomas, A. M. & Helquist, P. (2011). Selective oxidation of benzylic and allylic alcohols using $Mn(OAc)_3$ /catalytic 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone. *Organic Letters*, **13** (8), 2071-2073. doi:10.1021/ol200441g

Forrest, T. P.; Dauphine, G. A. & Deraniyagala, S. A. (1985). On the mechanism of disproportionation reactions of 1,2-dihydroquinolines, *Canadian Journal of Chemistry*, **63**, 412-417. doi: 10.1002/anie.201611186

Freeman, W. & Urvoy, M. (2005). Triphenylphosphine-Mediated Reductive cyclization of 2-nitrobiphenyls: A practical and convenient synthesis of carbazoles. *Journal of Organic Chemistry*, **70** (13),

5014-5019. doi: 10.1021/jo0503299

Heredia, D. A.; Larghi, E. L. & Kaufman, T. S. (2016). Synthesis of 5-methylaaptamine from eugenol, employing a 6π -electro cyclization reaction of a 1-azatriene. *European Journal of Organic Chemistry*, **2016** (7), 1397-1404. doi: 10.1002/ejoc.201501566

Hutchinson, J.; Dalziel, J. M. (1963). *Flora of Tropical West Africa*. Londres, Reino Unido, The Whitefrairs Press Ltd.

Kishor, C. B. (2018). Chemoselective and highly rate accelerated intramolecular aza-Morita–Baylis–Hillman reaction. *Journal of Organic Chemistry*, **83** (23), 14498-14506. doi: 10.1021/acs.joc.8b02310

Kolarovic, A.; Kaslin, A. & Wennemers, H. (2014). Stereoselective synthesis of indolines via organocatalytic thioester enolate addition reactions. *Organic Letters*, **16** (16), 4236-4239. doi: 10.1021/ol501936n

Landmesser, T.; Linden, A. & Hanse, N. H.A (2008). Novel route to 1-substituted 3-(dialkylamino)-9-oxo-9H-indeno[2,1-c]-pyridine-4-carbonitriles. *Helvetica Chimica Acta*, **91**, 265-284. doi: 10.1002/hlca.200890033



Larghi, E. L.; Bracca, A. B. J.; Arroyo Aguilar, A. A.; Heredia, D. A.; Pergomet, J. L.; Simonetti, S. O. & Kaufman, T. S. (2015). Efficient total synthesis of neocryptolepine and synthetic access to 6-methylquinindoline from a common intermediate, *RSC Advances*, 7(45), 28298-28307. doi: 10.1039/C7RA05349E

Lin, H. & Sun, D. (2013). Recent synthetic developments and applications of the Ullmann reaction. A Review. *Organic Preparations and Procedures International*, 45 (5), 341-394. doi: 10.1080/00304948.2013.816208

Mendez, M. V.; Simonetti, S. O.; Kaufman, T. S. & Bracca, A. B. J. (2019). A concise Friedländer/Buchwald–Hartwig approach to the total synthesis of quindoline, a bioactive natural indoloquinoline alkaloid, and toward the unnatural 10-methylquindoline, *New Journal of Chemistry*, 43, 10803-10813. doi: 10.1039/C9NJ01961H

Ming-Chung, Y.; Zhijay, T.; Chunchi, L.; Shengkai, K.; Jianming, H. & Ching, F. (2003). An investigation of the reaction of 2-aminobenzaldehyde derivatives with conjugated nitro-olefins: an easy and efficient synthesis of 3-nitro-1,2-dihydroquinolines and 3-nitroquinolines. *Journal of Organic Chemistry*, 69 (5), 1565-

1570. doi: 10.1021/jo030070z

Palacios, F.; Alonso, C.; Tobillas, C. & Rubiales, G. (2004). Cycloaddition reactions of neutral 2-azadienes with acetylenic esters, *Heterocycles*, 64 (1), 229-240. doi: 10.3987/COM-04-S(P)17

Peng, H.; Chen, X.; Chen, Y.; He, Q.; Xie, Y. & Yang, C. (2011). Solvent-free synthesis of δ -carbolines/carbazoles from 3-nitro-2-phenylpyridines/ 2-nitrobiphenyl derivatives using DPPE as a reducing agent. *Tetrahedron*, 67 (32), 5725- 5731. doi: 10.1002/CHIN.201149035

Pergomet, J. L.; Kaufman, T. S. & Bracca, A. B. J. (2016). Expedient approach to 6-bromo-2-isopropylidencoumaranone, a potential intermediate for the synthesis of TMC-120B, pseudodeflectusin, and their congeners. *Helvetica Chimica Acta*, 99 (5), 398-404. doi: 10.1002/hlca.201500525

Pergomet, J. L.; Larghi, E. L.; Kaufman, T. S. & Bracca, A. B. J. (2017). First total synthesis of the only known 2-isopropyliden-2*H*-benzofuran-3-one isolated from *V. luetzelburgii*, *RSC Advances*, 7, 5242-5250. doi: 10.1039/C6RA28587B

Plodek, A.; Raeder, A & Bracher, F. (2012).



Regioselective homolytic substitution of benzo[*c*][2,7]naphthyridines, *Tetrahedron*, 68 (24), 4693-4700. doi: 10.1016/j.tet.2012.04.023

Ramann, G. A. & Cowen, B. J. (2016). Recent advances in metal-free quinoline synthesis, *Molecules*, 21 (8), 986-996. doi: 10.3390/molecules21080986

Rodríguez, J. M. & Dolores Pujol, M. (2011). Straightforward synthesis of nitroolefins by microwave- or ultrasound-assisted Henry reaction. *Tetrahedron Letters*, 52 (21), 2629-2632. doi: 10.1016/j.tetlet.2011.03.037

Sanz, R.; Escribano, J.; Pedrosa, M. R.; Aguado, R. & Arnáiz, F. J. (2007). Dioxomolybdenum(VI)-catalyzed reductive cyclization of nitroaromatics. synthesis of carbazoles and indoles. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349 (5), 713-718. doi: 10.1002/adsc.200600384

Shenghai, G.; Tao, L.; Zhang, W.; Zhang, X. & Xuesen, F. (2015). Regioselective Synthesis of Indolo[1,2-*c*]quinazolines and 11*H*-Indolo[3,2-*c*]quinolines via copper-catalyzed cascade reactions of 2-(2-bromoaryl)-1*H*-indoles with aldehydes and aqueous ammonia. *Journal of Organic Chemistry*, 80(21), 10955-10964. doi:

10.1021/acs.joc.5b02076

Silveira, C. C.; Larghi, E. L.; Mendes, S. R. Bracca, A. B. J.; Rinaldi, F. & Kaufman, T. S. (2009). Electrocyclization-mediated approach to 2-methyltricycline, an unnatural analog of the azafluoranthene alkaloid tricycline. *European Journal of Organic Chemistry*, 4637-4645. doi: 10.1002/ejoc.200900673

Vigante, B. A.; Ozols, and G. Ya & Dubur, G. Y. (1991). Reduction of 2,3,4-substituted Quinolines with sodium borohydride. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 27, 1352-1357. doi: 10.1007/BF00515581

Estudio de la actividad antiviral de extractos de hojas de Cannabis sativa L. y Cannabis indica con distinto contenido de cannabinoides



C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Estudio de la actividad antiviral de extractos de hojas de *Cannabis sativa* L. y *Cannabis indica* con distinto contenido de cannabinoides

Autora: Farengo, Mariana; marux292@hotmail.com

Co-autora: Petrera, Erina; epetrera@qb.fcen.uba.ar

Profesor/a guía: Petrera, Erina; epetrera@qb.fcen.uba.ar

**Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Departamento de Química Biológica.**

Resumen

El cannabis es una de las plantas más antiguas cultivadas por el hombre por el valor de sus fibras, extracción de aceite y para preparaciones medicinales. La planta contiene una clase única de compuestos terpenofenólicos (los cannabinoides o fitocannabinoides), con un total de 565 constituyentes, de los cuales 120 son fitocannabinoides. Los cannabinoides con mayor actividad biológica son el delta 9 tetrahidrocannabinol (9-THC) y el cannabidiol (CBD). Además, la planta genera numerosos metabolitos secundarios, muchos de los cuales son terpenos que contribuyen sinérgicamente en los beneficios terapéuticos del cannabis, al igual que algunos flavonoides. Ha habido un debate considerable sobre si el cannabis tiene beneficios terapéuticos adicionales en comparación con los cannabinoides puros. Sin embargo, la teoría del efecto séquito establece que la asociación entre las diversas moléculas producidas por el

cannabis crea una sinergia que potencia las propiedades terapéuticas de cada compuesto. Así, cannabinoides, terpenos, flavonoides y otras sustancias interactúan consiguiendo una mayor efectividad en el tratamiento de un elevado número de síntomas.

Debido a la necesidad de encontrar nuevas terapéuticas antivirales, se evaluó la acción anti-herpética de extractos etanólicos de hojas de plantas de cannabis con distinto contenido de cannabinoides. Los resultados preliminares muestran una baja citotoxicidad en células Vero y una inhibición del rendimiento viral de HSV-1 KOS y HSV-2 G mayor al 99,99%. Estos resultados muestran que los extractos crudos de hojas de cannabis tienen actividad antiviral.

Palabras clave: antivirales; extractos naturales; cannabis.

Introducción



El cannabis es una de las plantas más antiguas cultivadas por el hombre por el valor de sus fibras, extracción de aceite y para preparaciones medicinales.[1] Su aplicación terapéutica es un desafío, tal es así que en Argentina la Ley 27.350 [2] regula la investigación médica y científica del uso medicinal de la planta y sus derivados para comprobar los beneficios y efectos adversos de su uso. La planta de Cannabis contiene una clase única de compuestos terpenofenólicos (los cannabinoides o fitocannabinoides), con un total de 565 constituyentes, de los cuales 120 son fitocannabinoides.[3] Los cannabinoides con mayor actividad biológica son el delta 9 tetrahidrocannabinol (9-THC) y el cannabidiol (CBD). Los cultivadores y la naturaleza han creado formas híbridas de Cannabis sativa y Cannabis indica a lo largo de la historia para equilibrar, o potenciar los efectos energizantes y calmantes obteniendo distintas proporciones de THC y CBD. Además, la planta genera numerosos metabolitos secundarios, muchos de los cuales son terpenos que contribuyen sinérgicamente en los beneficios terapéuticos del cannabis, al igual que algunos flavonoides.

Debido a la necesidad de encontrar nuevas moléculas con actividad antiviral y

sabiendo que las plantas son una fuente de principios bioactivos, en nuestro laboratorio, trabajamos con un extracto parcialmente purificado de hojas de Melia azedarach L., Meliacina (MA), que presenta un amplio espectro de actividad antiviral.[4] En el año 2003, su purificación guiada por bioensayo condujo al aislamiento del limonoide 1-cinamoil-3,11-dihydroxymeliacarpin (CDM) que es un tetranortriterpenoide.[5] Actualmente estamos trabajando con extractos de plantines de Melia azedarach L. micropropagados in vitro, con muy buena actividad antiviral.[6] Mediante la colaboración con el Dr. Guillermo Schmeda-Hirschmann del Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca, Chile, evaluamos la actividad antiviral de compuestos terpenoides naturales y semisintéticos.[7-8] Primeramente estudiamos un grupo de diterpenos de los cuales la jatrolona natural 2A aislada de raíces de Jatropha isabelii y la jatrolona semi-sintética 5B, así como el derivado 9C del ácido carnósico obtenido de hojas de Rosmarinus officinalis L, presentaron actividad antiviral contra HSV-1 [9] y contra Adenovirus 5 (AdV5), con muy baja citotoxicidad.[10] Colaborando con el mismo grupo, también hemos evaluado una serie de 16 compuestos híbridos



realizados por click chemistry, fusionando distintos sesquiterpenos, diterpenos o triterpenos entre ellos.[11] Encontramos que algunos de los compuestos además de inhibir la replicación de AdV5 presentan un perfil antiinflamatorio.[12]

Ha habido un debate considerable sobre si el cannabis tiene beneficios terapéuticos adicionales en comparación con los cannabinoides puros. Sin embargo, McPartland y Russo proponen la teoría del efecto séquito, por la que la asociación entre las diversas moléculas producidas por el cannabis crea una sinergia que potencia las propiedades terapéuticas de cada compuesto. Así, cannabinoides, terpenos, flavonoides y otras sustancias interactúan consiguiendo una mayor efectividad en el tratamiento de un elevado número de síntomas.[13]

Objetivos

El objetivo general consiste en estudiar las propiedades antivirales de los extractos vegetales de Cannabis sativa L. y Cannabis indica teniendo en cuenta la gran diversidad de terpenos que los componen.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1- Obtener los extractos etanólicos de hojas de Cannabis sativa L. y Cannabis indica.

2- Evaluar la actividad antiviral de los extractos vegetales obtenidos contra HSV-1 y HSV-2.

Materiales y Métodos

Obtención de la materia prima

Se utilizaron las hojas de tres variedades distintas de Cannabis provistas por una ONG.

Las variedades utilizadas fueron Critical Cure: Cannabis indica dominante (CBD y THC 1:1); Medikit: 50% Cannabis sativa y 50% Cannabis indica (variedad CBD sin THC) y Strawberry lemonade: Cannabis sativa L. dominante (20% de THC).

Extracción con etanol

Se realizaron extractos con etanol porque tanto los cannabinoides como los terpenos presentes en las hojas se recuperan bien de esta manera.

Para obtener los extractos, se pesaron 15mg de hojas, que se rompieron con una cuchara dentro de un tubo falcon, al que se le agregó 45ml de etanol absoluto. El tubo se colocó en un agitador orbital a 400rpm durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 2000rpm durante 30 segundos y se colectó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron dos extracciones más. Los extractos se denominaron M, SL y CC2.



Debido a que no se pudo evaporar todo el etanol, se trabajó con diluciones de los extractos mayores a 1/200 para descartar los posibles efectos causados por el etanol.

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular Vero (células de riñón de Mono Verde Africano) que fueron cultivadas en botellas T25, con medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (MEM 5%) y 50µg/ml de gentamicina. Las células fueron incubadas a 37°C y mantenidas en MEM suplementado con 1,5% de suero fetal bovino (MEM 1,5%) luego de alcanzar la monocapa.

Virus

Se utilizaron los virus HSV-1 (Herpes simplex virus tipo 1) cepa KOS, HSV-1 YK608 (Herpes simplex tipo 1 modificado genéticamente que expresa la proteína de cápside VP26, de localización nuclear, la proteína del tegumento VP22 de expresión citoplasmática. Fusionadas con proteínas fluorescentes verde y roja) y HSV-2 cepa G.

Los stocks de virus se hicieron en monocapas de células Vero crecidas en botellas T25 y se inoculó 1ml del virus con una m.i de 0,01. Se dejó adsorber en

estufa gaseada durante una hora, agitando transcurridos treinta minutos. Finalizada la hora de incubación, se extrajo el inóculo por volcado y se agregaron 5ml de MEM 1,5%. Se dejó en estufa a 37°C con 4% CO₂ durante 48hs.

Terminado el periodo de incubación, se hicieron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisar las células. Por último, se cosechó el virus total, se fraccionó para su almacenamiento a -70°C y se tituló por el método de unidades formadoras de placas de lisis.

Citotoxicidad

La citotoxicidad fue evaluada en células Vero, éstas se incubaron en microplaca de 96 pocillos durante 48 horas con diluciones seriadas al medio de los extractos provenientes de las hojas de cannabis. Como control celular se dejaron pocillos sin tratar. Luego del periodo de incubación se realizó el ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para cada dilución de los distintos extractos se calculó el porcentaje de viabilidad comparando la DO media con el control de células, que se tomó como el 100% de viabilidad.

Actividad antiviral



Se evaluó la actividad antiviral de los extractos frente a HSV-1 y HSV-2 en células Vero, por medio de ensayos de inhibición del rendimiento viral.

Las células fueron crecidas en microplacas de 96 pocillos con medio mínimo esencial Earle (MEM) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Posteriormente, se infectaron con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,1 y 0,01 de cada una de las cepas de virus y se dejaron incubar durante 24hs en estufa a 37°C con CO₂ al 5%. Las células infectadas fueron tratadas con dos concentraciones de cada uno de los extractos, 1/500 y 1/1000 y se dejaron pocillos sin tratar para usar como control de virus. Pasadas las 24hs de incubación, se procedió a conservar la microplaca a -80°C.

Los títulos virales se calcularon por formación de placas de lisis bajo metilcelulosa en microplacas de 24 pocillos, incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante 48hs. Para hacer el recuento de unidades formadoras de placas de lisis, se fijaron las células con formol al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 1%.

Se determinó la CE₅₀, concentración que reduce el rendimiento viral en un 50% con respecto a las células infectadas sin tratar.

Infección con HSV-1 YK608

Se observaron al microscopio la fluorescencia roja y verde de las proteínas presentes en el virus. Las células Vero fueron crecidas sobre cubreobjetos, en microplacas de 24 pocillos con medio mínimo esencial Earle (MEM) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y cultivadas en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 24hs. Transcurridas las 24hs se infectaron con HSV-1 YK608 con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,1 y fueron tratadas o no con los extractos (se usó la concentración 1/1000 de cada extracto) se incubaron en estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 24hs. Posteriormente, se fijaron las células con metanol, se tiñeron los núcleos con DAPI y los cubreobjetos se montaron para su observación en el microscopio de fluorescencia.

Resultados y discusión

Se trabajó con tres extractos de hojas provenientes de tres variedades distintas de Cannabis: Medikit (M), Strawberry Lemonade (SL) y Critical Cure (CC2) con distintas proporciones de THC y CBD.

Se evaluó la inhibición del rendimiento viral para cada extracto y para cada multiplicidad de infección, tanto para HSV-1 como para HSV-2. En las Figuras 1 y 2

se muestran los títulos obtenidos al tratar las células con las distintas concentraciones de los extractos y el porcentaje de inhibición obtenido.

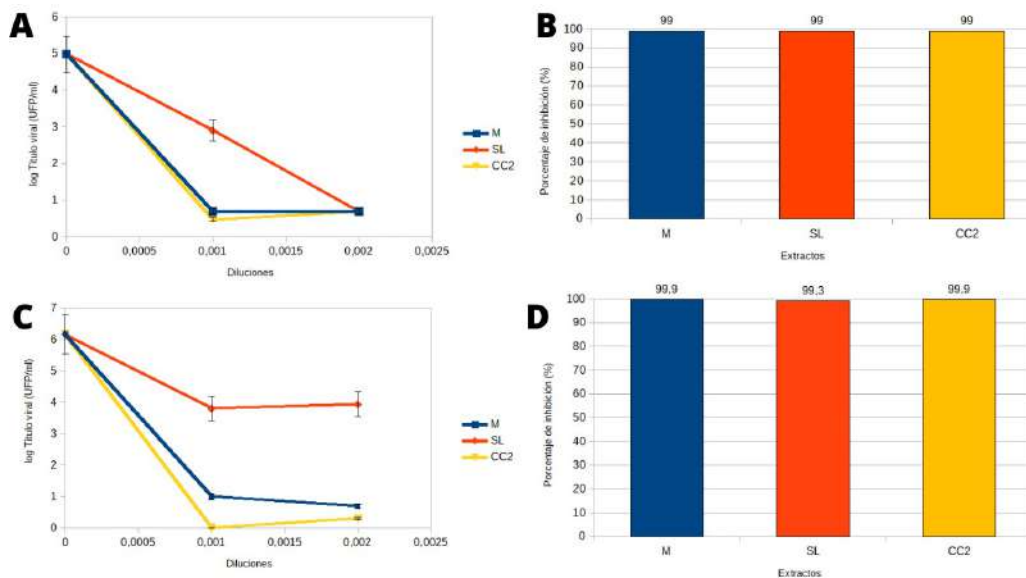


Figura 1: Células Vero infectadas con HSV-1 Kos tratadas con diluciones seriadas de los extractos. El título fue obtenido luego de 24hs de tratamiento por la técnica de formación de placas. HSV-1 Kos m.i 0,01 (A); Porcentaje de inhibición obtenido comparando las células sin tratar con los distintos tratamientos HSV-1 Kos m.i 0,01 (B); HSV-1 Kos m.i 0,1 (C); Porcentaje de inhibición obtenido comparando las células sin tratar con los distintos tratamientos HSV-1 Kos m.i 0,1 (D).

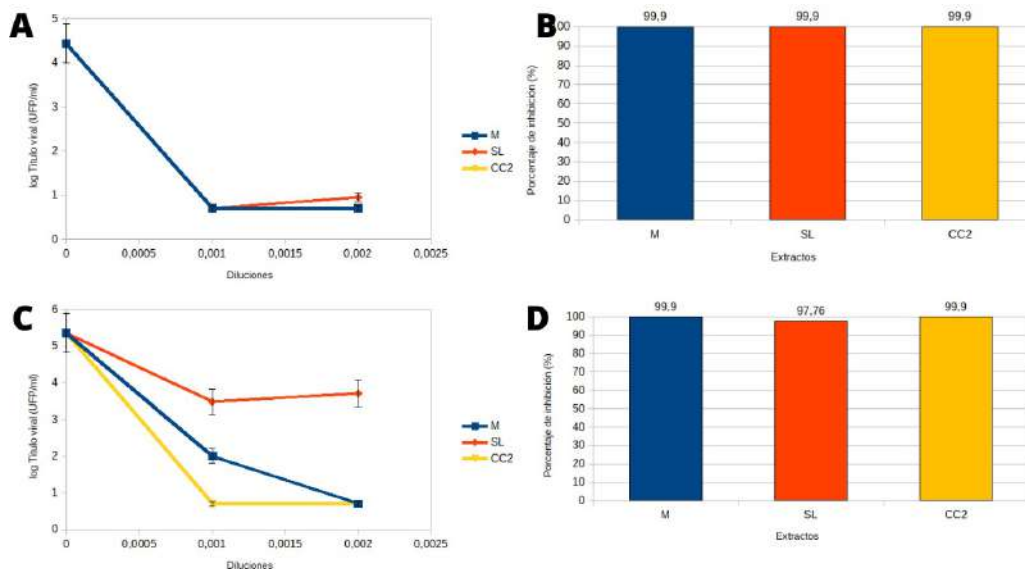


Figura 2: Células Vero infectadas con HSV-2 G tratadas con diluciones seriadas de los extractos. El título fue obtenido luego de 24hs de tratamiento por la técnica de formación de placas. HSV-2 G m.i 0,01 (A); Porcentaje de inhibición obtenido comparando las células sin tratar con los distintos tratamientos HSV-2 G m.i 0,01 (B); HSV-2 G m.i 0,1 (C); Porcentaje de inhibición obtenido comparando las células sin tratar con los distintos tratamientos HSV-2 G m.i 0,1 (D).



Los resultados obtenidos muestran que todos los extractos, en las concentraciones utilizadas, fueron capaces de reducir la replicación de los virus HSV-1 y HSV-2. En ninguno de los casos se observó citotoxicidad.

Este efecto se ve tanto cuando se usa una m.i de 0,01 como cuando se usa la de 0,1. Se observa que los extractos M y CC presentan una inhibición levemente mayor que el extracto SL.

Seguidamente las células Vero fueron infectadas con el virus recombinante HSV-1 YK608 a una m.i de 0,1 y tratadas con una dilución 1/1000 de cada uno de los extractos.

La Figura 3 muestra las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia.

Como se puede observar en el control de virus, un alto porcentaje de las células expresa la proteína VP26 en el núcleo así como también la proteína VP 22 en el citoplasma celular. El tratamiento con M y CC2 disminuye significativamente el número de células infectadas así como también la intensidad de la fluorescencia. Mientras que el tratamiento con SL presenta menor intensidad de fluorescencia, aunque el número de células infectadas es mayor al de los tratamientos con M y CC2.

Conclusión

Los resultados preliminares presentados en este trabajo muestran que los extractos etanólicos de hojas de Cannabis presentan actividad antiviral contra los virus HSV-1 y HSV-2. Asimismo las concentraciones de los extractos utilizadas no presentaron citotoxicidad en las células Vero. Los porcentajes de inhibición del rendimiento viral obtenidos fueron muy altos, aunque no se observaron grandes diferencias entre los extractos provenientes de hojas de plantas con distinta genética. Sin embargo, las diferencias observadas podrían estar relacionadas con la cantidad de CBD, ya que tanto M como CC2, que son los extractos con mayor efecto, tienen mayor proporción de CBD que SL. Sin embargo, para poder confirmar esta teoría se debería obtener el perfil químico de cada uno de los extractos.

Los resultados obtenidos son alentadores para seguir trabajando en esta línea de investigación.

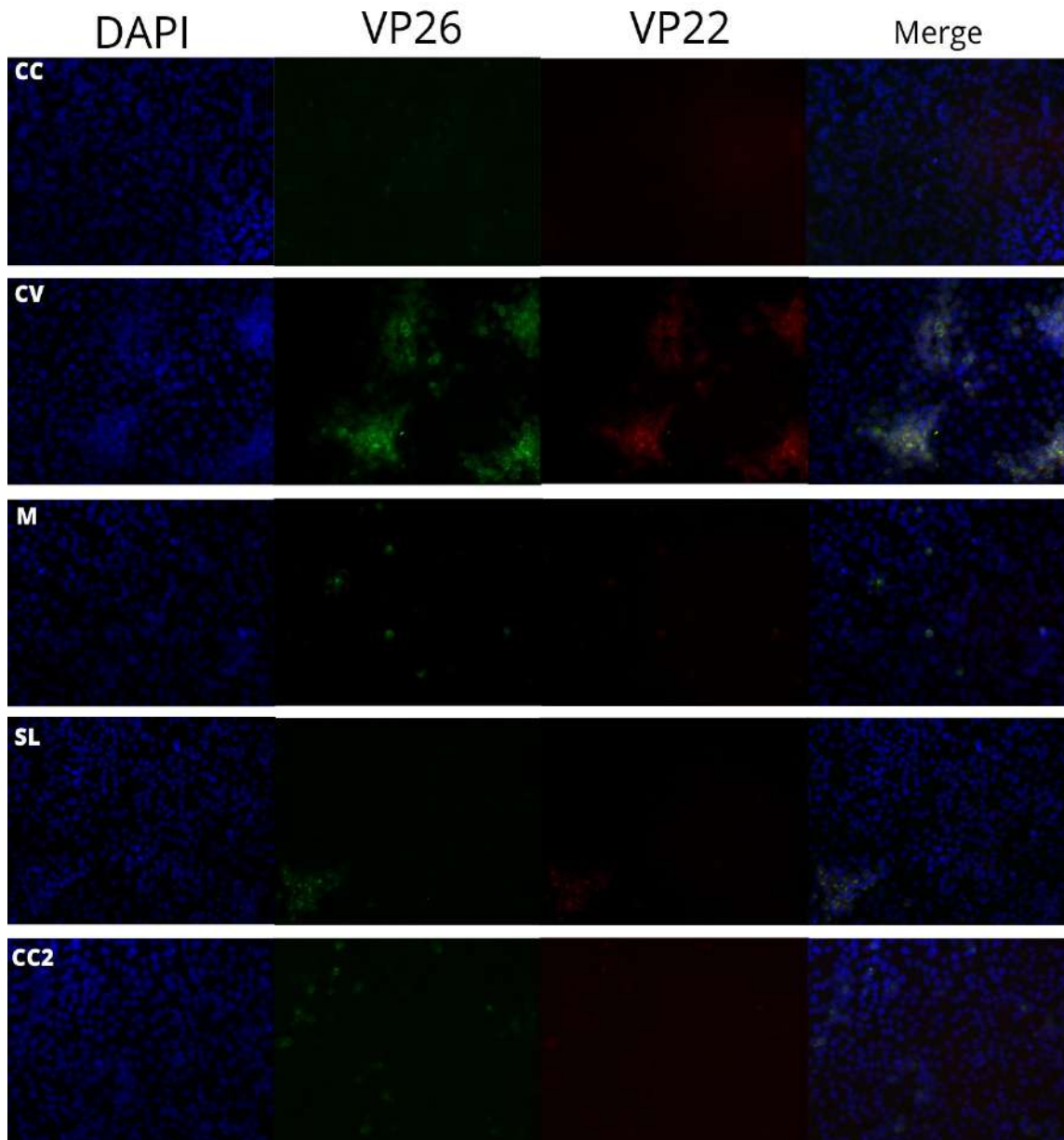


Figura 3: Células Vero infectadas con HSV-1 YK608. Las células fueron tratadas con una dilución 1/1000 de cada uno de los extractos durante 24hs. Se tiñeron con DAPI y se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando distintos filtros sobre el mismo campo y se fotografiaron. Aumento 40X.

DAPI+VP26+VP22 corresponde a la superposición de las tres imágenes.

CC: control de células; **CV:** control de virus; **M, SL, CC2** células tratadas con el extracto indicado.



Bibliografía

[1] Ranalli P, Candilo MD, Mandolino G, Grassi G and Carboni A. Hemp for sustainable agricultural systems. *Agro. Industry*, (1999) 10: 33-38.

[2] Investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados. Ley 27350. Reglamentación.

<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/decreto-883-2020-344131>

<https://www.argentina.gob.ar/justicia/derechofacil/leysimple/cannabis-medicinal>

[3] Chandra S, Lata H, ElSohly MA, Walker LA, Potter D. Cannabis cultivation: Methodological issues for obtaining medical-grade product. *Epilepsy & Behavior* 70 (2017) 302–312

[4] Erina Petrera. Antiviral and immunomodulatory properties of Meliaceae family. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 2015; 5: 241-254.

[5] Alché L.E., Ferek G.A., Meo M., Coto C.E., Maier M.S. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Z Naturforsch C*. 58(3-4): 215-219 (2003).

[6] CA. Montalbetti, E Galdeano, LE. Alché, A Zelada, E Petrera. Actividad antiviral de extractos de plantines de *Melia*

azedarach L. micropropagados in vitro. XIII Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires 29 de noviembre a 1 de diciembre de 2021.

[7] Pertino MW, Verdugo V, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G. Synthesis and antiproliferative activity of some novel triazole derivatives from dehydroabietic acid. *Molecules*. 2014 Feb 21;19(2):2523-35.

[8] Pertino MW, Theoduloz C, Butassi E, Zacchino S, Schmeda-Hirschmann G. Synthesis, antiproliferative and antifungal activities of 1,2,3-triazole-substituted carnosic Acid and carnosol derivatives. *Molecules*. 2015 May 14;20(5):8666-86.

[9] Bueno CA, Michelini FM, Pertino MW, Gómez CA, Schmeda-Hirschmann G, Alché LE. Natural and semisynthetic diterpenoids with antiviral and immunomodulatory activities block the ERK signaling pathway. *Med Microbiol Immunol*. (2015) 204(5): 575-84.

[10] Petrera E, Bidart JE, Pertino MW, Schmeda-Hirschmann G, Alché LE. Diterpenoides naturales y semi-sintéticos con actividad antiviral y anti-inflamatoria frente a la replicación de Adenovirus in vitro. XII Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 26 al 28 de septiembre de 2017.



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

[11] Pertino MW, Petrera E, Alché LE, Schmeda-Hirschmann G. Synthesis, Antiviral and Cytotoxic Activities of Novel Hybrid Molecules between Terpenes Prepared by Click Chemistry. *Molecules* 2018, 23, 1343; doi:10.3390/molecules23061343, 12 pp

[12] Petrera E, Battini L, Pertino MW, Schmeda-Hirschmann G, Alché LE. Actividad antiviral e inmunomoduladora de terpenos fusionados sintéticos sobre la replicación de adenovirus in vitro. IV International Clinical Virology Symposium and Advances in Vaccines. Buenos Aires, 24-26 de Octubre de 2016.

[13] Russo EB, McPartland JM. Cannabis is more than simply delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Feb;165(4):431-2; author reply 433-4. Epub 2002 Dec 19.

Estudio estructural del alcaloide natural quinina basado en cálculos DFT



C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Estudio estructural del alcaloide natural quinina basado en cálculos DFT

Autor: Pereyra, Leonardo Augusto; leonardopereyra93@gmail.com

Profesor guía: Castillo, María Victoria; vitimol@hotmail.com

Universidad Nacional de Tucumán

RESUMEN

En este trabajo se realizó el estudio estructural teórico del compuesto denominado quinina, la cual presenta actividades antimicrobianas útiles para el tratamiento contra bacterias y virus, además de potentes propiedades anticancerígenas. Se realizaron cálculos teóricos derivados de la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) a fin de estudiar las propiedades estructurales de la quinina en fase gaseosa utilizando el método híbrido B3LYP y el conjunto de funciones base 6-311++G**. Se determinaron los parámetros geométricos, cargas atómicas, órdenes de enlace, mapas de potenciales electrostáticos y parámetros topológicos. Los resultados obtenidos nos permitieron predecir cuál de las dos estructuras estudiadas presenta mayor estabilidad.

Palabras clave: quinina, cálculos DFT, propiedades estructurales.

INTRODUCCIÓN

La quinina es un alcaloide natural obtenido de la corteza del árbol del género *Cinchona* que pertenece al grupo de fármacos aril amino alcohol y cuya fórmula molecular es $C_{20}H_{24}N_2H_2$. Este compuesto se estudió como parte de una serie de estudios estructurales y vibracionales sobre compuestos heterocíclicos que contienen diferentes anillos en sus estructuras. Como todos los alcaloides de la cinchona, su molécula contiene dos fracciones: una fracción de quinuclidina y una fracción de quinolina. La quinina presenta actividades antimicrobianas

útiles para el tratamiento contra bacterias y virus. Por ejemplo, se ha demostrado in vitro que esta sustancia tiene actividad antiviral contra los virus del dengue, el herpes simple y la influenza A [1-3]. Por otro lado, los estudios de Krishnavenil y Suresh revelaron que la quinina tiene potentes propiedades anticancerígenas, inhibe eficazmente la proliferación celular y la actividad de la proteasa, induciendo la muerte celular en las células cancerosas [4].

Por otra parte, este compuesto sigue siendo un fármaco antipalúdico importante casi 400 años después de que se

documentara su eficacia por primera vez. Sin embargo, su uso continuado se ve desafiado por su mala tolerabilidad [5-8].

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos que se transmiten a las personas a través de las picaduras de mosquitos *Anopheles* hembra infectados, la cual es prevenible y curable. En 2019, hubo un estimado de 229 millones de casos de malaria en todo el mundo. La Región de África de la OMS sigue soportando una parte desproporcionadamente alta de la carga mundial de paludismo. En 2019, la región albergaba el 94% de todos los casos y muertes por malaria. Seis países representaron aproximadamente la mitad de todas las muertes por paludismo en todo el mundo: Nigeria (23 %), la República Democrática del Congo (11 %), la República Unida de Tanzania (5 %), Burkina Faso (4 %), Mozambique (4 %) y Níger (4%) [9].

Debido a su importancia farmacéutica, la quinina ha sido el objeto principal en los estudios que se centran en los alcaloides presentes en la corteza del quino.

Con el fin de obtener una mejor comprensión de las propiedades estructurales de la Qn, Sen y col. realizaron el primer estudio informado hasta el momento sobre la quinina neutra en fase gaseosa [10].

OBJETIVO

En este contexto, se propone para el alcaloide quinina, realizar estudios estructurales basados en los métodos teóricos derivados de la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) con el fin de predecir sus propiedades estructurales, electrónicas y topológicas, ya que hasta la fecha no han sido reportadas en la literatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detalles computacionales

Las estructuras tridimensionales iniciales de quinina se tomaron de Ref [11,12] y se modelaron con el programa *GaussView 5.0* [13]. Luego se optimizaron utilizando el método híbrido B3LYP y el conjunto de funciones base 6-311++G** incluido en el programa Gaussian 09 [14]. La molécula de quinina contiene dos fracciones: una fracción de quinuclidina (tres anillos fusionados de seis miembros) y una fracción de quinolina. Se presentan en Fig. 1 las estructuras teóricas de los dos conformeros estudiados y la numeración de sus átomos.

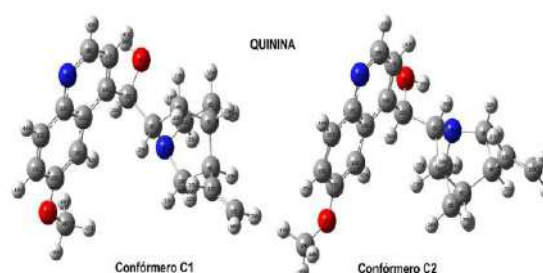


Fig. 1: Estructuras teóricas y numeración de átomos para los conformeros de quinina

En este trabajo se estudiaron dos tipos de cargas: las cargas atómicas naturales (NPA), calculadas utilizando el programa NBO [15], y las cargas de Merz-Kollman (MK) [16]. A partir de las cargas MK, se calcularon los potenciales electrostáticos moleculares. La naturaleza de los diferentes tipos de enlace presentes en ambas estructuras se investigó de manera sistemática y cuantitativamente por medio del estudio de orbitales naturales de enlace (NBO) [15], mientras que las propiedades topológicas se analizaron mediante el empleo de la teoría de átomos en moléculas de Bader (AIM) [17,18]. Se compararon las diferencias energéticas entre los orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) y los desocupados de menor energía (LUMO) para las dos estructuras de quinina y a partir de ellos se predijo la reactividad de estas [19]. Además, se calcularon un conjunto de importantes descriptores usando los valores de la diferencia energética (GAP) entre los orbitales moleculares fronteras [20,21].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio estructural

Los valores de energía total (E) y momento dipolar (μ) para los dos conformeros de la quinina, en fase gas, fueron calculados a partir del método híbrido B3LYP y el conjunto de funciones

base 6-11++G**. Mientras que los valores de volumen (V) y su diferencia (ΔV) se calcularon con el programa Moldraw [22]. Los datos anteriormente mencionados se presentan en la Tabla.1.

Los resultados muestran en primer lugar, que la energía del conformero 2 (C2) en fase gas es más baja que la correspondiente al conformero 1 (C1) mientras que C1 presenta un menor valor de momento dipolar con respecto a C2. Por otro lado, la variación de volumen entre ambos conformeros es de 6 Å³.

En la Fig. 2 se puede observar la magnitud y orientación del vector momento dipolar en ambos conformeros.

Tabla 1. Energía Total, Momento Dipolar y Volumen Molecular de quinina en fase gas

Propiedad	Método B3LYP/6-311++G**	
	C1	C2
E (Hartrees)	-1036,758207	-1036,760039
μ (D)	2,90	4,48
V (Å ³)	350,6	356,6
ΔV (Å ³)	6,0	

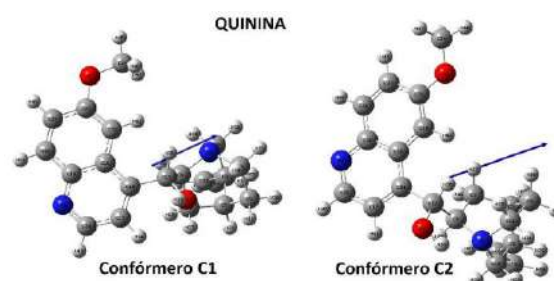


Fig. 2: Vector Momento dipolar en conformeros de quinina

La variación en magnitud y orientación del vector momento dipolar, probablemente se deba a la orientación del grupo metoxi,

que es diferente en ambas estructuras. La estructura C2, posiblemente se predice con mayor estabilidad, respecto a C1 debido a su elevado valor de momento dipolar, en concordancia con los valores de energía presentados en Tabla 1. Los parámetros geométricos calculados en fase gas para quinina con el método B3LYP/6-311++G** se compararon con los valores experimentales obtenidos por difracción de rayos X por Hisaki y col. [23], por medio de la desviación cuadrática media (RMSD), encontrándose que se reproducen mejor los valores de longitudes de enlace (0,18 y 0,10 Å) que los valores de los ángulos de enlace (1,2° y 1,9°) y ángulos diedros (129,8° y 181,5°). Teniendo en cuenta las propiedades biológicas de la quinina, se estudió la estabilidad de ambas estructuras mediante análisis NBO y AIM. Se analizaron las cargas atómicas NPA, órdenes de enlace expresados en índices de Wiberg y los potenciales electrostáticos moleculares (MEP), para identificar los posibles sitios electrofílicos y nucleofílicos. Los resultados se resumen en Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 3. Cargas NPA y MK de quinina

Átomo	Cargas NPA		Cargas MK	
	C1	C2	C1	C2
O1	-0,965	-0,763	-0,560	-0,577
O2	-0,537	-0,523	-0,331	-0,354
N3	-0,559	-0,535	-0,672	-0,397
N4	-0,443	-0,442	-0,789	-0,745
C5	-0,201	-0,244	0,230	0,178
C6	-0,184	-0,090	0,406	0,073
C7	-0,418	-0,486	-0,346	-0,363
C8	-0,278	-0,308	0,138	0,202
C9	-0,403	-0,483	-0,277	-0,218
C10	-0,166	-0,255	-0,049	-0,144
C11	-0,188	-0,275	0,207	0,133
C12	0,851	0,096	0,172	-0,169
C13	-0,167	-0,217	-0,225	-0,177
C14	-0,107	-0,007	0,327	0,667
C15	-0,376	-0,423	-0,432	-0,460
C16	-0,092	-0,069	-0,499	-0,367
C17	-0,257	-0,260	-0,567	-0,661
C18	0,165	0,154	0,770	0,725
C19	-0,304	-0,272	-0,097	-0,387
C20	0,065	0,034	0,514	0,431
C21	-0,167	-0,193	-0,313	-0,398
C22	0,337	0,324	0,323	0,448
C23	-0,219	-0,302	-0,251	-0,196
C24	-0,205	-0,316	-0,032	-0,014
H25	0,212	0,259	-0,007	0,002
H26	0,200	0,245	0,038	0,114
H27	0,219	0,241	0,113	0,141
H28	0,206	0,250	0,059	0,078
H29	0,199	0,246	0,042	0,022
H30	0,196	0,241	0,043	0,066
H31	0,206	0,236	0,078	0,042
H32	0,198	0,238	0,090	0,086
H33	0,191	0,239	0,074	0,099
H34	0,211	0,238	0,016	0,053
H35	0,188	0,235	0,046	0,015
H36	-0,036	0,208	0,047	0,210
H37	0,184	0,220	0,153	0,150
H38	0,466	0,493	0,369	0,359
H39	0,181	0,220	0,165	0,185
H40	0,190	0,209	0,179	0,172
H41	0,218	0,252	0,169	0,232

H42	0,211	0,239	0,069	0,147
H43	0,183	0,219	0,022	0,049
H44	0,220	0,250	0,177	0,192
H45	0,220	0,240	0,170	0,152
H46	0,193	0,229	0,092	0,094
H47	0,173	0,204	0,076	0,059
H48	0,172	0,202	0,073	0,053

El análisis de las cargas NPA y MK muestra que dichas son completamente diferentes, destacándose aquellas presentes en los átomos de O1 del grupo OH. Las cargas NPA más negativas y positivas se observan sobre los átomos de O del grupo oxhidrilo y C12 unido al grupo OH respectivamente, siendo mayores en C1, mientras que los valores más negativos de cargas MK se observan sobre el átomo de N4 presente en el anillo quinolínico de ambas estructuras.

De la comparación de los potenciales electrostáticos moleculares, se observó la siguiente tendencia en los valores obtenidos: O1>O2>N4>N3. Los valores mayores se dan en el átomo N3 de la estructura C2 y N4 de la C1, y aquellos sobre ambos átomos de O en la estructura C1.

Tabla 4. Índices de Wiberg y potenciales electrostáticos de quinina

Átomo	Potenciales electrostáticos		Índices de Wiberg	
	C1	C2	C1	C2
O1	-22,354	-22,380	1,681	1,782
O2	-22,327	-22,330	2,133	2,121
N3	-18,406	-18,390	3,116	3,095
N4	-18,410	-18,415	3,086	3,075
C5	-14,768	-14,758	3,973	3,944
C6	-14,737	-14,734	4,028	3,928
C7	-14,780	-14,770	3,936	3,893
C8	-14,767	-14,758	3,985	3,957

C9	-14,783	-14,770	3,936	3,900
C10	-14,750	-14,741	3,906	3,862
C11	-14,758	-14,741	3,897	3,865
C12	-14,703	-14,711	3,355	3,886
C13	-14,776	-14,770	3,981	3,961
C14	-14,749	-14,754	4,095	4,003
C15	-14,786	-14,781	3,939	3,914
C16	-14,750	-14,753	4,020	3,991
C17	-14,768	-14,775	3,962	3,937
C18	-14,738	-14,742	3,988	3,989
C19	-14,767	-14,773	3,955	3,941
C20	-14,743	-14,748	3,950	3,932
C21	-14,770	-14,770	3,962	3,946
C22	-14,701	-14,704	3,906	3,910
C23	-14,767	-14,764	3,961	3,940
C24	-14,712	-14,711	3,770	3,733
H25	-1,132	-1,123	0,958	0,935
H26	-1,118	-1,115	0,965	0,944
H27	-1,131	-1,119	0,956	0,945
H28	-1,129	-1,120	0,960	0,939
H29	-1,128	-1,120	0,965	0,942
H30	-1,132	-1,119	0,964	0,944
H31	-1,134	-1,120	0,960	0,946
H32	-1,123	-1,115	0,963	0,945
H33	-1,122	-1,113	0,966	0,945
H34	-1,135	-1,115	0,958	0,945
H35	-1,130	-1,114	0,967	0,946
H36	-1,109	-1,118	1,028	0,960
H37	-1,112	-1,106	0,970	0,954
H38	-0,989	-1,017	0,788	0,760
H39	-1,112	-1,108	0,970	0,953
H40	-1,113	-1,107	0,967	0,958
H41	-1,099	-1,108	0,961	0,940
H42	-1,091	-1,098	0,968	0,945
H43	-1,110	-1,115	0,969	0,954
H44	-1,105	-1,106	0,955	0,940
H45	-1,098	-1,092	0,954	0,944
H46	-1,097	-1,097	0,964	0,948
H47	-1,098	-1,098	0,973	0,961
H48	-1,097	-1,098	0,973	0,962

Las diferentes coloraciones presentes en los mapas de potenciales electrostático (MEP), nos permiten predecir qué regiones son propensas a ataques nucleofílicos y cuales electrofílicos. Como se puede observar en Fig.3, en la estructura C1, se observa una región de color azul sobre el átomo de H38 que corresponden a un sitio electrofílico, mientras que una región de color rojo

sobre el átomo de N4 que representa un sitio nucleofílico. En el confórmero C2, se observan dos regiones de color rojo que nos indican entornos nucleofílicos sobre los átomos de O1 y N4.

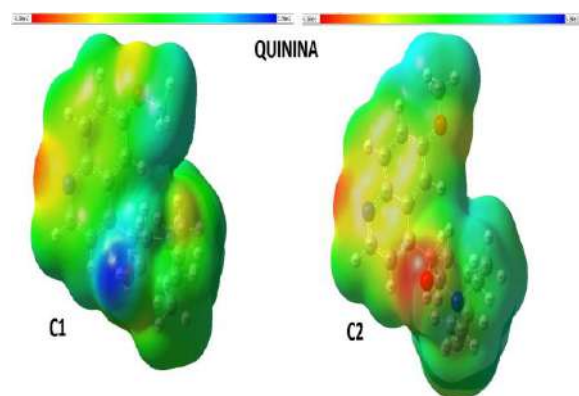


Fig. 3. Superficies de potenciales electrostáticos moleculares para los confórmeros de quinina en fase gas

Análisis topológico de la densidad de carga electrónica (AIM)

La estabilidad de este alcaloide se estudió mediante las propiedades topológicas calculadas con el programa AIM2000 [17,18] y analizando las energías de interacción donor-aceptor computadas con el programa NBO [15]. De esta forma se calcularon las densidades de carga electrónicas (ρ) y los valores del Laplaciano de la densidad electrónica $\nabla^2\rho(r)$ en los puntos críticos de enlace. Los valores calculados se presentan en Tabla 5 y Tabla 6.

La presencia de nuevos puntos críticos de anillo (BCP) y enlaces hidrógeno, soportan en parte, la existencia ambos en

fase gaseosa, presentando mayor estabilidad la estructura C2 de quinina.

Tabla 5. Análisis de nuevos Puntos críticos de enlace y anillo (BCP y RCP) para el confórmero C1 de quinina.

CONFÓRMERO C1				
Nuevo enlace	H36---H42	H34---O1	H36---H42	H34---O1
	NRCP1	NRCP2	NBCP1	NBCP2
$\rho(r)$	0,0112	0,0094	0,0116	0,0124
$\nabla^2\rho(r)$	0,0544	0,0472	0,0445	0,0424
λ_1	-0,0082	-0,0061	-0,0099	-0,0118
λ_2	0,0078	0,0152	-0,0057	-0,0104
λ_3	0,0548	0,0381	0,0602	0,0646
λ_1/λ_3	-0,1492	-0,1599	-0,1651	-0,1820

Tabla 6. Análisis de nuevos Puntos críticos de enlace y anillo (BCP y RCP) para el confórmero C2 de quinina.

CONFÓRMERO C2						
Nuevo enlace	H36---H42	H27---H42	H27---C19	H38---N3	H36---H42	H38---N3
	NRCP2	NRCP1	NRCP3	NRCP4	NBCP1	NBCP2
$\rho(r)$	0,0113	0,0052	-0,0092	0,0235	0,0124	0,0260
$\nabla^2\rho(r)$	0,0562	-0,0208	0,0197	-0,0942	0,0434	0,0868
λ_1	-0,0092	-0,0019	-0,0009	-0,0235	-0,0123	-0,0313
λ_2	0,0122	0,0079	0,0043	0,0319	0,0083	-0,0232
λ_3	0,0532	0,0137	0,0163	0,1127	0,0640	0,1413
λ_1/λ_3	-0,1727	-0,1393	-0,0576	-0,2089	-0,1920	-0,2212

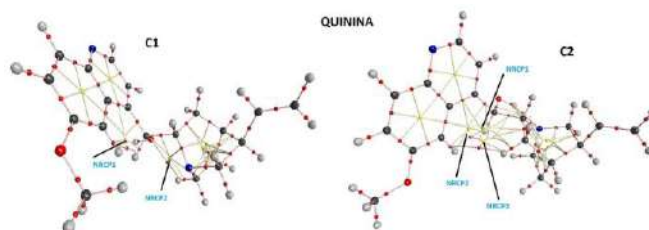


Fig. 4. Gráficas moleculares AIM para los confórmeros de quinina

Estudios HOMO – LUMO

Los confórmeros de la quinina tienen pares libres en ambos átomos de O y en los átomos de N, los cuales justifican muchas de las propiedades químicas y biológicas evidenciadas por estudios anteriores. Es por ello que se calcularon los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO con el fin de conocer la influencia de aquellos átomos en las propiedades de la quinina y, también para predecir sus reactividades. Así mismo, se calcularon una serie de descriptores tales como, potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza global (η), suavidad global (S), índice de electrofilicidad global (ω) e índice de nucleofilicidad (ε). La comparación de estos resultados se observa en Tabla 7.

Tabla 7. Orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO para Quinina a nivel B·LYP 6-311++G**

	C1	C2
HOMO (eV)	-5,949	-6,022
LUMO (eV)	-1,700	-1,677
GAP (eV)	-4,249	-4,344
Descriptores		
$X = - [E(LUMO) - E(HOMO)]/2$ (eV)	3,8245	3,8495
$\mu = [E(LUMO) + E(HOMO)] / 2$ (eV)	-3,8245	-3,8495
$\eta = [E(LUMO) - E(HOMO) / 2]$ (eV)	2,1245	2,1725
$S = \frac{1}{2} \eta$ (eV)	0,2353	0,2301
$\omega = \mu^2 / 2\eta$ (eV)	3,4424	3,4105
$E = \mu^* \eta$	-1,8002	-1,7719

Se puede observar en Tabla 7 que los valores de GAP, en términos de valor absoluto, son mayores en C2, prediciendo

su mayor estabilidad y alta dureza química. La forma C1 de la quinina, presenta mayor valor de electrofilicidad, en concordancia con el MEP presentado en Fig. 3 donde se observa un sitio electrofílico.

CONCLUSIONES

- Se determinaron las estructuras teóricas de los dos confórmeros de quinina con el método B3LYP/6-311++G**.
- Los estudios mediante las cargas NPA y MK, potenciales electrostáticos órdenes de enlace, NBO y AIM, soportan la elevada estabilidad de C2.
- Los estudios de los orbitales fronteras HOMO y LUMO, predijeron para la estructura C2 de quinina, la mayor estabilidad en fase gaseosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Malakar, S., Sreelatha, L., Dechtawawat, T., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P.T., Chu, J.J.H. & Limjindaporn, T. (2018). Drug repurposing of quinine as antiviral against dengue virus infection. *Virus Research*, 255, 171-178.
2. Lobo, R., Baroni, A., Greco, R., Corrado, F., Ruocco, E., Tufano, M.A. & Ruocco, V. (2003). *Dermatology Online Journal*, 9, 3.



3. Marois, I., Cloutier, A., Meunier, I., Weingartl, H.M., Cantín, A.M. & Richter, M.V. (2014). Inhibition of Influenza Virus Replication by Targeting Broad Host Cell Pathways. *PLoS One*, 9(10), e110631.
4. Krishnavenil, M. & Suresh, K. (2015) *Int. J. Curr. Res. Acá.* 3(3) 169-78. ISSN: 2347-3215.
5. Castillo, M.V., Romano, E., Raschi, A.B., Yurquina, A. & Brandán, S.A. (2012). *Computational and Theoretical Chemistry*, 995, 43–48
6. Castillo, M.V., Iramain, M.A., Davis, L., Manzur, M.E. & Brandán, S.A. (2018). *J. Mol. Estructure.* 1154, 392-405.
7. Bilonda, M.K. & Mammino, L. *Molecules* (2017). Intramolecular Hydrogen Bonds in Conformers of Quinine and Quinidine: An HF, MP2 and DFT Study 22(2), 245.
8. Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine F. N., Rosenthal, P. J. & D’Alessandro U. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10, 144.
9. World Health Organization | World malaria report 2020 (2020). <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2020/report/en/>.
10. Sen, A., Bouchet, A., Lepere, V., Le Barbu-Debus, K., Scuderi, D., Piuze, F., & Zehnacker-Rentien, A. (2012). Conformational Analysis of Quinine and Its Pseudo Enantiomer Quinidine: A Combined Jet-Cooled Spectroscopy and Vibrational Circular Dichroism Study. *Journal of Physical Chemistry A*, American Chemical Society, 116 (32), 8334-8344.
11. Quinine structure (2022), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinine>
12. Crystal data for GF-Qn. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre (2022). www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. CCDC 865215.
13. A.B. Nielsen & A.J. Holder, *Gauss View 3.0, User’s Reference*, GAUSSIAN Inc., Pittsburgh, PA, 2009.
14. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F.



- Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, €O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski & D.J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian Inc, Wallingford CT, 2009.
15. E.D. Glendening, J.K. Badenhoop, A.D. Reed, J.E. Carpenter & F. Weinhold, NBO5.0, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, WI, 2001.
16. B.H. Besler, K.M. Merz Jr. & P.A. Kollman, Atomic charges derived from semiempirical methods. (1990). J. Comp. Chem. 11 431-439.
17. F. Biegler-Koning, J. Schönbohm & D. Bayles. (2001) AIM2000, a program to analyze and visualize atoms in molecules, J. Comput. Chem. 22-545.
18. R.F.W. Bader, Atoms in Molecules, a Quantum Theory, Oxford University Press, Oxford, 1990. ISBN: 0198558651.
19. R.G. Parr, R.G. Pearson, J. Am. Chem. Soc. 105, 1983, 7512–7516
20. R.G. Parr, S. Liu, L. Von Szentpaly, J. Am. Chem. Soc. 121, 1999, 1992
21. P. K. Chattaraj, D. R. Roy, S. Giri, S. Mukherjee, V. Subramanian, R. Parthasarathi, P., Bultinck, S. J. Van Damme, Chem. Sci., 119(5), 2007, 475-488.
22. Ugliengo, P., Viterbo, D. & Chiari G. (1993). MOLDRW: Molecular graphics on a personal computer. Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials.
23. Hisaki, I., Hiraishi, E., Sasaki, T., Orita, H., Tsuzuki, S., Tohnai, N., & Miyata, M. (2012). Crystal Structure of Quinine: The Effects of Vinyl and Methoxy Groups on Molecular Assemblies of Cinchona Alkaloids Cannot Be Ignored. Chem. Asian J. 7, 2607 – 2614.

FINANCIAMIENTO

- Proyecto PIUNT 26/D608.

Genisteina y su acción en el microambiente oviductal bovino



C.28 PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS Y SUS APLICACIONES

GENISTEINA Y SU ACCIÓN EN EL MICROAMBIENTE OVIDUCTAL BOVINO

Autor: Vella Milda A.; mvella22.mv@gmail.com

Tutores: Prof. García, Daniela; Valdecantos, Prof. Valdecantos Pablo;

Prof. Roldán Olarte, Mariela;
eugenia.roldanolarte@fbqf.unt.edu.ar

Universidad Nacional de Tucumán
RESUMEN

La genisteína (GNT), isoflavona presente en la soja, es un compuesto bioactivo que ejerce múltiples efectos, antiproliferativo, antimigracional, proapoptótico y antioxidante, sobre distintos tipos de células. Esta molécula ingresa al organismo y llega por el torrente sanguíneo a diferentes órganos, entre ellos el oviducto. Se conoce que el lumen oviductal provee un microambiente adecuado para alcanzar el éxito reproductivo en los mamíferos. Debido al rol del oviducto y las diversas propiedades que presenta la GNT, este trabajo tiene por objetivo evaluar su acción biológica sobre las células del epitelio oviductal bovino (BOEC). Se obtuvieron células por presión mecánica de oviductos bovinos en fase folicular y luteal. Además, se realizaron cultivos primarios de BOEC estimulados con 1) E_2 y P_4 (simulando las distintas etapas del ciclo estral) y 2) con GNT en diferentes concentraciones: 0,1-10 μ M. Mediante RT-PCR se evaluó la expresión de *PTK2* y *PXN* (genes involucrados en la migración celular), superóxido dismutasa (*SOD1*), catalasa (*CAT*) y ciclina B1 (*CCNB1*), en condiciones *ex vivo* y en los cultivos estimulados. Se evidenció una expresión diferencial de *PTK2*, *PXN* y *CAT* entre la fase folicular y luteal tanto *ex vivo* como *in vitro*, lo que sugiere que estos genes se encuentran regulados por la presencia de E_2 y P_4 . En los cultivos tratados con GNT se observó una disminución en la expresión de *PTK2*, *PXN* y *CCNB1* y un aumento en *SOD1*. También se estudió el efecto de GNT en la migración de las BOEC mediante ensayos de cierre de herida, donde se vio disminuida la capacidad migratoria. Se concluye que GNT afecta negativamente la migración y proliferación de las BOEC, no obstante, contribuye a mantener el equilibrio redox, aumentando la expresión de enzimas antioxidantes.

Palabras clave: Genisteína, Migración, Proliferación, Enzimas Antioxidantes, Oviducto.



INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycinemax*) se ha instaurado como parte importante de la dieta tanto humana como animal. Esta leguminosa y sus derivados son conocidas fuentes de proteína y grasas saludables. En las últimas décadas ha cobrado importancia debido a su elevado contenido en isoflavonas y a sus múltiples efectos en el metabolismo (Martin Salinas et al. 2017). La genisteína (GNT) es la principal isoflavona de esta legumbre (Allred et al., 2001; Dixon y Ferreira, 2002). Esta molécula presenta numerosos efectos biológicos. En líneas celulares, inhibe significativamente la migración y proliferación, induce la apoptosis y la detención del ciclo celular, efectos que probablemente se deben a su acción como inhibidor específico de proteínas tirosina quinasa (Akiyama et al., 1987). Se demostró que esta isoflavona altera la expresión y actividad de la quinasa de adhesión focal (FAK) y otras proteínas que participan en la formación de contactos focales, en células tumorales de cáncer de ovario (Chan et al., 2018) y melanoma (Cui et al., 2017). Estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que la GNT puede ser absorbida en el tracto digestivo (Yamakoshi et al., 2000) y así llegar por el torrente sanguíneo a

diferentes órganos (Tero-Vescan et al., 2014). Simintiras et al. (2017) han estudiado la permeabilidad del oviducto a la GNT. Se determinó que células epiteliales oviductales bovinas (BOEC) cultivadas *in vitro* permiten el transporte de esta isoflavona desde la región basal a la apical. En los mamíferos, este órgano tiene una función clave en las etapas iniciales de la formación de un nuevo individuo. El microambiente oviductal especializado posee una composición dinámica que puede verse influenciada por la regulación hormonal propia (Lapointe et al., 1995) y componentes bioactivos derivados de la nutrición de la hembra. Las células epiteliales del oviducto mantienen este microambiente, por lo que es necesario conservar su integridad (Maillo et al., 2016). Otra particularidad de este flavonoide es su papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo inducidos por la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), presentando un efecto terapéutico en diversos tipos de patologías (Javanbakht et al., 2014). El balance adecuado entre las ROS y la presencia de antioxidantes contribuye a que los acontecimientos reproductivos sean exitosos (Agarwal et al., 2012). Las ROS bloquean la motilidad de los espermatozoides e interfieren en la



interacción espermatozoide-ovocito (Keskes-Ammaret al., 2003). Además, la presencia de antioxidantes promueve la maduración del ovocito, unión de la gameta masculina a la zona pelúcida y desarrollo temprano del embrión (Agarwal et al., 2012). Puesto que se ha reportado que la GNT es un antioxidante aportado por la dieta y puede llegar al oviducto, podría ejercer un efecto protector en este órgano. Sin embargo, esta acción y las demás propiedades mencionadas, no han sido estudiadas con anterioridad en células del epitelio oviductal. Dada la importancia del oviducto y las diversas propiedades que presenta la GNT, este trabajo busca poner en evidencia los efectos *in vitro* de esta isoflavona sobre las células oviductales, utilizando como modelo el oviducto de la especie bovina para su estudio.

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este trabajo son:

- Conocer la expresión de *PTK2* (gen que codifica a FAK) y *PXN* (gen que codifica a paxilina), involucrados en el proceso de migración de celular, en BOEC de fase folicular y luteal.
- Analizar la expresión de enzimas antioxidantes como Superóxido dismutasa

(*SOD1*) y Catalasa (*CAT*) en BOEC, en fase folicular y luteal.

- Evaluar la respuesta transcripcional de *PTK2*, *PXN*, *SOD1* y *CAT* en BOEC, frente la presencia de hormonas esteroideas (E_2 y P_4) *in vitro*, con la finalidad de conocer si las hormonas esteroideas modulan la expresión de dichos genes en el oviducto.
- Estudiar el efecto de GNT sobre los procesos de migración y proliferación celular.
- Determinar la capacidad de GNT como moduladora de la expresión de enzimas que reducen el estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de células oviductales:

Se recolectaron los aparatos reproductores de vaquillonas (*Bos taurus*) inmediatamente posterior a la faena en el matadero local, luego se transportaron al laboratorio en tampón de fosfato de sodio (PBS), pH 7,4, a 4 °C para su procesamiento dentro de las 3 h de recolectados. Para la clasificación de las muestras se realizó la observación del aspecto morfológico de ambos ovarios y la identificación de las estructuras presentes (Ireland et al., 1980; Ulbrich et al., 2004). Con estos criterios se separaron las



muestras en dos grupos: fase folicular y fase luteal. Los oviductos ipsilaterales correspondientes a fase folicular n=5 y fase luteal n=5, fueron separados de los ovarios y mesenterio, eliminando restos de tejidos y vasos sanguíneos (García et al., 2014). Los oviductos fueron lavados en PBS fresco con 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (Gibco, LifeTechnology, Burlington, ON, Canadá), luego se enjuagaron en etanol al 70%, para la desinfección (García et al. 2017). Las BOEC se obtuvieron por presión mecánica con la ayuda de un portaobjetos (Rottmayer et al., 2006) y se utilizaron para la posterior extracción de ARN y la obtención de cultivos primarios de BOEC.

Cultivos en suspensión de células oviductales bovinas:

Las células epiteliales obtenidas se lavaron en PBS estéril, luego el material biológico se resuspendió en medio de cultivo TCM-199 (Gibco, LifeTechnology, Burlington, ON, Canadá) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Internegocios, Buenos Aires, Argentina), Hepes 25 Mm (Gibco, LifeTechnology, Burlington, ON, Canadá), piruvato de sodio 0,2 mM, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de fungizona (Gibco, LifeTechnology, Burlington, ON, Canadá). La suspensión

de células se disgregó mecánicamente mediante 15 pasajes a través de una aguja de jeringa 21G. Se realizaron tres lavados, cada uno seguido de 15 min de sedimentación en medio de cultivo, en estufa gaseada. La viabilidad celular se analizó mediante tinción con azul de tripán (Sigma) y observación microscópica del movimiento ciliar. Las células se cultivaron en placas Petri de 60 mm estériles con TCM-199 suplementado como se describió anteriormente, en estufa gasificada a 38,5°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Después de 48 h, los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS. Se colocaron 10 mg de la suspensión celular en 1 ml de medio de cultivo en cada pocillo de una placa de 24, con SFB al 1% (Internegocios, Buenos Aires, Argentina). Con la finalidad de evaluar el efecto de las hormonas en la expresión de los genes de interés, se cultivaron las células en condiciones fisiológicas similares a las que se encuentran en las fases folicular y luteal del ciclo estral, mediante la incorporación de 17-β-estradiol (E₂) y progesterona (P₄) en las siguientes concentraciones: (a) alta E₂ (290 pg/mL) / baja P₄ (6 ng/mL); (b) P₄ alta (120 ng/mL)/E₂ baja (86 pg/mL); (c) solamente E₂ (290 pg/mL); (d) solamente P₄ (120 ng/mL) y (e) 12 µl/ml de ETOH al 50% (control del vehículo utilizado para la



disolución de las hormonas). Las concentraciones de E_2 y P_4 fueron seleccionadas en base a otros estudios (Lamy et al., 2016). Por otro lado, con el objetivo de evaluar el efecto de la GNT sobre las células del epitelio oviductal, las BOEC se estimularon con diferentes concentraciones de esta isoflavona: GNT 0,1 μ M; 0,2 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M; 5 μ M y 10 μ M. Las mismas fueron seleccionadas teniendo como referencia otros trabajos previamente publicados (García et al., 2014, 2017). Posterior al agregado de los estímulos, las células fueron cultivadas durante 24 h a 38,5°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

Aislamiento de ARN total:

Las BOEC obtenidas mediante presión mecánica de muestras en fase folicular y luteal (n = 5 de cada etapa), se utilizaron para analizar la expresión de genes involucrados en la formación de adhesiones focales (*PTK2* y *PXM*) y en la síntesis de enzimas antioxidantes como *SOD1* y *CAT*. También se usaron cultivos en suspensión de BOEC, estimulados por un lado con diferentes concentraciones de E_2 y P_4 (n = 3 de cada condición), y por el otro con distintas dosis de GNT (0,1 μ M; 0,2 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M; 5 μ M y 10 μ M). El ARN total se aisló utilizando la solución de lisis Trans-Zol

(TransGenBiotech, Co., LTD). El rendimiento de ARN total se determinó espectroscópicamente a 260 nm. La cantidad y la calidad del ARN se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) con 0,06 μ g/ml SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá).

Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR):

El ARN total aislado (1 μ g) se transcribió inversamente utilizando la enzima del virus de la leucemia murina de Moloney (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y oligo(dT)₁₇ (García et al., 2018). Se incubó a 42 °C durante 1 h un volumen final de 25 μ l de la mezcla de reacción que contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 25 pM oligo(dT), 10 mM de ditiotreitol y 200 unidades de transcriptasa inversa, seguido de la inactivación de la enzima a 94 °C durante 5 min. Posteriormente, alícuotas de 1 μ l de la reacción de síntesis de ADNc se amplificaron mediante PCR de punto final, utilizando un termociclador (Techne TC512) con 2,0 U de TaqDNA polimerasa (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) en un volumen de reacción de 20 μ l conteniendo 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100,

MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP y 1 μM de cada cebador específico para los genes de interés: *PTK2*, *PXN*, *GAPDH*, *SOD1*, *CAT* y *H2AFZ* (Tabla 1).

Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados para el análisis de expresión por RT-PCR. Se indican las tallas de los productos de amplificación en pares de bases (pb) y la temperatura de hibridación (TH) para cada par de cebadores.

GEN	CEBADORES	TALLA / TH
GAPDH NC_037332.1	5'AGATGGTGAAGGTCGGAGTG3'	117 pb/ 55 °C
	3'GAAGGTCAATGAAGGGGTCA5'	
H2AFZ NC_037333.1	5'AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG3'	209 pb/ 62 °C
	3'CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG5'	
PTK2 NC_037341.1	5'TCAAGTGTGCCCTTGGTTCA3'	247 pb/ 55 °C
	3'ATGTTCTCGGCGATGGTCAG5'	
PXN NC_037344.1	5'TACATCTCGGCCCTCAACA3'	122 pb/ 53 °C
	3'TAATGCGCCTCGCAGTAGG5'	
CCNB1 NM_001045872.1	5'CCAGTGACTTCACGCCCAT 3'	121 pb/ 58 °C
	5'AAGACGGAGCGGATCCAAC3'	
SOD1 NC_037328.1	5'ATCCACTTCGAGGCAAAGGG3'	169 pb/ 55 °C
	3'CTTTTGGCCACCCTGTTTT5'	
CAT NC_037342.1	5'GAGGAAACGCTGTGTGAGA3'	116 pb/ 57 °C
	3'GGATGCGGGAGCCATATTCAS'	

Se determinó previamente el número de ciclos adecuado para la amplificación de cada fragmento. Para la amplificación por PCR, se comenzó con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min; luego 30 ciclos de: desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, hibridación a la temperatura específica de cada par de cebadores 30 segundos y extensión 50 segundos a 72° C, extensión final a 72° C durante 7 min (García et al., 2018). Cada ensayo de PCR se realizó al menos tres veces para cada muestra. Los cebadores fueron diseñados con el software BLAST *Primer* a partir de secuencias publicadas de ADNc de *Bos taurus*. Los fragmentos

de amplificación correspondientes a los genes *GAPDH* y *H2AFZ* se utilizaron como controles de carga (Soutar et al., 1997), además se incluyeron en cada reacción los correspondientes controles positivos (muestras en las que se conoce que se expresan los genes en estudio) y negativos (sin muestra de ADNc). Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) con 0,06 μg/ml SYBR ® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá). Los geles fueron fotografiados con una cámara digital (Olympus C-5060). Las intensidades de las bandas se analizaron con el software ImageJ para la determinación semicuantitativa de los niveles de expresión de cada gen estudiado en relación con la intensidad del fragmento *GAPDH* o *H2AFZ* correspondientes a cada muestra y condición de los ensayos.

Obtención de cultivos celulares en monocapa:

Las células epiteliales obtenidas se incubaron a 38,5°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 5 días para obtener cultivos de células en monocapa. Luego, los cultivos se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 2 mL de tripsina-EDTA (Gibco BRL) durante 3 min a 37°C (Valdecantos et al., 2017; García et al., 2017). Las células fueron recuperadas en



placas de Petri estériles y se disgregaron mecánicamente con una pipeta, se recogieron en tubos cónicos estériles de 50 mL con 15 mL de medio TCM-199 y se lavaron 2 veces a TA. El material se recuperó en el medio de cultivo. Posteriormente las células se sembraron en una placa de 24 pocillos (10^4 células por pocillo) y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 80%.

Ensayo de Cierre de Herida:

Para evaluar el efecto de GNT en la migración celular, se utilizaron cultivos en monocapa, descritos previamente. Luego se realizaron heridas artificiales en cada monocapa usando la punta de un tip de 200 μ L. Se lavó utilizando PBS suplementado con ATB, y se incubó en 1 mL de medio al 1% de SFB durante 2 h y se procedió a la estimulación con GNT 5 μ M. Las células del control no se incubaron con la molécula bajo estudio. Se evaluó la migración de las células desde ambos bordes de la herida para restablecer la confluencia. Para ello se tomaron imágenes en diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 h) utilizando un microscopio invertido (ZeissAxiovert Z25) y fotografiadas con una cámara digital (Arcano). Para obtener el mismo campo de interés durante las observaciones, se realizaron líneas con marcadores

indelebles en la parte inferior de cada pocillo, las cuales se utilizaron como puntos de referencia microscópicos para asegurar de que las mediciones fueran realizadas exactamente en la misma zona (Jordaens et al., 2015). La medida de cada área se obtuvo mediante el software ImageJ. Posteriormente se determinó el porcentaje de cierre de herida: $\% = (\text{tamaño de la región de la herida} / \text{tamaño total de la imagen}) * 100$ (Cardona, 2015; García et al., 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de PTK2 y PXN en células epiteliales del oviducto bovino:

Con el objetivo de determinar la expresión normal de los genes *PTK2* y *PXN*, involucrados en la migración y motilidad celular, se estudió la expresión génica en el epitelio oviductal bovino en las fases folicular y luteal del ciclo estral, mediante RT-PCR, utilizando muestras frescas (post mortem). Se observó la presencia de transcritos sólo en fase folicular, siendo las células del istmo las que manifestaron mayores niveles de expresión en comparación con las de la región del ampulla en dicho estadio (Fig. 1 y 2).

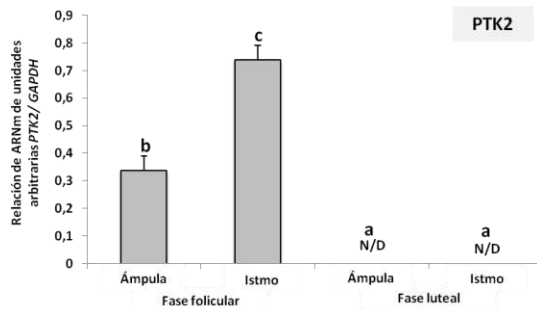


Figura 1: Expresión en células epiteliales del oviducto bovino: Comparación de densidades relativas de los productos de RT-PCR para *PTK2* en referencia al nivel de expresión de *GAPDH* en células del epitelio oviductal bovino (*PTK2/GAPDH*). Las barras representan los promedios \pm error estándar, E.E (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de muestras ($p < 0,05$). N/D: No detectado.

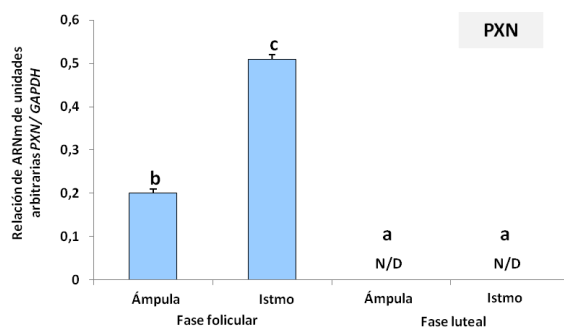


Figura 2: Expresión en células epiteliales del oviducto bovino: Comparación de densidades relativas de los productos de RT-PCR para *PXN* en referencia al nivel de expresión de *GAPDH* en células del epitelio oviductal bovino (*PXN/GAPDH*). Las barras representan los promedios \pm error estándar, E.E (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de muestras ($p < 0,05$). N/D: No detectado.

Se sabe que las hormonas esteroideas derivadas de los ovarios regulan la función oviductal, por lo cual las diferencias transcripcionales entre fase luteal y folicular, serían consecuencia del control hormonal propio del ciclo estral (Bylander et al., 2010; Saint-Dizier et al., 2012). Las diferencias encontradas entre ámpula e istmo estarían relacionadas probablemente con la función reproductiva

que cumplen en cada una de las regiones anatómicas (Coy et al., 2012; Zampini et al., 2017).

Expresión de PTK2 y PXN en cultivos de células epiteliales del oviducto bovino, estimulados con estrógeno y progesterona:

Con el fin de evaluar si la expresión diferencial de *PTK2* y *PXN* en las distintas etapas del ciclo estral se debía a la presencia de las hormonas esteroideas, se analizaron los niveles de transcripción de ambos genes mediante RT-PCR, en cultivos de BOEC estimulados con diferentes concentraciones de estrógeno (E_2) y progesterona (P_4), según las cantidades determinadas en fluido oviductal, reportadas por otros investigadores (Lamy et al., 2016). Se observó una inhibición de la transcripción de ambos genes en aquellos cultivos tratados con elevadas dosis de P_4 (120 ng/mL), tanto en el que simulaba a la fase luteal ($E_2 = 86$ pg/mL + $P_4 = 120$ ng/mL) como en el que se encontraba de manera individual (Fig 3 A y B). Estos resultados sugieren que la progesterona induce una disminución de la expresión de ambos genes tanto *in vivo* como *in vitro*.

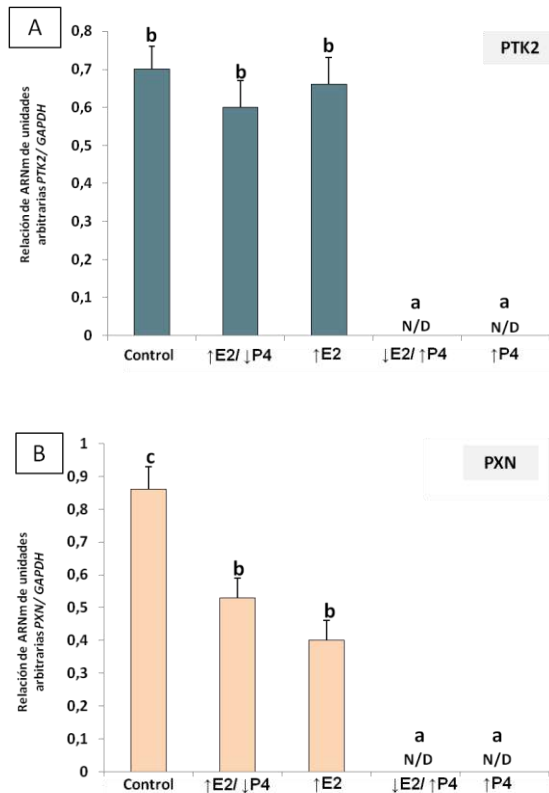


Figura 3: Análisis semicuantitativo de expresión en cultivos de BOEC tratados con diferentes concentraciones de hormonas esteroideas. Se representan los promedios \pm el error estándar (EE) utilizando el software ImageJ (n=3). A: *PTK2/GAPDH*; B: *PXN/GAPDH*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tipos de muestras ($p < 0,05$). N/D: No detectado. ↑E2/ ↓P4: E2 alto: 290 pg/mL, P4 bajo: 6 ng/mL. ↓E2/ ↑P4: E2 bajo: 86 pg/mL, P4 alto: 120 ng/mL. ↑E2: 290 pg/mL. ↑P4: 120 ng/mL.

Bauersachs et al., (2004), determinaron cambios en la expresión génica dentro del epitelio oviductal bovino entre las fases luteal y folicular. Godbole et al., (2017), demostraron que la P₄ inhibe la invasión y migración de células de cáncer de mama, a través de la desfosforilación de quinasas. Además, estudios recientes en el mismo tipo de células, revelaron un mecanismo original a través del cual la falta de E₂ regula la motilidad e invasión celular, mediante la inhibición de la

fosforilación de PXN, imposibilitando así el posicionamiento de esta proteína en el complejo de adhesión (Shortrede et al., 2016).

Efecto de la GNT sobre la expresión de *PTK2* y *PXN* en cultivos *in vitro*:

Con el fin de estudiar la acción de GNT sobre la expresión de *PTK2* y *PXN*, se evaluó su efecto *in vitro*. Para ello se estimularon durante 24 h cultivos de BOEC con diferentes concentraciones de esta isoflavona (0,2 μ M; 2 μ M; 5 μ M y 10 μ M). Luego, mediante RT-PCR se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de *PTK2* ante todas las concentraciones de GNT empleadas, y ausencia de transcritos con GNT 10 μ M. En el caso de la expresión de *PXN* solo se observó una disminución significativa con la adición de la mayor concentración de GNT (Fig. 4 A y B). GNT ha sido descripta como una molécula de acción multidireccional, cuya acción benéfica o perjudicial, al parecer depende del tipo de tejido y la dosis suministrada (De Lemos, 2001; Rice y Whitehead, 2006; Uifálean et al., 2015).

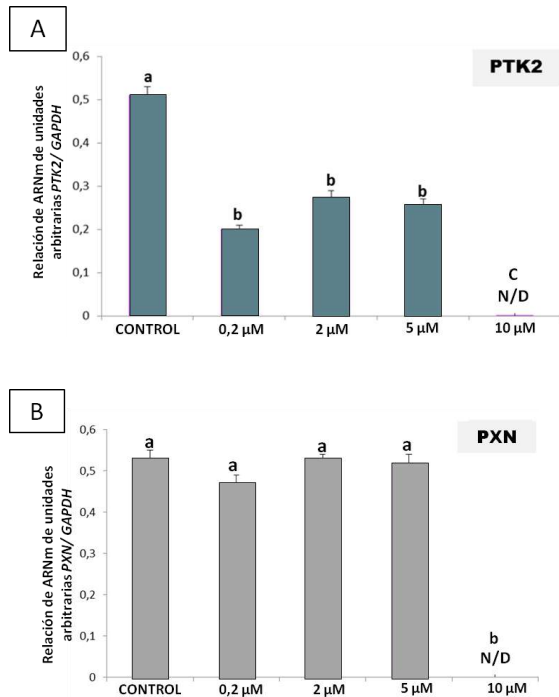


Figura 4: Expresión de *PTK2* y *PXN* en cultivos de células epiteliales del oviducto bovino bajo el efecto de genisteína. A: *PTK2*/GAPDH B: *PXN*/GAPDH. Las barras representan los promedios \pm el error estándar, EE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Estudios recientes muestran una disminución de los niveles de FAK catalíticamente activa (proteína codificada por *PTK2*), debido a la supresión de la fosforilación en Tyr 397, como consecuencia de la estimulación con GNT en células de cáncer de mama (Chan et al., 2018). Cuando FAK no se encuentra activada, no puede fosforilar a sus proteínas blanco corriente abajo en la vía, entre ellas PXN (Schlaepfer et al., 2004). Otros investigadores analizaron el efecto de GNT sobre la movilidad en macrófagos, evidenciando una disminución en los niveles de expresión

de *PTK2* y *PXN*, como en los niveles de las proteínas fosforiladas p-FAK y p-PXN, resaltando el potencial terapéutico de estas moléculas ante enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer, donde las células presentan una elevada actividad migratoria (Cui et al., 2017, 2018). En la actualidad, existen cada vez más evidencias que demuestran la importancia de la vía de señalización FAK/PXN en los procesos de invasión y metástasis a través de diferentes mecanismos moleculares (Panetti, 2002; Kanteti et al., 2016). Interrumpir la interacción entre FAK y PXN bloquea la migración y la invasión de las células cancerosas (Cui et al., 2017). Analizando en conjunto estos resultados, se podría inferir que la acción de GNT es dosis dependiente sobre la expresión de *PTK2*. Además, una elevada concentración de esta isoflavona (GNT 10 μ M) llevaría también a una supresión de la síntesis de PXN. No obstante, la comprensión en cuanto a la interrelación existente entre estas moléculas, su síntesis y regulación, aún merecen un estudio más profundo, que permita conocer las concentraciones y niveles de fosforilación de FAK y PXN en BOEC en presencia de GNT.

Ensayo de Cierre de Herida:

Al poner en evidencia la acción negativa de GNT sobre los genes que participan en la formación de adhesiones focales en las BOEC, se evaluó si efectivamente la migración de las células oviductales se veía afectada. Para ello se realizaron cultivos en monocapa, adicionados con GNT 5 μ M, donde se realizaron “heridas” con la punta de un tip de 200 μ L, previo al ensayo, esperando observar el avance o no de las células, durante diferentes intervalos de tiempo. Se observó que la adición de GNT afecta negativamente el cierre de la herida generada en la monocapa celular, haciéndose aún más evidente su acción a partir de las 12 h del ensayo. El grupo control mostró una disminución progresiva del área descubierta desde el tiempo 0 hasta las 24 h (Fig. 5). De un modo similar a los resultados descritos, en un trabajo previo García et al., (2017) registraron una reducción significativa en la migración celular de BOEC, después de 12 h de incubación con concentraciones de 0,2 y 10 μ M de GNT. En este trabajo, la concentración intermedia probada de 5 μ M tuvo el mismo efecto sobre la migración celular de las BOEC, reconfirmando así el efecto inhibitorio de esta isoflavona en dicho proceso celular.

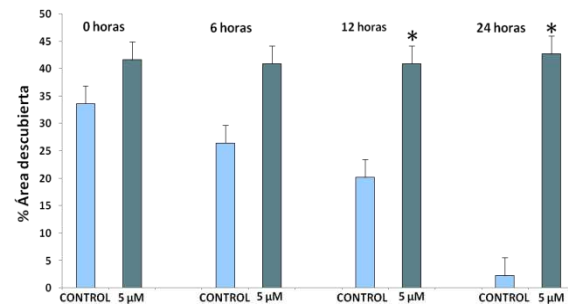


Figura 5: Cuantificación *in vitro* del cierre del área de heridas en cultivos monocapa de BOEC. Las barras representan el porcentaje del área descubierta bajo los diferentes tratamientos a distintos tiempos. * indica diferencia significativa entre el control y muestras tratadas al mismo tiempo.

Efecto de genisteína sobre la proliferación celular: Expresión Ciclina B1:

Con el propósito de evaluar la acción de GNT sobre la proliferación de las células oviductales bovinas, se analizó la expresión de la Ciclina B1, proteína involucrada en el ciclo celular. Para ello cultivos de BOEC se estimularon con diferentes concentraciones de GNT (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M y 10 μ M) durante 24 h. Luego, mediante RT-PCR se pudo observar una disminución significativa en los niveles de expresión del gen que codifica a la Ciclina B1 (*CCNB1*) en los cultivos tratados (Fig. 6). La disminución en la expresión de dicho gen indicaría un efecto inhibitorio por parte de la GNT sobre la proliferación celular. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que las BOEC en condiciones *in vitro* se ven afectadas por esta isoflavona, ejerciendo una regulación

negativa sobre la expresión de *CCND1*. También se observó una disminución en la supervivencia de las células en condiciones de cultivo y menores índices mitóticos (García et al., 2017), lo cual concuerda con los resultados previos obtenidos a este trabajo.

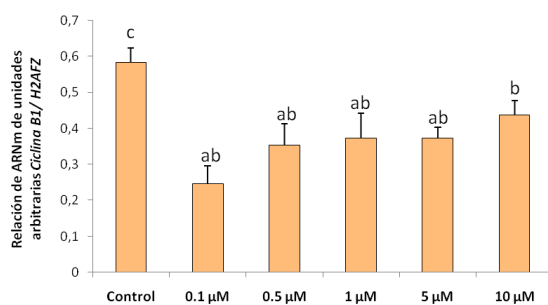


Figura 6: Expresión de Ciclina B1 en cultivos de células epiteliales del oviducto bovino bajo el efecto de genisteína. Se representan los promedios \pm el error estándar (EE) de tres muestras diferentes (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Expresión de enzimas antioxidantes:

SOD1 y CAT:

La expresión de los genes que codifican a las enzimas *SOD1* y *CAT*, involucradas en el equilibrio celular redox, se analizó mediante RT-PCR en BOEC *ex vivo* e *in vitro* (estimulación con E_2 y P_4), tanto en fase folicular como en fase luteal, para comprender su expresión en el oviducto durante el ciclo estral. La expresión de *SOD1* no mostró variaciones significativas en las condiciones evaluadas (Fig 7 A y B).

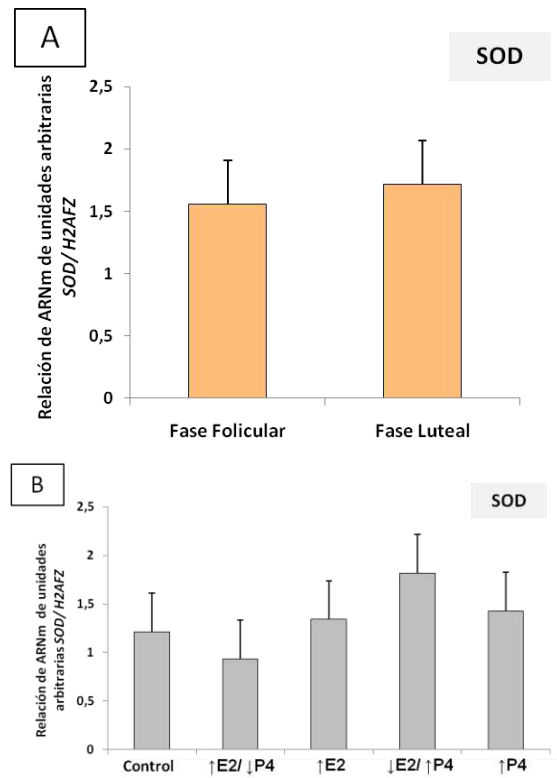


Figura 7: Análisis semicuantitativo de la expresión de *SOD1*. A: En células del epitelio oviductal bovino (*ex vivo*). B: En cultivos de BOEC tratados con diferentes concentraciones de E_2 y P_4 (↑E2/ ↓P4: E_2 alto: 290 pg/mL, P_4 bajo: 6 ng/mL. ↓E2/ ↑P4: E_2 bajo: 86 pg/mL, P_4 alto: 120 ng/mL. ↑E2: 290 pg/mL. ↑P4: 120 ng/mL). Se representan los promedios \pm el error estándar.

Además, se detectaron mayores niveles de transcritos del gen *CAT* en las muestras *ex vivo* correspondientes a la fase luteal y en aquellas estimuladas con la combinación $E_2 = 86$ pg/mL + $P_4 = 120$ ng/mL, simulando dicho estadio (Fig 8 A y B). Estos resultados sugieren que la expresión de *CAT* se ve modificada por el efecto de las hormonas esteroideas. Existen evidencias que las BOEC tienen una fuerte capacidad de síntesis de enzimas antioxidantes para mitigar el efecto de las especies reactivas del

oxígeno (ROS), presentando una expresión diferencial de *CAT* y *GPx4* en las distintas fases del ciclo estral (Kürüm et al., 2019).

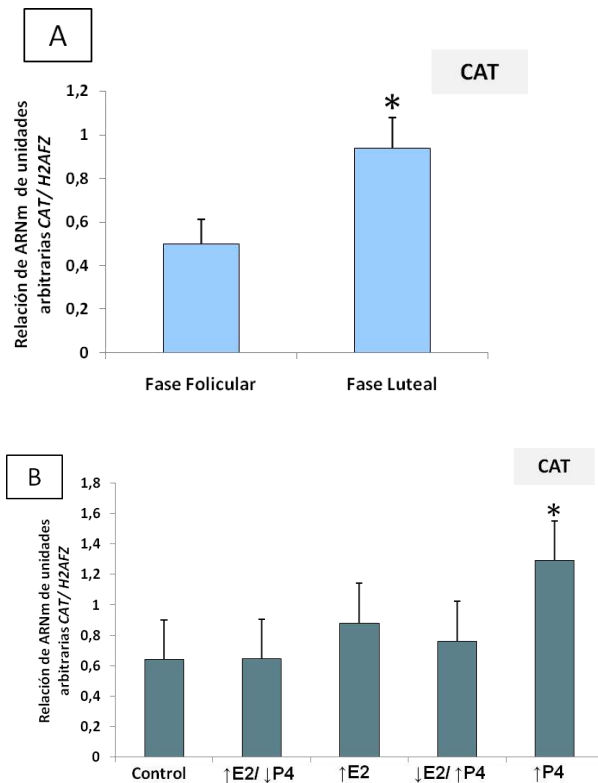


Figura 8: Análisis semicuantitativo de la expresión de *CAT*. A: En células del epitelio oviductal bovino (ex vivo). B: En cultivos de BOEC tratados con diferentes concentraciones de E2 y P4 (↑E2/ ↓P4: E2 alto: 290 pg/mL, P4 bajo: 6 ng/mL. ↓E2/ ↑P4: E2 bajo: 86 pg/mL, P4 alto: 120 ng/mL. ↑E2: 290 pg/mL. ↑P4: 120 ng/mL). Se representan los promedios ± el error estandar. * indica diferencias significativas entre tipos de muestras ($p < 0,05$).

Efecto de GNT en la expresión de *SOD1* y *CAT*:

Con el fin de evaluar el efecto de GNT sobre la expresión de *SOD1* y *CAT*, enzimas antioxidantes, cultivos de BOEC se estimularon durante 24 h con diferentes concentraciones de GNT (0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M y 10 μ M). Luego, mediante RT-

PCR se analizaron los niveles de expresión de *SOD1* y *CAT*. *SOD1* mostró un incremento con todas las concentraciones de GNT probadas, respecto al control, mientras que *CAT* no presentó diferencias significativas entre las muestras tratadas y el control (Fig 9 A y B).

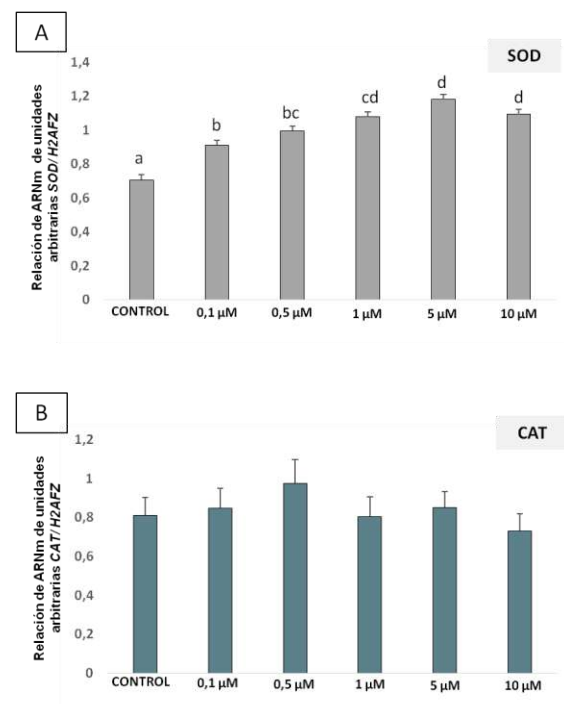


Figura 9: Expresión de *SOD1* y *CAT* en cultivos de células epiteliales del oviducto bovino bajo el efecto de genisteína. A: *SOD1/H2AFZ* B: *CAT/H2AFZ*. Se calcularon promedios (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Los datos obtenidos con respecto al efecto de GNT sobre la expresión génica de las enzimas antioxidantes concuerdan con los encontrados por otros autores. Por ejemplo, se ha observado que en células tumorales, una concentración de GNT de 0,5 μ M, incrementa los niveles de ARNm



de la enzima SOD1 (Borrás et al., 2006). Esto evidencia la acción antioxidante de GNT, no solo debido a la presencia de grupos fenólicos en su estructura química (Ganalet al., 2015), sino también mediante la regulación de la expresión de enzimas antioxidantes como SOD1.

CONCLUSIONES

Las BOEC tienen el poder de sintetizar proteínas involucradas en la formación de adhesiones focales como FAK y PXN, cuya transcripción se ve regulada por la acción de E₂ y P₄, observándose presencia de transcritos en las muestras de fase folicular y en aquellos cultivos tratados con E₂ alto (290 pg/mL) y P₄ baja (6 ng/mL). De la misma manera, producen enzimas antioxidantes capaces de mantener el equilibrio redox. Si bien la expresión de SOD1 permanece constante, CAT muestra variaciones durante el ciclo estral, evidenciando mayores niveles de transcripción en aquellas muestras de fase luteal y en los cultivos tratados con P₄ 120 ng/mL. GNT tiene la capacidad de modificar los niveles transcripcionales de estos genes. Concentraciones de 0,2 μM; 2 μM; 5 μM y 10 μM de GNT, inhibieron la expresión de PTK2 en cultivos de BOEC, mientras que la expresión de PXN solo disminuyó (ausencia de transcritos) con la mayor concentración empleada.

Además de alterar la expresión de estas proteínas involucradas en la formación de adhesiones focales, GNT 5 μM redujo significativamente el avance migratorio de las BOEC en el ensayo de cierre de herida, demostrando su poder antimigratorio. GNT también disminuye la proliferación celular en las concentraciones probadas, evidenciando una reducción en los niveles transcripcionales de Ciclina B1. En cuanto a su acción antioxidante, esta isoflavona presentó un efecto benéfico sobre las BOEC, aumentando los niveles de expresión de SOD1. Con estos resultados podemos concluir que GNT afecta negativamente la migración y proliferación de las BOEC, no obstante, contribuye a mantener el equilibrio redox, mediante la regulación de la expresión de enzimas antioxidantes, como SOD1.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 10(1), 1-31.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S. I., Itoh, N.,...& Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5592-5595.



- Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Virant, S. M., & Helferich, W. G. (2001). Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer research*, 61(13), 5045-5050.
- Bauersachs, S., Rehfeld, S., Ulbrich, S. E., Mallok, S., Prelle, K., Wenigerkind, H., Einspanier, R., Bloom, H., & Wolf, E. (2004). Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *Journal of Molecular Endocrinology*, 32(2), 449-466.
- Borrás, C., Gambini, J., Gómez-Cabrera, M. C., Sastre, J., Pallardó, F. V., Mann, G. E., ... & Viña, J. (2006). Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: Involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB. *The FASEB Journal*, 20(12), 2136-2138.
- Bylander, A., Nutu, M., Wellander, R., Goksör, M., Billig, H., & Larsson, D. J. (2010). Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 48.
- Cardona, A., Ariza-Jiménez, L., Uribe, D., Arroyave, J., & Cortés-Mancera, F. M. (2015). Automatic image segmentation method for in vitro wound healing assay quantitative analysis. In *VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina 29, 30 & 31 October 2014* (pp. 381-384). Springer, Cham.
- Chan, K. K., Siu, M. K., Jiang, Y. X., Wang, J. J., Leung, T. H., & Ngan, H. (2018). Estrogen receptor modulators genistein, daidzein and ERB-041 inhibit cell migration, invasion, proliferation and sphere formation via modulation of FAK and PI3K/AKT signaling in ovarian cancer. *Cancer cell international*, 18(1), 1-14.
- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, REP-12.
- Cui, S., Wang, J., Wu, Q., Qian, J., Yang, C., & Bo, P. (2017). Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget*, 8(13), 21674.
- Cui, S., Wu, Q., Wang, J., Li, M., Qian, J., & Li, S. (2018). Quercetin inhibits LPS-induced macrophage migration by suppressing the iNOS/FAK/paxillin pathway and modulating the cytoskeleton. *Cell adhesion & migration*, 1-12.
- De Lemos, M. L. (2001). Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Annals of Pharmacotherapy*, 35(9), 1118-1121.
- Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60(3), 205-211.
- Ganai, A. A., & Farooqi, H. (2015). Bioactivity of genistein: a review of in vitro and in vivo studies. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 76, 30-38.
- García, D. C., Miceli, D. C., Valdecantos, P. A., García, E. V., & Roldán-Olarte, M. (2014). Expression of urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) in the bovine oviduct: Relationship with uPA effect on



- oviductal epithelial cells. *Research in veterinary science*, 97(1), 118-123.
- García, D. C., Russo-Maenza, A., Miceli, D. C., Valdecantos, P. A., & Roldán-Olarte, M. (2018). The urokinase plasminogen activator system components are regulated by vascular endothelial growth factor D in bovine oviduct. *Zygote*, 26(3), 242-249.
- García, D. C., Valdecantos, P. A., Miceli, D. C., & Roldán-Olarte, M. (2017). Genistein affects proliferation and migration of bovine oviductal epithelial cells. *Research in veterinary science*, 114, 59-63.
- Godbole, M., Tiwary, K., Badwe, R., Gupta, S., & Dutt, A. (2017). Progesterone suppresses the invasion and migration of breast cancer cells irrespective of their progesterone receptor status-a short report. *Cellular Oncology*, 40(4), 411-417.
- Ireland, J. J., Murphee, R. L., & Coulson, P. B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *Journal of dairy science*, 63(1), 155-160.
- Javanbakht, M. H., Sadria, R., Djalali, M., Derakhshanian, H., Hosseinzadeh, P., Zarei, M., ... & Mirshafiey, A. (2014). Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome. *Nefrologia*, 34(4).
- Jordaens, L., Arias-Alvarez, M., Pintelon, I., Thys, S., Valckx, S., Dezhkam, Y., Bols, P. E. J., & Leroy, J. L. M. R. (2015). Elevated non-esterified fatty acid concentrations hamper bovine oviductal epithelial cell physiology in three different in vitro culture systems. *Theriogenology*, 84(6), 899-910.
- Kanteti, R., Batra, S. K., Lennon, F. E., & Salgia, R. (2016). FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(21), 31586.
- Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghozzi, H., Hammami, S., ... & Bahloul, A. (2003). Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Archives of andrology*, 49(2), 83-94.
- Kürüm, A., Karahan, S., KOCAMIŞ, H., Cinar, M., & ERGÜN, E. (2019). Determination of antioxidants in bovine oviduct epithelial cell culture isolated at different periods of the estrous cycle. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 43(4), 448-455.
- Lamy, J., Liere, P., Pianos, A., Aprahamian, F., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2016). Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*, 86(6), 1409-1420.
- Lapointe, J., & Bilodeau, J. F. (2003). Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1157-1164.
- Maillo, V., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, 86(1), 443-450.
- Martín Salinas, C., & López-Sobaler, A. M. (2017). Beneficios de la soja en la salud femenina. *Nutrición Hospitalaria*, 34, 36-40.
- Panetti, T. S. (2002). Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130CAS: effects on cell



- spreading and migration. *Front Biosci*, 7(January), d143-d150.
- Rice, S., & Whitehead, S. A. (2006). Phytoestrogens and breast cancer-promoters or protectors?. *Endocrine-Related Cancer*, 13(4), 995-1015.
- Rottmayer, R., Ulbrich, S. E., Kölle, S., Prella, K., Neumueller, C., Sinowatz, F., Meyer, H. D., Wolf, E., & Hiendleder, S. (2006). A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, 132(4), 637-648
- Saint-Dizier, M., Sandra, O., Ployart, S., Chebrou, M., & Constant, F. (2012). Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 76.
- Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K., & Ilic, D. (2004). Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1692(2-3), 77-102.
- Shortrede, J. E., Uzair, I. D., Neira, F. J., Flamini, M. I., & Sanchez, A. M. (2016). Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 430, 56-67.
- Simintiras, C. A., & Sturmey, R. G. (2017). Genistein crosses the bioartificial oviduct and alters secretion composition. *Reproductive Toxicology*, 71, 63-70.
- Soutar, A., Seaton, A., & Brown, K. (1997). Bronchial reactivity and dietary antioxidants. *Thorax*, 52(2), 166-170.
- Tero-Vescan, A., Vari, C. E., & Vlase, L. (2014). Alkaloid content of some potential isoflavonoids sources (native Genista species). Long-term safety implications. *Farmacía*, 62, 1109-1117.
- Uifălean, A., Schneider, S., Ionescu, C., Lalk, M., & Iuga, C. (2015). Soy isoflavones and breast cancer cell lines: Molecular mechanisms and future perspectives. *Molecules*, 21(1), 13.
- Ulbrich, K., & Šubr, V. (2004). Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced drug delivery reviews*, 56(7), 1023-1050.
- Valdecantos, P. A., Miana, R. D. C. B., García, E. V., García, D. C., Roldán-Olarte, M., & Miceli, D. C. (2017). Expression of bone morphogenetic protein receptors in bovine oviductal epithelial cells: Evidence of autocrine BMP signaling. *Animal reproduction science*, 185, 89-96.
- Yamakoshi, J., Piskula, M. K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., & Kikuchi, M. Biochemical and Molecular Action of Nutrients 130. 1887-1893.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue apoyado por CONICET [Subsidio PIP-2021-N°289 a M.R.O.], Universidad Nacional de Tucumán, Argentina [Subsidio PIUNT2018 D-648 a P.A.V.], y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, ANPCYT, Argentina [Subsidio BID PICT 2020-SERIEA- N ° 03858 a M.R.O.].

Hidrólisis Enzimática de Colágeno de Piel de Surubí: Evaluación del Perfil
Electroforético y Actividad Antioxidante



C.28. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Hidrólisis Enzimática de Colágeno de Piel de Surubí: Evaluación del Perfil

Electroforético y Actividad Antioxidante

Autora: González, María Florencia; floorrgonzalez93@gmail.com

Profesoras guía: Gay, Claudia Carolina; claudiacarolinagay@yahoo.com.ar. Acevedo

Gomez, Antonella; antonellavag@hotmail.com

Universidad Nacional del Nordeste

-RESUMEN:

El Nordeste Argentino produce anualmente 74 tn de *Pseudoplatistoma sp* (surubí), generando grandes cantidades de desechos. Además, las metaloproteasas de veneno de *Bothrops alternatus* (yará grande) degradan colágeno gelatinizado. El objetivo del trabajo fue estudiar la actividad antioxidante de hidrolizados de colágeno de piel de surubí utilizando metaloproteasas de veneno de serpiente. Se prepararon extractos ricos en pepsina de estómago de surubí (EAc) y en metaloproteasas de veneno de yará (EMet). Se realizó una extracción ácida enzimática (EAc 10 U/g piel) del colágeno, se lo gelatinizó (GCS) e hidrolizó enzimáticamente [EMet 0,1625 U/mg; relación sustrato:enzima 200:1 (p:p); pH 7). Se determinó la concentración de hidroxiprolina (Hyp), el grado de hidrólisis (GH) por Adler-Nissen y la actividad antioxidante por Fenton; y se estudió el perfil electroforético (SDS-PAGE). Se calculó el porcentaje de inhibición del

radical OH: % IROH= $[(Am-An)/(Ab-An)] \times 100$; Am, An y Ab son absorbancias (536 nm) de muestra, control negativo y blanco, respectivamente. Se realizó el análisis estadístico por ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$). Los resultados mostraron valores de $0,19 \pm 0,02$ mg/mL de Hyp y $1,54 \pm 0,13$ mg/mL de colágeno soluble (CS). El CS mostró un patrón de bandas compatibles con las cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β y γ del colágeno I. El GH fue de $37,3 \pm 0,06\%$, observándose desaparición de bandas características y aparición de fragmentos de degradación < 20 kDa. El cálculo de la concentración inhibitoria cincuenta (IC_{50}) mostró que el GCS hidrolizado (0,011 mg/ml) incrementa la actividad antioxidante 3,7 veces respecto al sin hidrolizar (0,041 mg/ml). La mezcla de péptidos bioactivos obtenidos resulta atractiva por su potencial aplicación cosmética.

Palabras clave: Hidrolizados de colágeno, metaloproteasas de veneno de serpientes, *Pseudoplatistoma sp*.



- INTRODUCCIÓN:

El colágeno es la proteína estructural más abundante en organismos vertebrados e invertebrados (30% del total de las proteínas de los animales). Está compuesto principalmente por glicina – Gly- (33%) e hidroxiprolina –Hyp- (22%). Existen más de 28 tipos, siendo los más abundantes el de tipo I (pieles, tendones y tejido óseo), tipo II (cartílagos) y tipo III (piel y vasos) (Subhan F. y col., 2021).

Actualmente, el colágeno proveniente de especies acuáticas es una fuente alternativa en la industria debido a que, a diferencia de los extraídos de bovinos y porcinos, no exhibe riesgo de transmisión de enfermedades (encefalopatía espongiiforme bovina y fiebre aftosa). Además su obtención es de bajo costo, ya que se aprovechan los subproductos de la industria pesquera disminuyendo la contaminación ambiental que producen estos descartes (Salvatore L., 2020; Felician F.F., 2018)

Los hidrolizados de colágeno de fuentes acuáticas se pueden obtener por acción enzimática, generando péptidos bioactivos. Estos poseen diversas aplicaciones debido a su elevada compatibilidad con las células, fácil biodegradabilidad, gran penetración en los estratos más profundos de la piel que permiten la estimulación para la

regeneración celular y capacidad antioxidante. Estas propiedades son de gran valor para la industria cosmética (Sionkowska A. y col., 2020)

Por otro lado, las metaloproteasas del veneno de *Bothrops alternatus* (yará grande) son capaces de degradar colágeno de tipo I gelatinizado (Cardozo, C. y col. 2020). En la región del Noreste de Argentina, anualmente se producen para consumo mediante acuicultura 74 tn de *Pseudoplatistoma sp* (surubí) (Panné Huidobro, S., 2016). Esto genera grandes cantidades de desechos, entre ellos la piel (6% del peso del pez) que podrían reutilizarse.

-OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo es obtener hidrolizados del colágeno gelatinizado de la piel de surubí utilizando un extracto rico en metaloproteasas de veneno de serpiente y estudiar su actividad antioxidante.

-MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestras: las muestras de surubí (vísceras y piel) y del veneno de yará grande fueron suministradas por el Instituto de Ictiología del Nordeste y el serpentario del Centro de Conservación Aguará, respectivamente. Se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.



Extracto rico en pepsina de surubí (EAc): se preparó un homogenato del estómago de surubí (rico en pepsina) según la metodología descrita por Acevedo Gomez y col. (2019). La actividad enzimática del extracto se determinó según el método de Anson y Mirsky (1932) para pepsina con hemoglobina ácida previa activación (45m - pH 2).

Extracto rico en metaloproteasas (EMet): el veneno de yarará grande (40 mg/mL) se sometió a dos etapas cromatográficas (intercambio aniónico y filtración en gel) empleando la técnica descrita por Gay y col. (2005). La actividad proteolítica de las fracciones se determinó con azocaseína según la técnica descrita por Wang y Huang, (2002). Las fracciones con actividad proteolítica, se concentraron y denominaron “EMet”.

Extracción del colágeno de surubí (CS): se utilizó la metodología de extracción ácida descrita por Acevedo Gomez y col. (2018) con adición del EAc (10 U/g de piel) durante 72 h. El colágeno soluble en pepsina de surubí (CS) se secó con bomba de vacío hasta su uso. La concentración de Hyp del CS se determinó por el método de Reddy y Enwemeka (1996). y el contenido de colágeno se calculó considerando que el 12,5% del colágeno es Hyp. Los extractos EAc y EMet y el CS seco se almacenaron

a -20 °C hasta su utilización y su contenido proteico se determinó por el método de Bradford (1976) empleando albúmina bovina como patrón.

Gelatinización del colágeno (GCS): una solución 0,8 % (p/v) de CS en agua destilada acidificada (pH 2) con ácido acético glacial ($\geq 99\%$) se gelatinizó hirviéndola por 10 min a 100°C de acuerdo a la metodología descrita por Vasileva -Tonkova y col (2007). Se enfrió y se ajustó a pH 7 con NaOH 2N.

Hidrólisis del colágeno gelatinizado: la solución de GCS se hidrolizó durante 2h a 37°C con EMet (0,1625 U/mg) con una relación en masas 1:200 (EMet: GCS). El pH de reacción se mantuvo constante en 7 por agregado de NaOH 2N. La hidrólisis se detuvo por calentamiento a 100°C por 10 min. Se adicionó nitrato de sodio y se almacenó a 4°C, hasta por dos semanas. El grado de hidrólisis se determinó mediante la técnica descrita por Adler-Nissen (1977). El factor de lisina (1/34,48) y el peso molecular promedio de los aminoácidos del colágeno (108,63 g/mol) se calcularon a partir de datos publicados previamente (Liu D., Nikoo M. 2015).

Geles de electroforesis: el patrón de bandas del CS y del hidrolizado de GCS se evaluaron por SDS-PAGE (12%) (Laemmli, 1970) y tricina-SDS-PAGE 16%/6 M urea (Schägger, 2006),

respectivamente. Los geles se tiñeron con Coomassie blue.

Actividad antioxidante: Se determinó mediante la reacción de Fenton según técnica descrita por Wu, R. et al. (2017) con algunas modificaciones. Se realizaron los blancos y controles negativos correspondientes y el porcentaje de inhibición (*scavenging*) del radical OH (IROH) se calculó utilizando la fórmula: $IROH (\%) = [(Am - An) / (Ab - An)] \times 100$, donde Am, An y Ab son los valores de absorbancia determinados a 536 nm de la muestra, el control negativo y el blanco, respectivamente.

Análisis estadístico: todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y se evaluaron las diferencias entre las medias con Tukey ($p < 0.05$) (software InfoStat®).

-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Obtención de colágeno e hidrólisis enzimática: soluciones de 5,71 mg de CS/mL en ácido acético 0,5 M mostraron una concentración de $0,19 \pm 0,02$ mg/mL de Hyp y $1,54 \pm 0,13$ mg/mL de colágeno. En consecuencia, el 28,4% del CS corresponde a colágeno y el mismo está acompañado de impurezas no detectables mediante electroforesis. En la Figura 1.A se observa un patrón proteico del CS en el

que se evidencian bandas de masas moleculares compatibles con las cadenas α_1 , α_2 , β y γ del colágeno tipo I observado en otras especies de peces (Liu, D., Liang L., 2012) Luego de la hidrólisis enzimática se obtuvo un grado de hidrólisis de $37,3 \pm 0,06$ %. En la figura 1.B se muestra el patrón de bandas del colágeno gelatinizado sin hidrolizar y del hidrolizado. Se observa que luego de la hidrólisis desaparecen las bandas correspondientes a las cadenas α_1 , α_2 , β , y γ aparecen bandas de degradación con masas moleculares menores a 20 kDa.

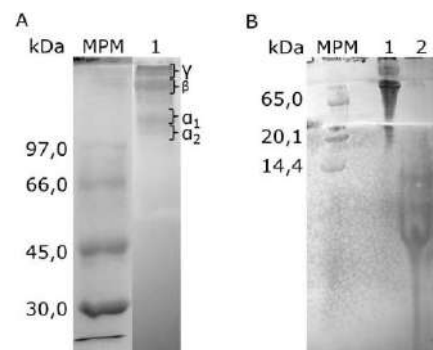


Figura 1. Perfil electroforético de colágeno gelatinizado sin hidrolizar e hidrolizado A. SDS-PAGE 10%. MPM: marcadores de masa molecular (en kDa): ovoalbúmina (45); anhidrasa carbónica (30); inhibidor de tripsina (20,1). Calle 1: colágeno gelatinizado sin hidrolizar. B. Tricina-SDS-PAGE 16%/6M urea. MPM: ídem A, Calle 1: colágeno gelatinizado sin hidrolizar. Calle 2: colágeno gelatinizado hidrolizado.

Actividad antioxidante por Fenton de GCS y sus hidrolizados: ambas muestras mostraron una actividad antioxidante dosis dependiente (figura 2.A y 2.B). Para determinar el valor de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), se graficaron los valores comprendidos entre 2 y 70% de IROH correspondientes a soluciones de colágeno en el rango de 0,004 a 0,015 mg/mL (región de ajuste lineal). Se pudo determinar que el colágeno gelatinizado luego de la hidrólisis (IC₅₀: 0,011 mg/mL) aumentó la actividad antioxidante 3,7 veces respecto del colágeno gelatinizado sin hidrolizar (IC₅₀: 0,041 mg/mL).

El grado de hidrólisis alcanzado es menor al obtenido por Nurilmala y col. (2020) quienes hidrolizaron colágeno gelatinizado extraído de piel de atún con alcalasa (55°C - 3h), obteniendo un grado de hidrólisis del 45% y un IC₅₀ 0,016 mg/mL medido por ABTS. Estos autores proponen una clasificación de valores de IC₅₀ para métodos basados en la transferencia de electrones y reducción de oxidantes coloreados de: muy fuerte <0,05; fuerte 0,05 – 0,10; promedio 0,10 – 0,15; débil 0,15 – 0,20; y muy débil >0,20 mg/mL. Según esta clasificación, en este trabajo, las actividades antioxidantes del colágeno gelatinizado sin hidrolizar e hidrolizado se consideran muy altas.

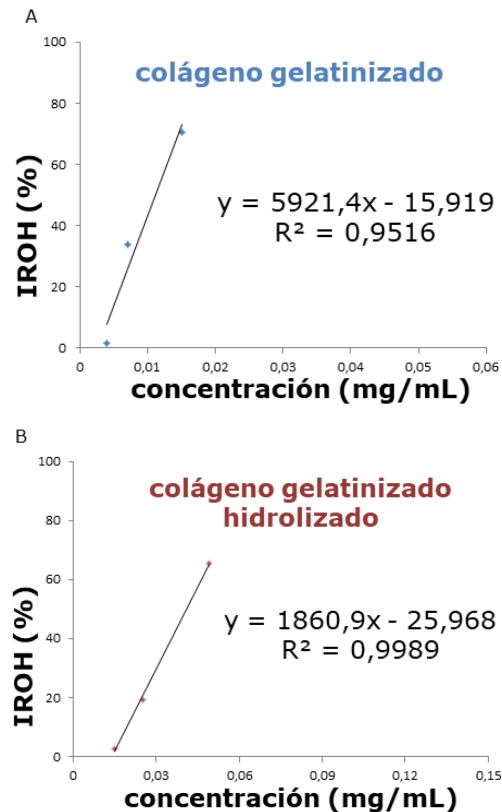


Figura 2. Concentración inhibitoria 50 de la actividad antioxidante del colágeno gelatinizado A. sin hidrolizar B. hidrolizado.

-CONCLUSIÓN:

Se pudo obtener un hidrolizado a partir de colágeno gelatinizado (de piel de surubí) por hidrólisis enzimática con metaloproteasas (de veneno de yararará grande) conteniendo péptidos de masa molecular inferior a 20 kDa. Esta mezcla de péptidos, de elevada actividad antioxidante, resulta atractiva por su potencial aplicación en la industria dermatológica. Ensayos posteriores permitirán estudiar las diferentes



fracciones peptídicas del hidrolizado responsables de la actividad antioxidante, así como medir dicha actividad por otros mecanismos de inhibición de radicales.

-BIBLIOGRAFÍA:

Acevedo Gomez, A. V., Gomez, G., Chamorro, E., Bustillo, S., & Leiva, L. C. (2018). Digestive aspartic proteases from sábalo (*Prochilodus lineatus*): characterization and application for collagen extraction. *Food chemistry*, 269, 610-617.

Acevedo Gomez, A. V.; Gomez, G.; Leiva, L.; Bustillo, S.; Nerli, B. (2019). Estudio de la influencia del pH en la actividad y estabilidad de un extracto gástrico con actividad pepsina de surubí, XXV Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2019 - SGCyT UNNE. Resistencia, Argentina. (2019).

Adler-Nissen, J. (1977). Enzymatic hydrolysis of food protein *Process. Biochemical*, 12, 15-32.

Anson, M. L., & Mirsky, A. E. (1932). The estimation of pepsin with hemoglobin. *The journal of general physiology*, 16(1), 59.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Cardozo, C.; Gauna, M. del C.; Echeverría, S.; Gay, C. (2020) Baltergina una metaloproteinas de veneno de serpiente inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno. LII Reunión Anual y Primer Congreso Virtual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental. Buenos Aires-Córdoba, 20 al 23 de Octubre de 2020.

Felician FF, Xia C, Qi W, Xu H. (2018). Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. *Chem Biodivers*. 15(5).

Gay, C.C., Leiva, L.C., Marunak, S., Teibler, P., Acosta de Perez, O., (2005). Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46, 546-554.

Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227, 680-685.

Liu D., L. Liang, M. Regenstein, P. Zhou. (2012) Extraction and



- characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chem* 133(4), 1441-1448.
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual review of food science and technology* 6, 527-557.
- Nurilmala M, Hizbullah HH, Karnia E, Kusumaningtyas E, Ochiai Y. (2020) Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Mar Drugs* 18(2).
- Panné Huidobro, S. (2016). Producción por Acuicultura en Argentina en el 2016.
- Reddy, G. K., & Enwemeka, C. S. (1996). A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical biochemistry*, 29(3), 225-229.
- Salvatore L, Gallo N, Natali ML, Campa L, Lunetti P, Madaghiele M, et al. (2020). Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Mater Sci Eng C* 113:110963
- Schägger H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16-21.
- Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A., & Wahid, F. (2020). A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-11.
- Sionkowska A, Adamiak K, Musial K, Gadomska M. (2020). Collagen based materials in cosmetic applications: A review. *Materials (Basel)*. 13(19). 1–15.
- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., & Gushterova, A. (2007). New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. *Current Microbiology*, 54(1), 54-57.
- Wang, W.-J. and T.-F. Huang (2002). Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and haemostasis* 87(4): 641-650.
- Wu R., Chen L., Liu D., Huang J., Zhang J., Xiao X., et al. (2017). Preparation of antioxidant peptides from salmon byproducts with bacterial extracellular proteases. *Mar Drugs*. 15(1).



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



AÑOS

-FINANCIAMIENTO:

- PICTO UNNE-2019-00011. Enzimas de fuentes alternativas con potencial utilidad industrial para un desarrollo sostenible en la región del impenetrable. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), FonCyT y SGCyT, UNNE. RESOL-2020-45-APN-DANPIDTYI#ANPIDTYI Período: 26/08/2020 - 26/08/2023.

-AGRADECIMIENTOS:

La autora y profesoras guías agradecen a la Lic. Andrea Gisella Gomez, CPA del instituto, por su colaboración en la determinación del grado de hidrólisis.

Produção de Biopesticida Natural em *Escherichia coli* Recombinant



C. 28. Produtos Naturais Bioativos e suas Aplicações

Produção de Biopesticida Natural em *Escherichia coli* Recombinante

Autor: Lossa Altmann, Daniel; daniellossa@estudante.ufscar.br

Co-autor(es): José da Silva, Adilson; adilsonjs@ufscar.br;

de Souza Cunha, Josivan; vahn2085@gmail.com;

Professor Guia: José da Silva, Adilson; adilsonjs@ufscar.br

Laboratório de Fábricas Celulares/ Departamento de Engenharia Química

Universidade Federal de São Carlos

Resumo

Fenazinas são produtos naturais bioativos produzidos em especial por bactérias do gênero *Pseudomonas*, com aplicações no controle biológico de pragas, por exemplo. A fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), precursora chave de outras fenazinas e produto de interesse neste trabalho, é produzida por *Pseudomonas aeruginosa* e se destaca como bioativo do biopesticida comercial “*Shenquimicyn*”. Sua biossíntese se dá pela via do chiquimato e pela ação do cluster gênico *phzABCDEFG*. Até o momento, estudos de otimização da produção de PCA têm focado nos organismos naturalmente produtores que, no entanto, são patogênicos e de baixa produtividade. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo a superexpressão em *E. coli* do cluster gênico *phzABCDEFG* de *P. aeruginosa* para produção heteróloga de PCA em organismo não patogênico. Além disso, foi estudada a superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA* de *E. coli*, que atuam na formação de precursores iniciais da via do chiquimato, com intuito de otimizar a produção de PCA. Os genes de *P. aeruginosa* foram clonados em configuração de pseudo-operon formando o plasmídeo pETM7_*phzABGFCDE*. Os genes *tktA* e *ppsA* foram clonados individualmente e em conjunto no plasmídeo pRSM4 e transformados em células de *E. coli* QH4, carregando o plasmídeo pETM7_*phzABGFCDE*. O cultivo das linhagens foi realizado em 50 mL de meio TB + 2% glicerol, 30° C, 220 rpm. Quantificou-se glicerol e PCA por HPLC e biomassa por absorbância. A superexpressão do cluster gênico permitiu produzir PCA em *E. coli* com sucesso, atingindo a concentração de 275 mg/L. A superexpressão de *ppsA* prejudicou a biossíntese de PCA, mas a superexpressão do gene *tktA* aumentou sua produção em 178% atingindo a concentração de 763 mg/L de PCA, sem prejudicar o crescimento celular.

Palavras-chave: Fenazinas, via do chiquimato, Shenquimicyn.

Introdução

Fenazinas são produtos naturais provenientes do metabolismo secundário de algumas classes de microrganismos, entre as quais se destacam os gêneros *Pseudomonas* e *Streptomyces*. Tratam-se de compostos aromáticos nitrogenados que apresentam intensa coloração e funções biológicas diversas, como ação bactericida, antifúngica, propriedades antitumorais, entre outras (Chincholkar e Thomashow, 2013).

Devido ao seu potencial de aplicação biotecnológica, há um grande interesse da comunidade científica nessa classe de moléculas (Pierson e Pierson, 2010). Sabe-se que as rotas químicas apresentam baixos rendimentos (Cheluvappa, 2014), há produção de uma série de subprodutos tóxicos (Chincholkar e Thomashow, 2013) e o custo do produto final é alto. Dessa forma, o desenvolvimento de bioprocessos para produção de fenazinas a partir de microrganismos se apresenta como uma alternativa atrativa.

Entre as fenazinas conhecidas, destaca-se o composto fenazina-1-ácido carboxílico (PCA, do inglês Phenazine-1-Carboxylic Acid), por se apresentar como precursor comum das demais fenazinas em *P. aeruginosa* e de outros microrganismos. Trata-se de uma molécula

com forte ação antimicrobiana e antifúngica, já tendo sido registrada comercialmente como um biopesticida sob o nome “*Shenqinmycin*”. Entretanto, devido à baixa produtividade do seu processo de produção atual a partir da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* M18, sua comercialização tem sido inviabilizada diante de pesticidas químicos de menor custo (Jin et al., 2015).

A biossíntese das fenazinas em *Pseudomonas* é realizada pela ação das enzimas codificadas pelo cluster gênico *phzABCDEFGG* utilizando o corismato como precursor (Mavrodi et al., 1998). O corismato, por sua vez, é o último produto da via do chiquimato. A ação das enzimas codificadas no cluster *phzABCDEFGG* leva à produção de PCA, observado na Figura 1.

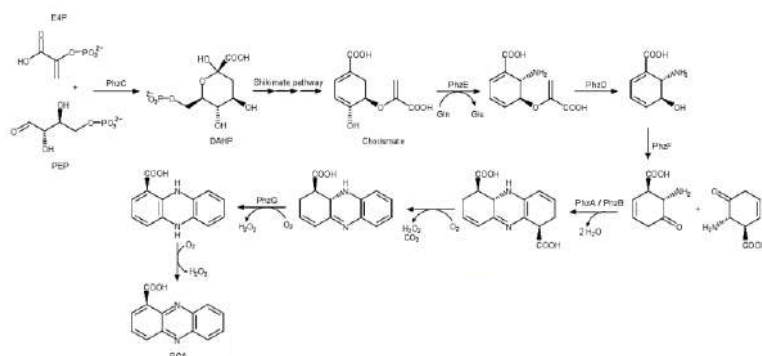


Figura 1: Biossíntese de PCA. Por meio dos precursores eritrose-4-fosfato (E4P) e fosfoenolpiruvato (PEP) e sucessivos passos reacionais relativos à via do chiquimato, obtém-se o corismato. Enzimas codificadas pelo cluster gênico *phzABCDEFGG* convertem esse intermediário em PCA. Fonte: Adaptado de Mavrodi et al., (2001).

Na maioria das bactérias produtoras de fenazinas, esses genes são flanqueados por um ou mais genes acessórios que codificam enzimas que promovem a adição de grupos e modificações na molécula de PCA, gerando outras fenazinas (Chincholkar e Thomashow, 2013). Observado na Figura 2.

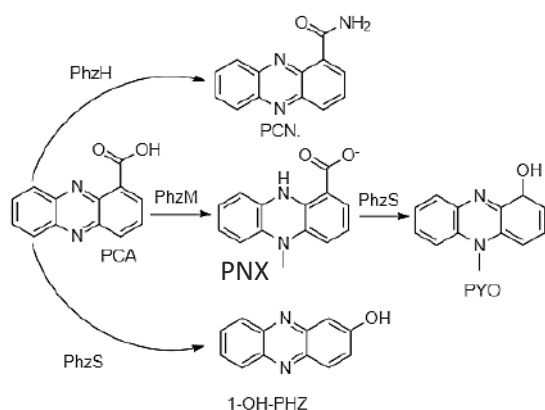


Figura 2: Biossíntese das fenazinas derivadas de PCA. Entre os genes que flanqueiam o cluster *phzABCDEFGHI* encontram-se *phzH*, *phzM* e *phzS*. A expressão de *phzH* converte PCA em fenazina-1-carboxamida (PCN), enquanto que *phzM* conjuntamente expresso com *phzS* leva à produção de piocianina (PYO), passando pelo intermediário indicado pela sigla PNX. Por fim, a expressão de *phzS* individualmente gera a conversão de PCA em 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ). Fonte: Própria autoria.

De forma geral, a engenharia metabólica se caracteriza como o ramo que estuda a otimização genética e regulatória de células para viabilizar a produção de uma substância de interesse. Para tal finalidade, são necessárias modificações em um ou mais alvos, como reações

bioquímicas, a partir da tecnologia do DNA recombinante (Stephanopoulos et al., 1998). Neste contexto, a expressão episomal através de plasmídeos caracteriza-se como uma dessas ferramentas, que permite não só sintetizar biomoléculas no interior celular como também permite explorar tais alvos selecionados.

Entre as ferramentas disponíveis para fins de engenharia metabólica utilizando células de *E. coli*, encontra-se o conjunto de plasmídeos *ePathBrick* que compõe uma plataforma para montagem de vetores de expressão de vários genes de uma via ou geração combinatória de diversidades de uma via. Utilizando o conceito de *BioBricks*, os vetores utilizados contêm quatro sítios de restrição compatíveis (*AvrII*, *XbaI*, *SpeI* e *NheI*) alocados em posições estratégicas. Estes permitem que os genes clonados possam ser facilmente organizados na forma de operons, pseudo-operons ou de forma monocistrônica. Tais configurações levam a diferentes níveis de expressão dos alvos selecionados (Xu et al, 2012).

Existem diferentes estudos de otimização para produção de PCA voltados a organismos naturalmente produtores que, no entanto, são patogênicos e de baixa produtividade (Pierson L.; Pierson E., 2010). Por outro lado, muitos alvos para



aumento da biossíntese de compostos aromáticos, derivados da via do chiquimato, encontram-se reportados em literatura (Huccetogullari et al., 2019), mas ainda não foram explorados na produção de fenazinas. Neste trabalho, propomos a superexpressão de dois desses alvos, as enzimas TktA e PpsA, em uma linhagem não patogênica de *Escherichia coli* carregando o operon *phz* para produção heteróloga de PCA. As enzimas-alvo atuam na formação dos precursores iniciais da via do chiquimato e, por meio da superexpressão individual e em conjunto das enzimas, visamos avaliar o efeito dessas na síntese heteróloga de PCA.

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a realização de modificações genéticas nas células de *E. coli* com potencial de favorecer a formação dos precursores da via metabólica de produção de corismato, que é o intermediário-chave para a produção do composto alvo fenazina-1-ácido carboxílico (PCA). Especificamente, o objetivo foi a clonagem dos genes *tktA* e *ppsA* provenientes de *E. coli* em plasmídeos *ePathBrick* pRSM4 para obtenção dos plasmídeos pRSM4_*tktA*, pRSM4_*ppsA*, pRSM4_*tktA_ppsA* (monocistrônica), pRSM4_*ppsA_tktA* (pseudo-operon). Posteriormente, realizar

a expressão em células recombinantes de *E. coli* produtoras de PCA, obter dados de produção e calcular os parâmetros cinéticos. Finalmente, avaliar a influência da superexpressão destes genes em diferentes combinações na formação do produto de interesse.

Materiais e Métodos

Linhagens Bacterianas

A linhagem *E. coli* DH5 α foi empregada para construção de plasmídeos de expressão e sua estocagem, enquanto a linhagem de *E. coli* K-12 MG1655 foi utilizada para obtenção das sequências molde dos genes alvo.

Células de *E. coli* QH4 transformadas com o plasmídeo pETM7_*phzABGFCDE* (estoque do laboratório, Da Silva et al., 2021) e com os plasmídeos construídos foram utilizadas para a produção de PCA. A linhagem QH4 é derivada da linhagem ATCC31884 e possui as deleções Δ *pheA*, Δ *tyrA* (Huang et al., 2013). Esta mesma linhagem contendo o plasmídeo pETM7_*phzABGFCDE* passou a ser chamada de QH4-PCA neste trabalho.



Meios de cultivo

Meio LB, utilizado para inóculos durante a construção dos plasmídeos composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl. LB-ágar, meio LB acrescido de ágar 15 g/L. Ensaio de produção de PCA, meio TB (24 g/L extrato de levedura, 20 g/L triptona, 0,17 M KH₂PO₄ e 0,72 M K₂HPO₄) acrescido de 20 g/L de glicerol. Meio SOC (preparado com 20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de NaCl, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM e adição de glicose 20 mM) para protocolo de transformação. Antibióticos em concentração final ajustadas para 50 µg/mL (canamicina) e 80 µg/mL (ampicilina). Todos os genes clonados tiveram sua transcrição induzida por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) a 1 mM durante os ensaios de produção de PCA.

Extração de DNA

O DNA genômico de *E. coli* K-12 MG1655 foi obtido pelo kit de extração *AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen)*, servindo de molde para posterior obtenção dos genes *tktA* e *ppsA*. O vetor pRSM4 foi obtido por extração plasmidial da linhagem de *E. coli* DH5α previamente transformada com este

plasmídeo (estoque do laboratório), utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*.

Primers

Para a obtenção dos amplicons, foram desenhados *primers* para a região *upstream* e *downstream* dos genes alvo *tktA* e *ppsA* no DNA genômico da linhagem de *E. coli* K-12 MG1655. Para o *screening* de clones recombinantes, foram utilizados os *primers* já disponíveis no laboratório *pBRrevBam (forward)* e *rrnB (reverse)*, capazes de se anelar respectivamente na região *upstream* ao promotor LacUV5 e no sítio de terminação da tradução, ambos contidos no plasmídeo pRSM4. Todos os *primers* podem ser observados na Tabela 1.

Primer	Sequência
<i>tktA NdeI_For</i>	5' GGCC CATATG TCCTCACGTAAAGAGCTTG 3'
<i>tktA XhoI_Rev</i>	5' GGCC CTCGAG TTACAGCAGTTCTTTGCTTTTCGC 3'
<i>ppsA NdeI_Rev</i>	5' GCG CATATG TCCAACAATGGCTCGTC 3'
<i>ppsA XhoI_For</i>	5' CG CTCGAG TTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC 3'
<i>pBRrevBam</i>	5' GGTGATGTCGGCGATATAGG 3'
<i>rrnB_R</i>	5' GAGAGCGTTCACCGACAAAC 3'

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados neste trabalho. Foram adicionados sítios de restrição nos pares de primers destinados a clonagem dos genes *tktA* e *ppsA*. Estas encontram-se destacadas em negrito e sublinhadas na sequência. Fonte: Própria autoria.



Construção Plasmidial

Para a clonagem individual de cada gene alvo, ambos foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico da linhagem de *E. coli* K-12 MG1655. Em seguida, cada fragmento purificado passou por etapa de digestão e ligação em vetores pRSM4 (previamente digeridos). Tais plasmídeos já montados (pRSM4_ *tktA* e pRSM4_ *ppsA*) serviram de base para construção de novos plasmídeos, com genes alvo posicionados em configurações distintas (Pseudo-operon pRSM4_ *ppsA_tktA* e monocistrônica pRSM4_ *tktA_ppsA*), (Xu et al., 2012). Foram realizados passos de *screening* diversos, como PCR de colônia, ensaios de digestão e sequenciamento.

Ensaio de Produção de PCA

A etapa seguinte deu-se pela transformação por choque térmico da linhagem produtora *E. coli* QH4-PCA com cada um dos plasmídeos construídos. Dessa forma, foram obtidas quatro linhagens resultantes, compostas cada uma por um dos plasmídeos. Essas, são identificadas neste trabalho por linhagem *tktA* (pRSM4_ *tktA*), linhagem *ppsA* (pRSM4_ *ppsA*), linhagem monocistrônica (pRSM4_ *tktA_ppsA*), linhagem Pseudo-operon (pRSM4_ *ppsA_tktA*). A

confirmação dos clones recombinantes foi feita por seleção por antibióticos canamicina e ampicilina. Por fim, cada construção teve colônias escolhidas para serem estocadas a -80°C em criotubos de 2 mL com glicerol 20 % (v/v).

O cultivo em duplicata das linhagens construídas em comparação com a parental foi realizado em erlenmeyers, meio TB + 2% glicerol, 30° C, 220 rpm, com indução por IPTG 1 mM.

Parâmetros cinéticos

Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}): Foi plotado um gráfico de $\ln(X)$ vs Tempo (h) e identificada a fase exponencial de crescimento. Todos os pontos presentes nesta fase foram utilizados para a construção de um novo gráfico de $\ln(X)$ vs Tempo (h), em que sua inclinação indicava o valor de μ_{max} . A curva é descrita pela seguinte equação:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{max} \cdot t$$

Em que X representa o valor de concentração de biomassa; X_0 é a concentração de biomassa no instante $t=0$; μ_{max} a velocidade específica máxima, e t o tempo.

Coefficiente de rendimento de substrato em produto ($Y_{mgPCA/gGlicerol}$): A partir da concentração de PCA obtida nas



amostragens ao longo do tempo, foi calculada a variação de produto entre cada ponto (P) coletado e a concentração inicial de PCA (P_0), durante a fase exponencial, representado pela relação:

$$\Delta P = (P - P_0)$$

Por fim, foi plotado um gráfico de ΔP vs $-\Delta S$, com sua inclinação equivalente ao coeficiente de rendimento de produto em biomassa e curva representada pela seguinte equação:

$$Y_{gP/gS} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}$$

Conversão de glicerol (%): A porcentagem de glicerol consumido ao longo de diferentes tempos do cultivo foi calculada para todas as linhagens nos tempos $t=32$ h e $t=50$ h, obtida através da seguinte equação, em que S representa a concentração de glicerol:

$$\text{Conversão de glicerol (\%)} = \left(1 - \frac{S}{S_0}\right) \times 100$$

Quantificações

O perfil de concentração de glicerol e PCA em cada cultivo foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A concentração de biomassa celular foi acompanhada através de medições de densidade ótica e correlações com curva de massa seca previamente construída, seguindo a

equação $X=0,4918.y$ $R^2 = 0,9902$, em que X representa $g_{DCW/L}$ (gramas de massa seca, do inglês *Dry Cell Weight*) e y os valores de absorvância em densidade ótica.

Resultados e discussão

Não só nas etapas de clonagem, mas também durante a combinação de sequencias gênicas nos plasmídeos, foram obtidos resultados muito satisfatórios. Plasmídeos com genes individualmente clonados $pRSM4_tktA$ e $pRSM4_ppsA$ passaram por passos de *screenings* evidenciando uma alta quantidade de clones positivos. Isso possibilitou dar continuidade aos passos de combinação genética sem grandes obstáculos. Novamente, foi observado um andamento favorável e eficiente na obtenção de clones com plasmídeos $pRSM_tktA_ppsA$ e $pRSM4_ppsA_tktA$. Após etapas bem-sucedidas na construção de linhagens recombinantes capazes de superexpressar todos os alvos de interesse, foram levantadas observações acerca da produção de PCA durante os cultivos.

A partir dos dados sobre a quantificação do consumo de glicerol e produção de biomassa e PCA, foi possível obter o perfil de concentração desses componentes para cada linhagem, observados nas figuras 3, 4 e 5.

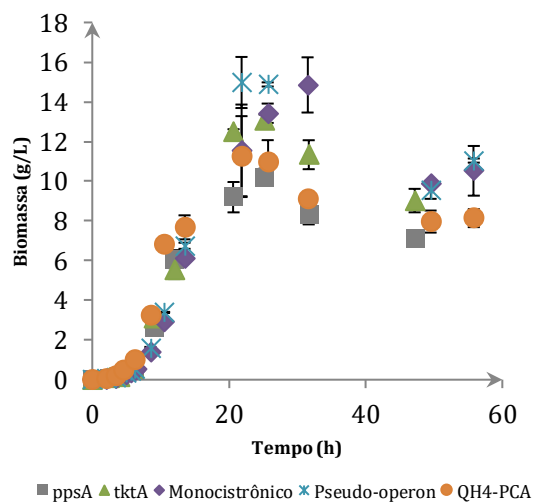


Figura 3: Comparação geral entre o perfil de concentração de biomassa entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

Pode-se observar que o padrão de crescimento entre as linhagens foi variado em diferentes fases. A linhagem QH4-PCA parental foi a primeira a atingir a DO de 1, iniciando a fase exponencial antes dos outros grupos. Em torno de 20 horas de cultivo essa apresentou uma queda em seu crescimento. Por outro lado, as linhagens QH4-PCA com pRSM4_*ppsA* e QH4-PCA com pRSM4_*tktA*, mesmo com seu perfil de concentração similar e iniciando a fase exponencial posteriormente à parental,

mantiveram seu crescimento por um período mais prolongado além de não apresentarem queda tão acentuada ao final do experimento. As linhagens referentes à construção monocistrônica e pseudo-operon mantiveram um padrão de crescimento muito semelhante entre si até as primeiras 15 horas de cultivo. Porém em torno de 25 horas a linhagem pseudo-operon ultrapassou o crescimento da linhagem monocistrônica. Em seguida, ambas tiveram uma queda acentuada e concentração final do cultivo semelhante, no entanto superior a linhagem QH4-PCA. Já a linhagem com super-expressão do gene *ppsA* apresentou, de forma geral, menor formação de biomassa ao longo do cultivo que as demais linhagens avaliadas.

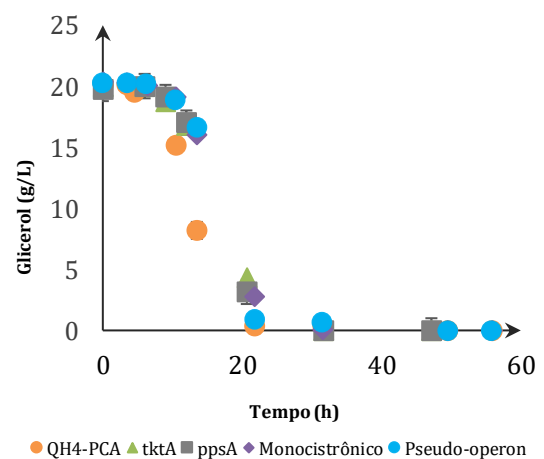


Figura 4: Comparação geral entre o perfil de consumo de glicerol entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

De forma geral, o perfil de consumo de glicerol foi muito semelhante para todas as linhagens. Foi observado que a linhagem parental apresentou um decaimento mais acentuado de seu substrato, atingindo 50% de consumo próximo às 10 horas de cultivo. Próximo a 20 horas, todas as linhagens estavam próximas do consumo de 100% de glicerol. Após as 30 horas, foi notada a depleção completa do substrato em questão.

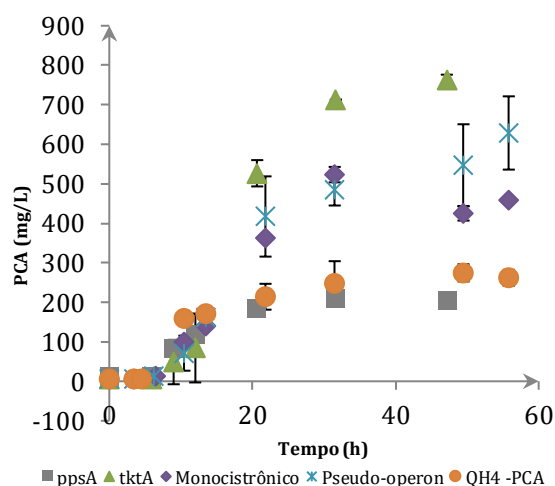


Figura 5: Comparação geral entre o perfil de produção de PCA entre a linhagem parental e as linhagens construídas para superexpressão dos genes *tktA* e *ppsA*. Fonte: Própria autoria.

Com o perfil de concentração de PCA obtido para cada linhagem testada, foi possível perceber uma considerável variação em fases avançadas do cultivo. Próximo a 20 horas, as linhagens *tktA*, monocistrônica e pseudo-operon passaram a atingir valores muito

superiores à linhagem parental, o que se manteve até o final do cultivo. A linhagem pseudo-operon, superou a produção de PCA em relação à linhagem monocistrônica ao final do cultivo. Entre as três linhagens citadas, *tktA* se manteve com as concentrações evidentemente mais elevadas em relação a todas as outras linhagens, em especial durante o período entre 20 e 48 horas de cultivo. Por outro lado, *ppsA* apresentou a menor produção do composto em torno de 20 horas (em relação a todas as linhagens) e se manteve como a menos elevada até o encerramento do ensaio.

A título de comparações entre valores máximos de produção, também foram plotados os pontos máximos de PCA produzidos por cada uma das linhagens durante os cultivos, os quais podem ser observados na Figura 6.

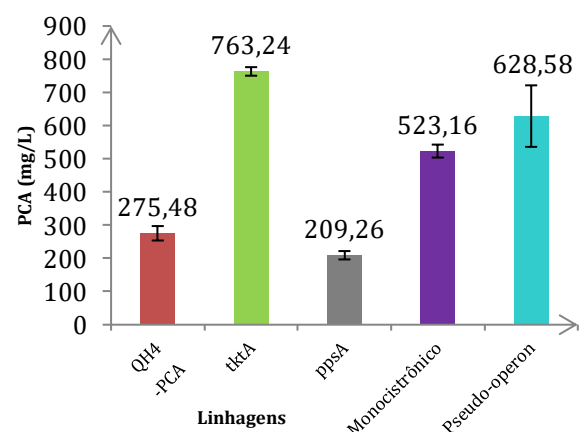


Figura 6 - Concentração máxima de PCA atingida por cada linhagem. Fonte: Própria autoria.

De forma geral, com exceção da linhagem com *ppsA* superexpresso individualmente, todas as outras apresentaram produção de PCA superior à parental (QH4-PCA), como pode ser observado na figura 6.

A baixa variação nos perfis de concentração celular e concentração de PCA entre as 32 horas de batelada e 50 horas (final do cultivo) motivou o estudo da conversão em porcentagem do glicerol, dados presentes na Tabela 2.

Linhagem	Conversão de Glicerol	Conversão de Glicerol
	t=32 h	t=50 h
QH4-PCA	98,0%	100,0%
<i>tktA</i>	100,0%	100,0%
<i>ppsA</i>	100,0%	100,0%
Monocistrônico	99,7%	100,0%
Pseudo-operon	96,8%	100,0%

Tabela 2: Conversão de glicerol em porcentagem. Conversões de glicerol obtidas nos instantes t=32 h, t=50 h para cada linhagem. Fonte: Própria autoria.

Em 32 horas de cultivo, todas as linhagens já apresentavam valores superiores a 96% de conversão do substrato (as linhagens *tktA* e *ppsA* já haviam até mesmo esgotado completamente o glicerol, com 100% de consumo). Posteriormente, em 50 horas de cultivo, as linhagens restantes também o depletaram. Tais achados evidenciaram que o prolongamento até 50 horas pode ser desvantajoso em relação a mão de obra demandada e recursos investidos.

Também foram determinadas a concentração máxima de biomassa, velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), para cada uma das linhagens, conforme apresentado na Tabela 3.

Linhagem	Biomassa (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (mg/g)
QH4-PCA	14,9	0,67	12,9
<i>tktA</i>	13,1	0,62	35,1
<i>ppsA</i>	10,2	0,56	7,9
Monocistrônico	14,8	0,55	24,0
Pseudo-operon	14,9	0,52	24,2

Tabela 3: Dados de crescimento celular e parâmetros cinéticos do processo de produção de PCA pelas linhagens recombinantes de *E. coli*. Fonte: Própria autoria.

A superexpressão de PpsA prejudicou o crescimento celular, visto que no grupo com a enzima codificada individualmente, foi observada a redução nos parâmetros calculados em relação à parental (observado na Tabela 3 e na Figura 3). Devido a isso, as maiores concentrações máximas de PCA apresentadas pelas linhagens monocistrônica e pseudo-operon (em relação à parental) foram justificadas pela presença de TktA. Além disso, na literatura, tal gene (*ppsA*) somente apresentou resultados atrativos na produção de compostos aromáticos quando a glicose foi empregada como fonte de carbono. O



mecanismo de captação de glicose envolve sua fosforilação a partir do consumo de PEP, e a reação da PpsA tende a repor o PEP consumido. Quando o glicerol é usado como fonte de carbono, não há consumo de PEP na sua captação, e a superexpressão da PpsA parece não ter se feito tão necessária para a reposição do intermediário, e somente levou a uma possível sobrecarga metabólica devido a sua síntese proteica.

Vale ressaltar que o glicerol se destaca como uma fonte de carbono renovável, sustentável e subproduto de processos industriais, podendo assim representar uma opção mais rentável em comparação a outros substratos, como é o caso da glicose (Weiner M et al., 2014). Nesse contexto, encontram-se reportados em literatura algumas estratégias voltadas para seu melhor aproveitamento, empregando a superexpressão de genes presentes em sua degradação. Um exemplo proveniente de estudos de Weiner et al. (2014), é relativo ao aumento da produção de L-fenilalanina em *E. coli*, combinando cópias extras de alguns genes envolvidos no metabolismo do glicerol, além de um dos alvos explorados nesse trabalho, o gene *tktA*. Os resultados sugeriram que o balanço entre as vias da pentose fosfato e neoglicogênese, mais ativas decorrente da superexpressão dos

alvos supracitados, foi capaz de aumentar o suprimento dos precursores chave da via do chiquimato (eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato). Tais achados embasam a importância do desenvolvimento de estratégias para consumo do glicerol como substrato, e apontam novamente o gene *tktA* como alvo essencial neste processo.

Era esperado que a configuração dos genes em pseudo-operon fosse mais vantajosa em relação a configuração monocistrônica. Segundo Xu et al. (2012), a estrutura secundária característica do terminador de um gene antecedente pode gerar um impedimento estérico no promotor do gene *downstream* a ele em uma configuração monocistrônica, o que não seria observado em configuração pseudo-operon. Como *tktA* se encontrava na posição *downstream* à *ppsA* na linhagem com plasmídeo em configuração pseudo-operon, acredita-se que sua atividade não enfrentaria tais problemas mencionados, além de ter sua transcrição muito favorecida devido aos dois promotores LacUV5 atuarem gerando seus transcritos. Tudo isso justificaria uma possível produção superior em PCA da linhagem com genes superexpressos em configuração pseudo-operon em relação à linhagem com genes monocistrônicos. No entanto, a análise das medidas de dispersão impediu a inferência de que a



linhagem pseudo-operon foi melhor do que a monocistrônica, tendo em vista que os valores de biomassa e PCA, além de próximos, estavam muito dispersos.

Para a linhagem com *TktA* superexpresso individualmente, os valores de biomassa e μ_{max} foram próximos aos atingidos pela parental, mostrando que a modificação não prejudicou o crescimento celular. Por fim, não só o perfil de concentração de produto evidentemente superior às outras linhagens ao longo do cultivo, mas também o valor máximo da molécula alvo produzida deixaram clara a importância da superexpressão do gene *tktA* na formação de PCA.

A superexpressão de *tktA* gerou um impacto impressionante na produção da molécula alvo, com um incremento de 178% na concentração de PCA em relação à parental. Por fim, seu valor de $Y_{p/s}$ calculado evidenciou um grande aproveitamento do substrato direcionado à síntese de PCA, com valor de $Y_{p/s}$ 272% maior em relação à parental. Tal observação foi justificada frente às reações da enzima *TktA*, associadas a um melhor aproveitamento de intermediários glicolíticos via formação de eritrose-4-fosfato (E4P), precursor da via do chiquimato. Em outras palavras, o resultado obtido também indica que a disponibilidade do precursor E4P é um

fator limitante para a produção da PCA. Ao comparar com valores atingidos por outros trabalhos em literatura, a linhagem construída neste trabalho já foi capaz de superar a produção de *P. putida* (Askitosari T. D. et al., 2019), com 80,0 mg/L e se encontrou muito próxima da produção de *P. aeruginosa* PA1201, com 926,9 mg/L (Fang Y et al. 2015). Ainda que a produção seja inferior a algumas linhagens reportadas, é importante destacar que somente um alvo foi explorado e sozinho apresentou resultados significativos. Isso, portanto, embasa a importância de novas abordagens para atingir maiores incrementos utilizando a plataforma construída neste trabalho. Além disso deve-se levar em consideração os modos de operação e volume dos ensaios. O maior resultado obtido para produção de PCA foi de 9.882,0 mg/L (Jin K. et al, 2015), porém o autor lançou mão de uma série de modificações em linhagem patogênica, além de ter conduzido o cultivo em biorreator dotado de controle de pH e concentração de oxigênio dissolvido (que são impraticáveis em escala de shaker). Ademais, operou o reator no sistema de batelada alimentada, que favorece grandemente a obtenção de maiores concentrações finais de produto. Assim, do ponto de vista de processo, um próximo passo importante para incrementos na



produção de PCA seria o aumento na escala de cultivo para reatores de bancada operados em batelada alimentada, para avaliar o desempenho e parâmetros cinéticos da melhor linhagem produtora em condições mais favoráveis de cultivo.

Conclusões

Em linhas gerais, a partir dos resultados e discussões levantadas, foi possível delimitar uma série de conclusões. De diferentes maneiras, os alvos estudados impactaram significativamente a produção de PCA. Essa variação decorreu do tipo de alvo sendo superexpresso, ora apresentando melhores resultados, ora piorando a produção da molécula alvo. Além disso, é importante destacar a versatilidade oferecida pelo uso dos vetores *ePathBrick*. Eles possibilitaram a obtenção de alto número de clones recombinantes positivos em diferentes etapas dos experimentos de construção plasmidial. Tal facilidade fez com que não fosse despendido muito tempo e recursos para repetição de experimentos, facilitando o processo como um todo.

Especificamente em relação a superexpressão do gene *ppsA*, este prejudicou a produção de PCA além do crescimento celular, frente a uma possível sobrecarga metabólica e mal

aproveitamento do substrato utilizado no cultivo. Ainda que fosse esperado que a configuração em pseudo-operon se apresentasse mais vantajosa em relação a monocistrônica, não foram observados resultados significativos para distinguir a real diferença entre as duas construções na produção de PCA.

Por fim, a escolha do alvo *tktA* se mostrou extremamente satisfatória. Houve grande aumento do $Y_{p/s}$, importante parâmetro cinético do processo, 272% maior em relação ao valor encontrado para a linhagem parental. Com os valores de concentração de biomassa e μ_{max} de 0,62 h^{-1} encontrados para a *tktA* muito próximos aos encontrados para a linhagem parental, conclui-se que a modificação não afetou o crescimento celular. Finalmente, a superexpressão individual do alvo promoveu um impressionante aumento de 178% na produção de PCA (763 mg/L), em comparação com a linhagem parental de *E. coli* QH4 (275,5 mg/L).

Bibliografia

Askitosari, T. D., Boto, S. T., Blank, L. M., & Rosenbaum, M. A. (2019). Boosting Heterologous Phenazine Production in *Pseudomonas putida* KT2440 Through the Exploration of the Natural Sequence Space. *Frontiers Media SA*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01990>



Cheluvappa, R. (2014). Standardized chemical synthesis of Pseudomonas aeruginosa pyocyanin. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.001>

Chincholkar, S., & Thomashow, L. (Orgs.). (2013). Microbial Phenazines. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40573-0>

da Silva, A. J., Cunha, J. de S., Hreha, T., Micocci, K. C., Selistre-de-Araujo, H. S., Barquera, B., & Koffas, M. A. G. (2021). Metabolic engineering of E. coli for pyocyanin production. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.01.002>

Fang, Y.-L., Cui, Y., Zhou, L., Thawai, C., Naqvi, T. A., Zhang, H.-Y., & He, Y.-W. (2021). H-NS family protein MvaU downregulates phenazine-1-carboxylic acid (PCA) biosynthesis via binding to an AT-rich region within the promoter of the phz2 gene cluster in the rhizobacterium Pseudomonas strain PA1201. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.09.006>

Huang, Q., Lin, Y., & Yan, Y. (2013). Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing Escherichia coli strain. Wiley. <https://doi.org/10.1002/bit.24988>

Hucetogullari, D., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2019). Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1090-4>

Jin, K., Zhou, L., Jiang, H., Sun, S., Fang, Y., Liu, J., ... He, Y.-W. (2015). Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of Pseudomonas aeruginosa strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.003>

Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., & Thomashow, L. S. (2001). Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/jb.183.21.6454-6465.2001>

Mavrodi, D. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M., & Thomashow, L. S. (1998). A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by Pseudomonas fluorescens 2-79. American Society for



Microbiology.

<https://doi.org/10.1128/jb.180.9.2541-2548.1998>

Pierson, L. S., III, & Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3>

Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (1998). Examples of Pathway Manipulations: Metabolic Engineering in Practice. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012666260-3/50007-8>

Weiner, M., Albermann, C., Gottlieb, K., Sprenger, G. A., & Weuster-Botz, D. (2014). Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant Escherichia coli. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.12.001>

Xu, P., Vansiri, A., Bhan, N., & Koffas, M. A. G. (2012). ePathBrick: A Synthetic Biology Platform for Engineering Metabolic Pathways in E. coli. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/sb300016b>

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelas agências FAPESP e CNPQ.

Agradecimento

Agradeço à minha mãe, a grande potencializadora de todos os meus sonhos, às agências de fomento FAPESP e CNPQ e meu orientador Adilson José da Silva. Deixo aqui um agradecimento especial ao Josivan de Souza Cunha, co-autor, que após meses de luta contra o câncer, não pôde mais estar presente para celebrar os frutos desta pesquisa. Dedico o trabalho a este meu grande amigo e excelente cientista!

Sustancias Bioactivas de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat: Aislamiento, Biodisponibilidad y Actividad Biológica de Compuestos Galoileados.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Sustancias Bioactivas de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat: Aislamiento, Biodisponibilidad y Actividad Biológica de Compuestos Galoileados.

Autor: Araújo, Verena; varaujo@nutricion.edu.uy

Co-autor(es): Mastrogiovanni, Mauricio; maurimastro@fmed.edu.uy

Tutor/es: Radi, Rafael; rradi@fmed.edu.uy; Carrau, Francisco; fcarrau@fq.edu.uy

Universidad de la República

Resumen

Las semillas de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat han sido destacadas por su elevado contenido de taninos. Se evidenció que esta variedad presenta alta expresión de epicatequina galoil transferasa, enzima responsable de la reacción de galoileación, por lo tanto, presenta de forma distintiva a otras variedades, un elevado contenido de flavan-3-oles galoileados. Si bien la ingesta de catequinas está asociada a una mejora en la función endotelial vascular y protección frente a enfermedades cardiovasculares, las catequinas galoileadas podrían explicar efectos diferenciales vinculados al vino Tannat. El orujo es un subproducto del proceso de vinificación compuesto por piel y semillas. Considerando la alta concentración de polifenoles galoileados presentes en semillas, este subproducto tiene interés de estudio. Dado esto, nos propusimos evaluar el impacto de la galoileación sobre la actividad biológica de flavan-3-oles de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat. Con ese objetivo, se caracterizaron y cuantificaron flavan-3-oles en el orujo de Tannat, y se estudiaron en células, algunos de los roles biológicos de estos compuestos. En macrófagos se demostró que las catequinas y catequinas galoileadas disminuyen la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno, siendo mayor esta disminución para las galoileadas. En células endoteliales se evidenció que el tratamiento con flavan-3-oles galoileados, resultó en una mayor protección frente a flujos de oxidantes generados endógenamente. En conclusión, los flavan-3-oles galoileados del orujo de Tannat podrían representar una fuente de bioactivos que permita valorizar un desecho de la industria vitivinícola.

Palabras clave: *Vitis vinífera* L. cv. Tannat, polifenoles, flavan-3-oles, epicatequina, catequina, epicatequina galoileada, compuestos galoileados, orujo.



1. Introducción

La variedad de uva *Vitis vinífera* L. cv. Tannat es considerada la variedad insigne del Uruguay por su buena adaptación a las condiciones climáticas, habiendo sido introducida al país por inmigrantes vascos-franceses en 1870. Actualmente, Uruguay es el país con mayor extensión de cultivos de esta variedad de *Vitis* en el mundo, y estos cultivos han impulsado las exportaciones de la industria vitivinícola nacional transformándose en su producto emblema (Boido et al. 2011; Da Silva et al. 2013). Esta variedad es la predominante en el territorio nacional y sus cultivos se extienden a lo largo del país, con excepción del departamento Río Negro. Actualmente, está presente en el 27% de los viñedos, destacándose aún más en el sur del país (Bertola et al. 2021).

Vitis Tannat ha sido caracterizada por su elevado contenido de taninos, presentes en cáscaras y sobre todo en semillas de la uva. Estos compuestos son de interés de estudio, no solo por los aportes organolépticos a sus productos derivados, sino también por su correlación con la salud cardiovascular y la longevidad humana (Boido et al. 2011; Karas, Ulrichová, & Valentová 2017).

Este proyecto toma como antecedentes el estudio realizado por el equipo de investigación de Facultad de

Química, dentro del cual participa el Prof. Dr. Francisco Carrau, en el que se caracterizaron y cuantificaron los compuestos polifenólicos presentes en extractos de cáscara y semillas frescas de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat. En dicho estudio se observó que semillas de esta variedad tienen alto contenido de flavan-3-oles, también llamados flavanoles (Boido et al. 2011).

Estructuralmente los flavan-3-oles son la subclase más compleja de flavonoides, que van desde monómeros simples como la catequina (C) y epicatequina (EC) hasta oligómeros y polímeros llamados proantocianidinas. Las proantocianidinas más comunes son las que están formadas únicamente por monómeros de C y EC, conocidas como procianidinas (Figura 1) (Fraga 2009). Se reportó que la cantidad de flavan-3-oles en las semillas de la variedad Tannat es de 1946 ± 195 mg/kg, siendo esta cantidad más alta que en otras variedades de *Vitis*, por ejemplo, tiene 6 veces más que la variedad Pinot Noir (317mg/Kg) y 34 veces más que Cabernet (57,7mg/kg) (Boido et al. 2011; Mattivi et al. 2009). Los flavan-3-oles pueden sufrir reacciones de esterificación e hidroxilación con el ácido gálico (AG, 3,4,5-trihidroxibenzoico), dando lugar a la formación de compuestos galoileados, tales como catequina galoileada (CG) y

epicatequina galoileada (ECG) (Figura 2) (Fraga 2009).

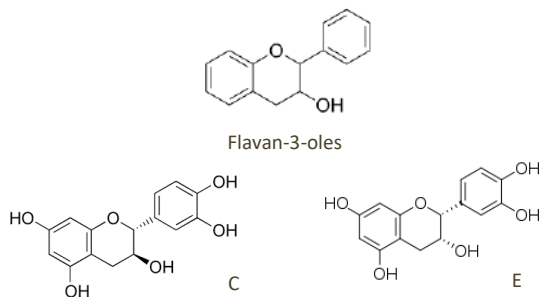


Figura 1. Estructura general de flavan-3-oles y sus formas monoméricas. C-Catequina. E-Epicatequina. Adaptado de (Fraga 2009).

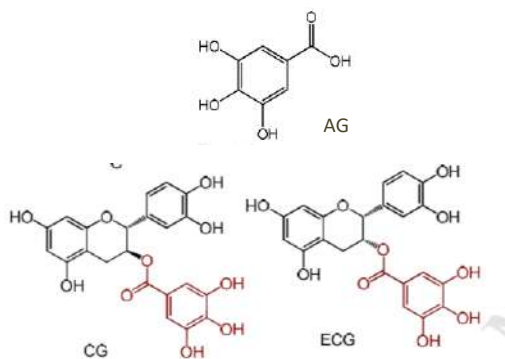


Figura 2. Estructura del ácido gálico y catequinas galoileadas. AG – Ácido gálico. CG- Catequina galoileada. ECG- Epicatequina galoileada. Adaptado de (Karas et al. 2017).

Las reacciones de galoileación modifican propiedades físico-químicas de los compuestos la actividad quelante de hierro y la reactividad con biomoléculas con actividad redox (por ejemplo: tocoferol), entre otras. En consecuencia, la galoileación de flavan-3-oles puede tener como resultado cambios en la bioactividad de estos flavonoides (Iglesias et al. 2010; Pazos et al. 2009).

A partir de la secuenciación del genoma de *Vitis* Tannat y de la caracterización de los diferentes polifenoles contenidos en esta uva, se evidenció elevada actividad de vías de biosíntesis de taninos galoileados en esta variedad. Particularmente *Vitis* Tannat presenta alta expresión de epicatequina galoil transferasa (ECGT), enzima responsable de la reacción de galoileación de polifenoles. Esta misma enzima ha sido purificada en otras especies con elevado contenido de polifenoles galoileados, como en la planta del té (*Camellia sinensis*) (Karas et al. 2017; Liu et al. 2012; Da Silva et al. 2013). Las uvas Tannat presentan de forma distintiva a otras variedades, alto contenido de taninos galoileados, los cuales se encuentran principalmente en las semillas y representan un 40% del total de los flavan-3-oles ($752 \pm 78\text{mg/kg}$) (Boido et al. 2011).

Se ha estudiado la relación entre el consumo de uvas o extracto de sus semillas y los beneficios en la salud humana. Estos productos se han usado para el tratamiento de enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, hipertensión e hiperlipidemia (Guilford & Pezzuto 2011). En el mismo sentido, los efectos de los flavonoides en la salud han sido ampliamente estudiados (Corder et al.



2006). Se ha reportado que la ingesta elevada de polifenoles, principalmente C, está asociada a una mejora en la función endotelial vascular y protección frente a las enfermedades cardiovasculares (Boido et al. 2011; Steffen et al. 2008). Cabe destacar que las CG en comparación con las C, presentan mayor protección frente al daño oxidativo celular y actividad antiinflamatoria, así como mayor protección frente algunos tipos de cáncer (INAVI (Instituto Nacional de Vitivinicultura) 2020; Lizarraga et al. 2007; Lizárraga et al. 2008; Verma, Singh, & Mishra 2013).

El orujo de uva Tannat es un subproducto del proceso de vinificación compuesto por piel y semillas de uvas principalmente, y de acuerdo a lo reportado se generan 20.000 toneladas por año en nuestro país (Ministerio de Industria 2020; Puyares, Ares, & Carrau 2010; Da Silva et al. 2013). Por tanto, es un subproducto que se genera en grandes volúmenes. Se han propuesto diferentes alternativas para la valorización del orujo, como su uso en compostaje, uso para alimento en ganado y más recientemente, la extracción de compuestos bioactivos, lo que le da un valor agregado a este residuo (Le Floch, Jourdes, & Teissedre 2015; Rockenbach et al. 2012a). Un estudio realizado con extractos de orujo de otras variedades de *Vitis vinifera*, tales como Zinfandel, Pinot

Noir, Sangiovese, Negroamaro y Cabernet Sauvignon, identificó la presencia de AG, C, EC, así como dímeros y trímeros de ECG y CG (Rockenbach et al. 2012a). Dado esto y los efectos biológicos previamente reportados para estos compuestos, se estudiaron *in vitro* los posibles efectos en la salud del extracto de orujo de *Vitis Tannat* (Fernández-Fernández et al. 2019). En consiguiente, y considerando las elevadas concentraciones de compuestos galoileados en semillas de esta variedad, hace que el orujo de Tannat tenga gran relevancia de estudio (Boido et al. 2011).

Si bien existen numerosos reportes sobre los beneficios de los compuestos polifenólicos, los mecanismos de acción de los polifenoles aún no han sido completamente elucidados (Rendeiro, Rhodes, & Spencer 2015). A su vez, la mayoría de los estudios han sido realizados *in vitro*, lo cual no considera el efecto que pueden tener la biodisponibilidad y el metabolismo de los compuestos sobre la relevancia fisiológica de estos hallazgos. Por esta razón, muchos de los efectos reportados podrían no relacionarse con lo que pueda ocurrir *in vivo*, debido a que metabolitos de compuestos polifenólicos presentes en la circulación son el resultado del proceso digestivo, el metabolismo hepático y



colónico, y difieren estructuralmente de los polifenoles dietéticos originales. (Manach et al. 2004; Williamson & Clifford 2010).

Durante la absorción, los polifenoles que son metabolizados en el intestino delgado y luego en el hígado, pueden sufrir modificaciones adicionales dando lugar a metabolitos sulfatados, glucuronidados y/o metilados (Crozier, Del Rio, & Clifford 2010; Del Rio et al. 2013). En un estudio realizado a partir de la ingesta de té verde, se encontraron un total de veinte metabolitos en plasma, principalmente E y epigallocatequina (EGC) en las formas metiladas, sulfatadas y glucuronidadas (Stalmach et al. 2009). Sin embargo, no hay estudios similares *in vitro* o *in vivo* para orujo de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat.

La vida media de los polifenoles en plasma no ha sido registrada con exactitud, pero se estima que se encuentra en el orden de dos o tres horas para los flavan-3-oles, excepto para la epigallocatequina gallato (EGCG), que se elimina más lentamente, posiblemente por una mayor interacción con proteínas plasmáticas (Kuo 1998; Lee et al. 2002).

Algunos estudios demuestran que posterior a la absorción intestinal de polifenoles, varios de sus metabolitos alcanzan concentraciones sanguíneas suficientes como para ser relacionados a

los efectos biológicos evidenciados *in vivo* para compuestos como: AG, E, C y EGC (Borges et al. 2013; Pimpão et al. 2015).

En este proyecto es de interés dilucidar la biodisponibilidad y biotransformación de las CG. Si bien existen estudios principalmente enfocados a la EGCG, la cual se encuentra en alta concentración en el té verde, las CG presentes en elevada concentración en *Vitis vinífera* Tannat, no han sido estudiadas en profundidad. De esta manera, compuestos como ECG, tanto en formas monoméricas como oligoméricas, podrían estar relacionadas a los efectos protectores para la salud vinculados a esta cepa (Boido et al. 2011; Luo et al. 2020).

Dado todo lo mencionado, en este proyecto se propuso explorar la ruta de galoileación *in vivo* de catequinas galoileadas encontradas en la variedad *Vitis vinífera* L. cv. Tannat, así como su posible rol biológico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Explorar la ruta de galoileación de polifenoles en *Vitis vinífera* L. cv. Tannat y el posible rol biológico de estos compuestos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Identificar flavan-3-oles presentes en extractos de semillas de orujo de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat.



2.2.2. Detectar y cuantificar en un modelo animal flavan-3-oles galoileados y sus metabolitos, posterior a la administración oral de un extracto.

2.2.3. Estudiar el efecto de flavan-3-oles galoileados en la modulación del estrés oxidativo celular.

3. Materiales y métodos

3.1. Preparación de extractos

Las semillas se separaron manualmente a partir del orujo, se congelaron y se liofilizaron. La humedad fue calculada por diferencia de peso antes y después de la liofilización. Las semillas se molieron y se realizaron extracciones orgánicas de acuerdo a un método previamente publicado (Boido et al. 2011; García-Marino et al. 2006), usando tres concentraciones de EtOH:H₂O (30:70% v/v, 50:50% v/v y 70:30% v/v). Se partió de 10g de semillas molidas, se dejó *overnight* bajo agitación, a 4°C tapadas de la luz, con 100ml de EtOH. El extracto obtenido fue centrifugado, rotaevaporado y liofilizado. El procedimiento se repitió 2 veces y los extractos secos fueron combinados (Figura 3).

3.2. Identificación de flavan-3-oles presentes en extractos de semillas de orujo de *Vitis vinífera* Tannat

La caracterización y cuantificación fue realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un

espectrómetro de masa híbrido triple cuadrupolo con trampa de iones (HPLC-MS/MS), usando curvas de calibración de los estándares EC, ECG, C y AG. Se usó una columna de fase reversa Supelcosil LC-18 (150 x 3 mm, 3 μm). Las fases móviles empleadas fueron (A) H₂O con 0,1% ácido fórmico y (B) Acetonitrilo, y la elución se realizó usando un gradiente lineal de 15 % a 50 % de B en A, durante 11 minutos. El flujo usado fue de 500 μL / min.

3.3. Detección y cuantificación en un modelo animal flavan-3-oles galoileados y sus metabolitos, posterior a la administración oral de un extracto.

3.3.1 Modelo animal

Se utilizan ratas macho Sprague-Dawley de 8 semanas de edad, que pesan entre 200-250g. El protocolo que se utiliza en los experimentos con animales es aprobado por Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República.

3.3.2. Extracción orgánica en plasma de ratas

Para poner a punto la metodología de detección y cuantificación de flavan-3-oles, se llevó a cabo la extracción orgánica en plasma de ratas, previamente enriquecidos con estándares de estos compuestos. Para eso, se adaptó un

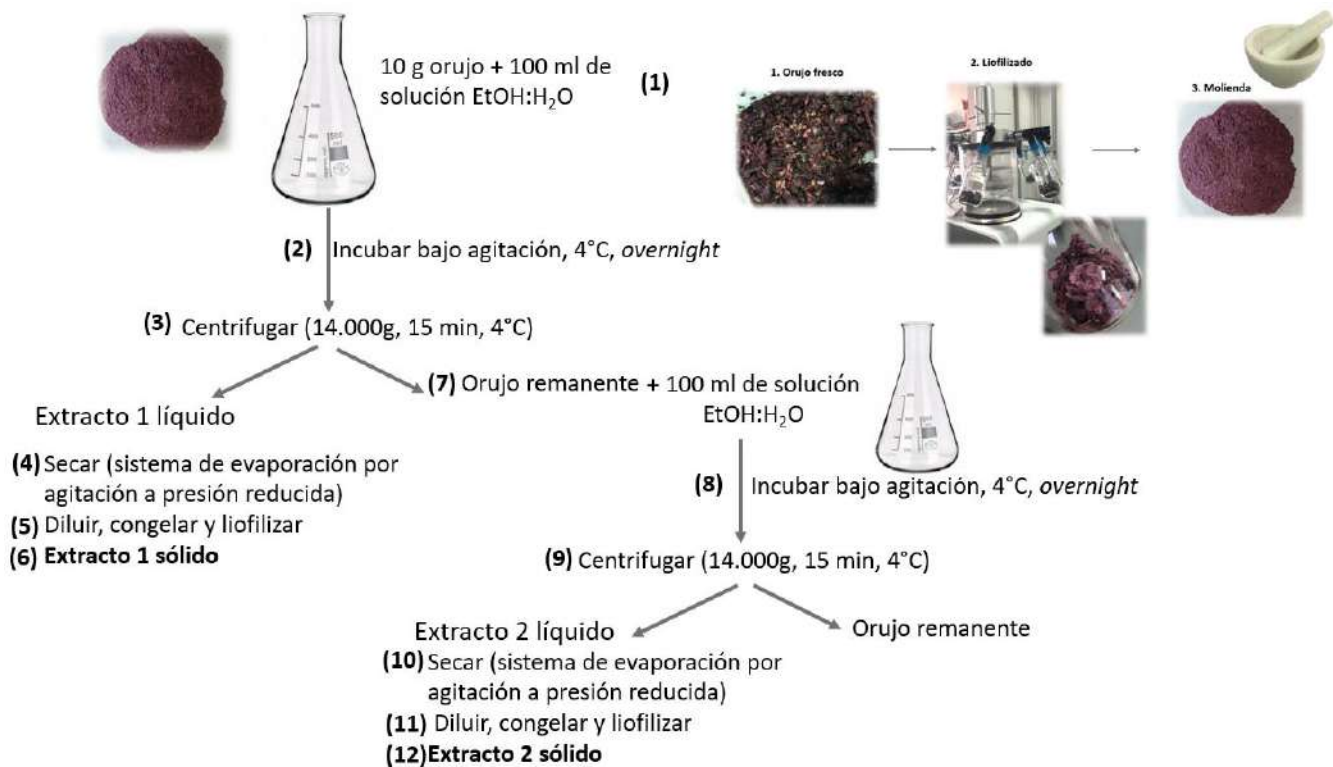


Figura 3. Esquema del proceso de elaboración de extractos Tannat. Este proceso se llevó a cabo con las tres concentraciones de EtOH:H₂O (30:70% v/v, 50:50% v/v y 70:30% v/v).

protocolo previamente publicado (Kohri, Suzuki, & Nanjo 2003). El plasma de rata (500µL) se suplementó con 103µM de E, 67,8µM de ECG y 164µM de AG. Se realizó un ajuste a pH 5 con Buffer Acetato de Sodio (pH 3, 0,2 M) con 1% de ácido ascórbico y 0,15mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se agregó acetato de etilo (2:1 v/v), se vortexeó (20 segundos) y centrifugó las muestras (20 segundos). Se recolectó la fase orgánica (800µL). Esto se repitió cuatro veces. Posteriormente se concentraron las fracciones mediante secado, usando un sistema de evaporación

por agitación a presión reducida con el equipo RapidVap Vacuum System (50 minutos, 35°C, 200mBar, 80% velocidad). Luego, las muestras se resuspendieron en 500 µL de EtOH:H₂O (15:85 % v/v) y se analizaron mediante HPLC-MS/MS. El método utilizado fue el mismo que el descripto para el objetivo específico 1.

3.3.3. Administración de extracto

Se administra el extracto de orujo de *Vitis Tannat* obtenido de acuerdo a la metodología explicitada en el punto 3.1. Esto se lleva a cabo mediante un protocolo previamente publicado (Rodríguez Lanzi et al. 2018a). Para eso, se administran 300mg



de extracto/kg de peso, disueltos en EtOH:H₂O (50:50% v/v) mediante sonda oroesofágica.

3.3.4. Detección y cuantificación en plasma flavan-3-oles galoileados y sus metabolitos

Se realizan extracciones de sangre a diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 3, 6 y 24 horas) posterior a la administración de los extractos. Las muestras obtenidas se centrifugan para la obtención del plasma. Posteriormente se realiza una extracción orgánica con acetato de etilo (2:1 v/v), las muestras se concentran mediante secado y se resuspenden en EtOH:H₂O (15:85 % v/v) para ser analizadas (Kohri et al. 2003). Los flavan-3-oles y sus formas galoileadas contenidas en los extractos, así como sus metabolitos se caracterizan y cuantifican mediante HPLC-MS/MS. Se utiliza el mismo método que el descrito para el objetivo específico 1.

3.4. Estudio del efecto de flavan-3-oles galoileados en la modulación del estrés oxidativo celular.

3.4.1. Cultivos de células

Se utilizaron dos modelos celulares, cultivo de macrófagos de línea celular (J774A.1) y cultivo de células endoteliales de aorta bovina (BAECs). Ambos cultivos estuvieron en 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) comercial (1.0 g/L de glucosa, 100 U/mL penicilina, 100

µg/mL estreptomycin) y 10 % suero bovino fetal (SBF) inactivado mediante calor (a 56°C por 20 minutos). Se conservaron en estufa de cultivo a 37°C, 5% CO₂, en frascos de cultivo de 25 cm² o en placas de Petri de 10mm².

Los experimentos se realizaron en placas de 6 o 24 pocillos usando el *buffer* Dulbecco's PBS (dPBS: 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 1.45 mM H₂PO₄, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) suplementado con 5,5 mM glucosa y 1 mM L-arginina, *buffer* Fosfato Salino (PBS) o en medio de cultivo DMEM. Las células fueron contadas utilizando la cámara de Neubauer.

3.4.2. Actividad de NADPH oxidasa 2 (NOX2) en J774A.1

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos (80% confluencia) e incubadas con diferentes concentraciones (0; 2,5; 5 y 10 µM) de EC o ECG *overnight* (Steffen et al. 2007a, 2008).

Para medir la actividad de la NOX2, las células fueron lavadas con PBS y activadas con éster de forbol PMA (8µg/ml en dimetil sulfoxido, DMSO). La actividad de la enzima NOX2 se determinó mediante la formación de radical superóxido (O₂^{•-}) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂, producto de dismutación espontánea) mediante luminiscencia del reactivo Luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona), 100

μM (Radi et al. 1990; Zymosan 1995). La actividad de la NOX2 se determinó considerando la condición PMA como el 100% de actividad (porcentaje de máxima luminiscencia). Se incluyó una condición control que correspondió a células sin tratar con PMA y una condición control negativo, que se utilizó Difeniliodonio (DPI, inhibidor de la NOX2), 100 μM , en el mismo momento que se incubó con PMA.

3.4.3. Ensayo de viabilidad celular en BAECs.

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (80% confluencia) e incubadas con 10 μM de EC o ECG *overnight*, y con 2,3-dimethoxy-1,4-naphthalenedione (DMNQ) a diferentes concentraciones (0; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 μM). DMNQ es un agente de *redox cycling* que produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ en diferentes compartimentos celulares (Quijano et al. 2007; Steffen et al. 2008). Se incluyó una condición control (sin DMNQ). La viabilidad celular fue establecida mediante conteo de células vivas usando una cámara de Neubauer, considerando como 100% de viabilidad celular las BAECs no expuestas a DMNQ.

4. Resultados y discusión

4.1. Características del orujo Tannat

En cuanto a la composición del orujo, casi el 46% se compone por semillas y el restante por cáscaras y escobajos (Tabla 1). Respecto a la humedad de las

semillas presentes en el orujo, es de un 65% (Tabla 2). El rendimiento obtenido para las 3 extracciones fue muy similar, siendo en promedio 12,1% (Tabla 3). La primera extracción tuvo un mayor rendimiento (8,6%) respecto a la segunda (3,5%), para todos los extractos.

Tabla 1- Composición del orujo Tannat

	Masa (g)	% orujo fresco
Orujo	235,0	100,0
Cáscara + Escobajos	127,2	54,1
Semillas	107,9	45,9

Tabla 2- Humedad en semillas (%) de orujo Tannat

	Masa (g)	% humedad
Semillas pre-liofilización	107,87	65,3
Semillas post-liofilización	70,40	

Tabla 3- Rendimiento de extracciones de orujo Tannat

Extracto Tannat	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% rendimiento
EtOH:H₂O 30:70% v/v	10	1,17	11,7
EtOH:H₂O 50:50% v/v	10	1,25	12,5
EtOH:H₂O 70:30% v/v	10	1,23	12,3

4.2. Identificación de flavan-3-oles presentes en extractos de semillas de orujo de *Vitis vinifera* L. cv. Tannat.



Se identificaron y cuantificaron en los 3 extractos realizados, los compuestos polifenólicos E, C, AG y ECG, tal como se muestra en la Tabla 4. La selección de los compuestos cuantificados fue de acuerdo a su interés por su elevada concentración en esta variedad y por los efectos biológicos previamente reportados (Boido et al. 2011; Heiss et al. 2005; Steffen et al. 2007b, 2008). La EC fue el flavan-3-ol que se extrajo en mayor concentración, seguido de su isómero C. En menor concentración, fueron identificados el AG y la ECG para todos los extractos. Esto tiene relación con lo reportado anteriormente para orujos de otras variedades, que si bien tienen un procesamiento de maceración en donde muchos de sus compuestos polifenólicos son extraídos, otros permanecen en este subproducto tal como se ha reportado para otras variedades de *Vitis*, como Pinot Noir, Negro Amaro, Cabernet Sauvignon, Primitivo, Isabel, Sangiovese y Merlot (Rockenbach et al. 2012b; Rodriguez Lanzi et al. 2018b). A su vez, también está vinculado con lo reportado para semillas de uva Tannat, en donde la E se encuentra en mayor concentración seguido de la C. En este mismo estudio se caracterizaron y cuantificaron flavan-3-oles galoileados, reportándose que el 40% del total de flavan-3-oles son galoileados (Boido et al. 2011). En el orujo también se pudo

identificar la presencia de ECG. Considerando la caracterización de las semillas de la uva Tannat y la similitud con el orujo, posiblemente en éste, también se encuentren dímeros, trímeros y tetrámeros galoileados, pero no fueron analizados en este trabajo.

Cabe mencionar que, si bien el rendimiento de extracción (en peso seco) fue similar para los tres tipos de extractos, se encontró mayor concentración de los flavan-3-oles cuantificados en el extracto realizado con EtOH:H₂O (30:70% v/v), lo que indica una mayor eficiencia y selectividad de extracción para los compuestos de interés.

4.3. Detección y cuantificación en un modelo animal flavan-3-oles galoileados y sus metabolitos, posterior a la administración oral de un extracto.

4.3.1. Extracción orgánica en plasma de ratas

La extracción orgánica realizada permitió recuperar todos los compuestos polifenólicos presentes en el plasma de rata. Como se muestra en la Tabla 5, esta recuperación tuvo diferentes % de rendimiento para cada uno de los estándares. Este rendimiento fue de 67,9% para la E, 41,2% para la ECG y 7,4% para el AG. Dado esto, al momento de cuantificarse el contenido de flavan-3-oles en el plasma, posterior a la administración



del extracto de *Vitis Tannat*, deberán considerarse los diferentes rendimientos de extracción para cada uno de los compuestos.

Los estudios farmacocinéticos de flavan-3-oles en animales están siendo desarrollados en este momento por lo que los resultados no estuvieron disponibles al momento de cierre del presente llamado. Sin embargo, prevemos contar con los mismos próximamente.

4.4. Estudio del efecto de flavan-3-oles galoileados en la modulación del estrés oxidativo celular.

4.4.1. Actividad de NADPH oxidasa 2 (NOX2) en J774A.1

Las células activadas con PMA presentaron mayor luminiscencia, lo cual se traduce en mayor formación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Figura 4). La incubación *overnight*

con concentraciones crecientes de E o ECG disminuyó la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 de forma dosis-dependiente, en células activadas con PMA, lo que podría estar implicando la inhibición de la NOX2.

Comparando la condición de células tratadas únicamente con PMA con las tratadas con EC ó ECG, la disminución en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se observó principalmente para células incubadas con 10 μM de E ó ECG (Figura 4A y 4B). Esto está relacionado con lo reportado anteriormente para flavan-3-oles, en donde se demostró que la incubación con 10 μM de E *overnight* en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) disminuyó la producción de $O_2^{\cdot-}$. En este mismo estudio se observó la presencia de dos metabolitos metilados de la E posterior

Tabla 4- Cuantificación de flavan-3-oles presentes en Extractos Tannat mediante HPLC-MS/MS

Compuestos	Extracto 30% EtOH (mg /kg semilla)	Extracto 50% EtOH (mg /kg semilla)	Extracto 70% EtOH (mg /kg semilla)
Epicatequina	3124,3 ± 463,0	1117,3 ± 89,1	2033, ± 488,7
Catequina	2438,1 ± 303,8	874,8 ± 113,0	1575,4± 341,9
Ácido gálico	345,1 ± 31,8	220,3 ± 7,4	204,9 ± 41,7
Epicatequina Gallato	108,8 ± 15,8	60,9 ± 5,5	74,4 ± 16,3

Los valores se muestran como la media ± el desvío estándar (DS), las réplicas experimentales fueron n=2.

Tabla 5- Cuantificación de flavan-3-oles presentes en extracción orgánica en plasma mediante HPLC-MS/MS

Compuestos	Ci (μM)	Cf (μM)	% rendimiento
E	103,0	69,9	67,9
ECG	67,8	27,9	41,2
AG	164,0	12,1	7,4
AC	189,0	63,0	33,3

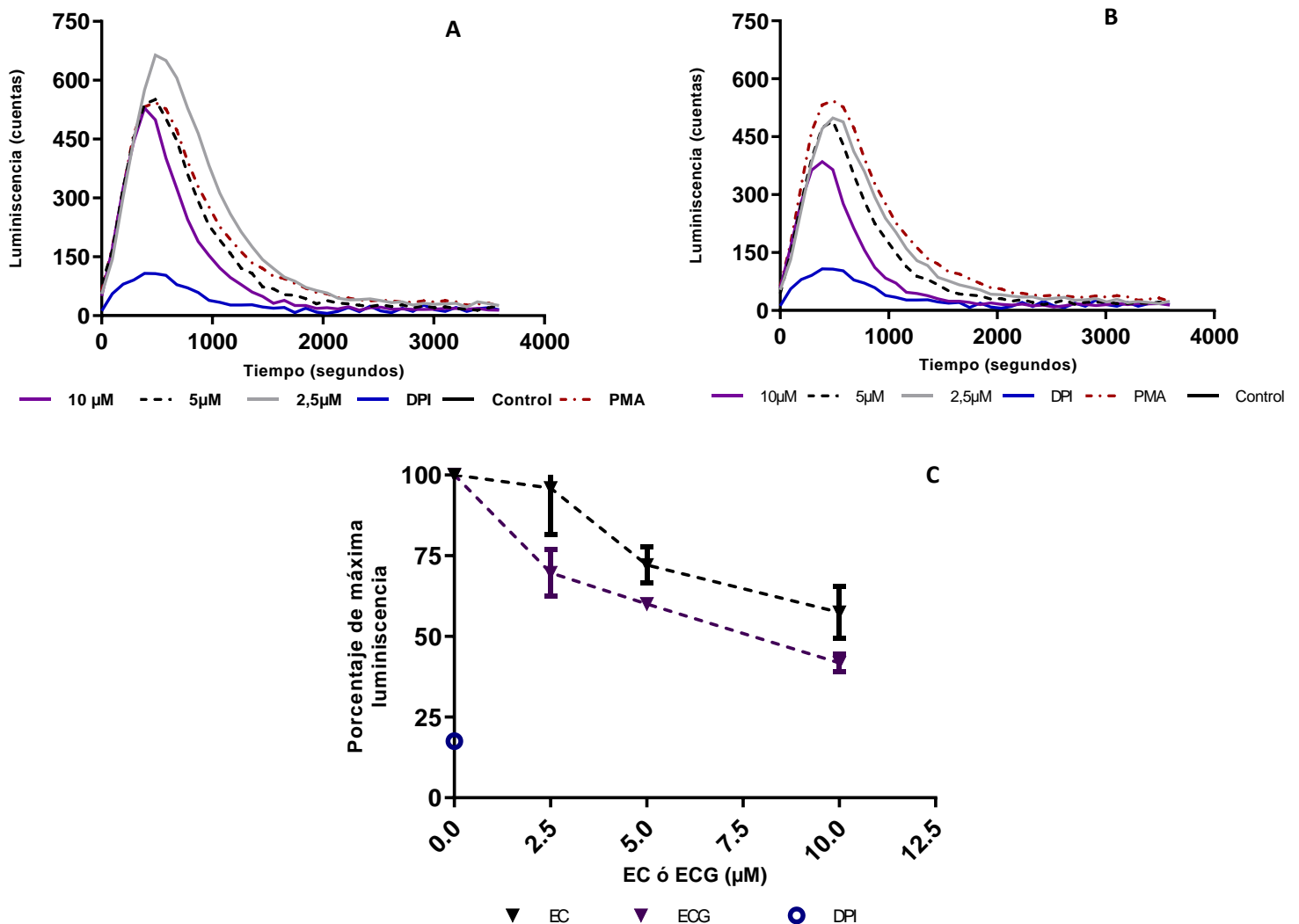


Figura 4 – Dosis respuesta de Epicatequina (E) y Epicatequina galoileada (ECG) sobre la inhibición de la NOX2. Macrófagos J77A.1 fueron tratados con diferentes concentraciones de E (A) ó ECG (B) *overnight* a 37°C. Luego se activaron con PMA (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se incluyó una condición control sin PMA y una condición DPI (100 μM). La formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ fue medida siguiendo la oxidación del Luminol (100 μM), en un lector de luminiscencia en placa durante 1 hora. Las réplicas experimentales fueron n=3. (C) Considerando el área bajo la curva para cada condición (cuentas), se calculó como porcentaje (%) de máxima luminiscencia la condición PMA (100%), y en base a este, se calculó el % de luminiscencia para las otras condiciones.



a la incubación *overnight* con E (3-y4-O-metil epicatequina), los cuales inhibieron a la NADPH oxidasa 1 (NOX1) en este modelo celular (Steffen et al. 2008). Por lo que, la disminución en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 podría asociarse también a metabolitos metilados de la E y ECG, los cuales podrían inhibir la NOX2.

Como se observa en la Figura 4C, respecto a la condición de máxima luminiscencia (PMA), el tratamiento con E o ECG disminuyó la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 de manera dosis-dependiente, pero este resultado fue más marcado para macrófagos incubados con ECG. Esto podría estar vinculado a reportes anteriores, los cuales indican que las CG podrían presentar mayores efectos biológicos en comparación con las no galoileadas, tales como mayor protección frente al daño oxidativo celular, actividad antiinflamatoria y protección frente algunos tipos de cáncer (Lizarraga et al. 2007; Lizárraga et al. 2008; Verma et al. 2013)

4.4.2. Ensayo de viabilidad celular en BAECs.

La viabilidad celular disminuyó dosis-dependiente en células expuestas a DMNQ, y ésta se incrementó en células tratadas con EC ó ECG, viéndose mayor viabilidad celular con 5 y 10 μ M para ambos flavan-3-oles (Figura 5). Según reportes

anteriores, este resultado podría estar vinculado al aumento de la actividad de enzimas antioxidantes. En uno de estos estudios se observó qué, en células vasculares de músculo liso (vSMC) tratadas con concentraciones entre 20-50 μ M de ECG, aumentó significativamente la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Yu et al. 2021). Así mismo, en otro estudio también se observó qué, en moscas *Drosophila melanogaster* suplementadas con extracto de té verde, con concentraciones conocidas de flavan-3-oles galoileados, hubo un incremento de la actividad de dos enzimas antioxidantes, SOD y Catalasa (Li et al. 2007).

Como se observa en la figura 5, la viabilidad celular fue mayor en BAECs tratadas con ECG respecto a las tratadas con EC, lo cual tiene concordancia con la mayor protección que podrían tener los flavan-3-oles galoileados en comparación con los no galoileados (Lizarraga et al. 2007; Lizárraga et al. 2008; Verma et al. 2013).

5. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo caracterizamos y cuantificamos flavan-3-oles de importancia biológica en el orujo de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat. De los 3 extractos generados, se concluye que el extracto con 30% de EtOH es el que tiene mayor concentración de los compuestos de interés, destacando la

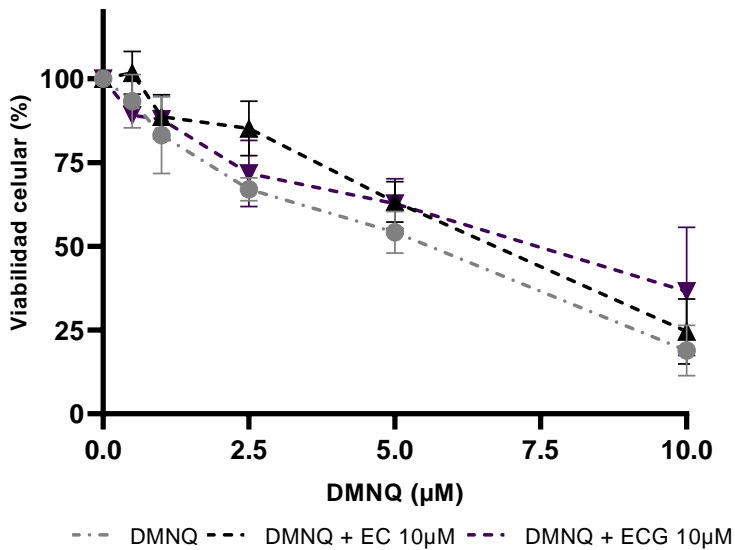


Figura 5- Viabilidad celular en BAECs tratadas con DMNQ. BAECs fueron incubadas con EC o ECG (10 µM) y concentraciones crecientes de DMNQ, *overnight* a 37°C. Se incluyó una condición control (sin DMNQ) que se consideró como 100% de viabilidad celular. La viabilidad celular fue establecida mediante conteo de células vivas utilizando una cámara de Neubauer. Las réplicas experimentales fueron n=3.

presencia de E y ECG.

En este estudio también concluimos que las C y CG disminuyen la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en macrófagos, siendo este efecto mayor para CG. Posiblemente, dicho efecto está vinculado a la disminución de actividad de la NOX2. También determinamos en células endoteliales que, la viabilidad celular es mayor en células tratadas con flavan-3-oles frente a la exposición a DMNQ, y que este resultado es mayor para flavan-3-oles galoileados. Esto podría estar vinculado a

una mayor expresión de enzimas antioxidantes, tales como la SOD y Catalasa.

Como perspectivas de este trabajo, nos planteamos la detección y cuantificación de flavan-3-oles galoileados no monoméricos en el orujo de Tannat, que se han reportado para semillas de uva Tannat. Así mismo, la detección y cuantificación de flavan-3-oles galoileados y sus metabolitos en plasma de rata. Sumado a esto, nos planteamos dilucidar los mecanismos de los flavan-3-oles galoileados en la modulación del estrés oxidativo celular.

Finalmente, con este proyecto tenemos dos propósitos, los cuales están directamente vinculados al Programa de Alimentos y Salud Humana (PAyS) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO). Por un lado, desarrollar un nutracéutico rico en flavan-3-oles galoileados elaborado a partir del orujo de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat, para darle valor agregado a un subproducto de la industria que actualmente es de desecho. Por el otro, la potencial suplementación de alimentos con extractos ricos en flavan-3-oles galoileados derivados del orujo de *Vitis vinífera* L. cv. Tannat .

6. Financiamiento

Este proyecto ha sido financiado con alcúotas del Programa de Desarrollo



de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), con el apoyo de beca de maestría de la Comisión Académica de Posgrados (CAP) y con el Programa de Alimentos y Salud Humana (PAyS), IDB - R.O.U. (4950/OC-UR).

7. Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), a la Comisión Académica de Posgrados (CAP – Universidad de la República), al Programa de Alimentos y Salud Humana (PAyS), así como al Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina, al área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología Alimentos de la Facultad de Química y al Departamento de Alimentos de la Escuela de Nutrición, de la Universidad de la República (UdelaR). De la misma manera agradecen al Dr. Adrián Aicardo y la Dra. Cecilia Chavarría del Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina, por el continuo apoyo brindado.

Bibliografía

Bertola, Bettina, Andres Crovetto, Yanet Secco, & Leonardo Bertola. 2021. “Estadísticas de Viñedos 2021, Datos Nacionales.” *Instituto Nacional de*

Vitivinicultura 65.

- Boido, E., M. García-Marino, E. Dellacassa, F. Carrau, J. C. Rivas-Gonzalo, & M. T. Escribano-Bailón. 2011. “Characterisation and Evolution of Grape Polyphenol Profiles of Vitis Vinifera L. Cv. Tannat during Ripening and Vinification.” *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17(3):383–93. doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00164.x.
- Borges, Gina, Michael E. J. Lean, Susan A. Roberts, & Alan Crozier. 2013. “Bioavailability of Dietary (Poly)Phenols: A Study with Ileostomists to Discriminate between Absorption in Small and Large Intestine.” *Food and Function* 4(5):754–62. doi: 10.1039/c3fo60024f.
- Corder, R., W. Mullen, N. Q. Khan, S. C. Marks, E. G. Wood, M. J. Carrier, & A. Crozier. 2006. “Oenology: Red Wine Procyanidins and Vascular Health.” *Nature* 444(7119):566. doi: 10.1038/444566a.
- Crozier, Alan, Daniele Del Rio, & Michael N. Clifford. 2010. “Bioavailability of Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds.” *Molecular Aspects of Medicine* 31(6):446–67. doi: 10.1016/j.mam.2010.09.007.
- Fernández-Fernández, Adriana Maite, Amaia Iriondo-DeHond, Eduardo



- Dellacassa, Alejandra Medrano-Fernandez, & María Dolores del Castillo. 2019. “Assessment of Antioxidant, Antidiabetic, Antiobesity, and Anti-Inflammatory Properties of a Tannat Winemaking by-Product.” *European Food Research and Technology* 245(8):1539–51. doi: 10.1007/s00217-019-03252-w.
- Le Floch, Alexandra, Michael Jourdes, & Pierre Louis Teissedre. 2015. “Polysaccharides and Lignin from Oak Wood Used in Cooperage: Composition, Interest, Assays: A Review.” *Carbohydrate Research* 417:94–102. doi: 10.1016/j.carres.2015.07.003.
- Fraga, Cesar G. 2009. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*.
- García-Marino, Matilde, Julián C. Rivas-Gonzalo, Elena Ibáñez, & Concepción García-Moreno. 2006. “Recovery of Catechins and Proanthocyanidins from Winery By-Products Using Subcritical Water Extraction.” *Analytica Chimica Acta* 563(1-2 SPEC. ISS.):44–50. doi: 10.1016/j.aca.2005.10.054.
- Guilford, Jacquelyn M., & John M. Pezzuto. 2011. “Wine and Health: A Review.” *American Journal of Enology and Viticulture* 62(4):471–86. doi: 10.5344/ajev.2011.11013.
- Heiss, Christian, Petra Kleinbongard, André Dejam, Sandra Perré, Hagen Schroeter, Helmut Sies, & Malte Kelm. 2005. “Acute Consumption of Flavanol-Rich Cocoa and the Reversal of Endothelial Dysfunction in Smokers.” *Journal of the American College of Cardiology* 46(7):1276–83. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.055.
- Iglesias, Jacobo, Manuel Pazos, Salomé Lois, & Isabel Medina. 2010. “Contribution of Galloylation and Polymerization to the Antioxidant Activity of Polyphenols in Fish Lipid Systems.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(12):7423–31. doi: 10.1021/jf100832z.
- INAVI (Instituto Nacional de Vitivinicultura). 2020. “Estadísticas de Viñedos 2020 Datos Nacionales.” 2020:65.
- Karas, Daniel, Jiřka Ulrichová, & Kateřina Valentová. 2017. “Galloylation of Polyphenols Alters Their Biological Activity.” *Food and Chemical Toxicology* 105:223–40. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.021.
- Kohri, Toshiyuki, Masayuki Suzuki, & Fumio Nanjo. 2003. “Identification of Metabolites of (-)-Epicatechin Gallate and Their Metabolic Fate in the Rat.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18):5561–66. doi:



- 10.1021/jf034450x.
- Kuo, Chen. 1998. “Of Tea Catechins Amounts.” *Prevention* 7:351–54.
- Lee, Mao Jung, Pius Maliakal, Laishun Chen, Xiaofeng Meng, Flordeliza Y. Bondoc, Saileta Prabhu, George Lambert, Sandra Mohr, & Chung S. Yang. 2002. “Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate by Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability.” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 11(10):1025–32.
- Li, Yuk Man, Ho Yin Edwin Chan, Yu Huang, & Zhen Yu Chen. 2007. “Green Tea Catechins Upregulate Superoxide Dismutase and Catalase in Fruit Flies.” *Molecular Nutrition and Food Research* 51(5):546–54. doi: 10.1002/mnfr.200600238.
- Liu, Yajun, Liping Gao, Li Liu, Qin Yang, Zhongwei Lu, Zhiyin Nie, Yunsheng Wang, & Tao Xia. 2012. “Purification and Characterization of a Novel Galloyltransferase Involved in Catechin Galloylation in the Tea Plant (*Camellia Sinensis*).” *Journal of Biological Chemistry* 287(53):44406–17. doi: 10.1074/jbc.M112.403071.
- Lizarraga, D., C. Lozano, J. J. Briedé, J. H. Van Delft, S. Touriño, J. J. Centelles, J. L. Torres, & M. Cascante. 2007. “The Importance of Polymerization and Galloylation for the Antiproliferative Properties of Procyanidin-Rich Natural Extracts.” *FEBS Journal* 274(18):4802–11. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06010.x.
- Lizárraga, Daneida, Sonia Touriño, Fernando J. Reyes-Zurita, Theo M. De Kok, Joost H. Van Delft, Lou M. Maas, Jacco J. Briedé, Josep J. Centelles, Josep L. Torres, & Marta Cascante. 2008. “Witch Hazel (*Hamamelis Virginiana*) Fractions and the Importance of Gallate Moieties - Electron Transfer Capacities in Their Antitumoral Properties.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(24):11675–82. doi: 10.1021/jf802345x.
- Luo, Dan, Jianping Xu, Xuejiao Chen, Xu Zhu, Shuang Liu, Jie Li, Xinting Xu, Xiao Ma, Jinhua Zhao, & Xu Ji. 2020. “(-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Attenuates Salt-Induced Hypertension and Renal Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats.” *Scientific Reports* 10(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-020-61794-6.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, & Liliana Jiménez. 2004. “Polyphenols: Food Sources and Bioavailability.” *American Journal of*



- Clinical Nutrition* 79(5):727–47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
- Mattivi, F., U. Vrhovsek, D. Masuero, & D. Trainotti. 2009. “Differences in the Amount and Structure of Extractable Skin and Seed Tannins amongst Red Grape Varieties.” *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15(1):27–35. doi: 10.1111/j.1755-0238.2008.00027.x.
- Ministerio de Industria, Energía y Minería. 2020. “Economía Circular y Cambio Climático.” 88.
- Pazos, Manuel, Josep Lluís Torres, Mogens L. Andersen, Leif H. Skibsted, & Isabel Medina. 2009. “Galloylated Polyphenols Efficiently Reduce α -Tocopherol Radicals in a Phospholipid Model System Composed of Sodium Dodecyl Sulfate (Sds) Micelles.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11):5042–48. doi: 10.1021/jf900437m.
- Pimpão, Rui C., M. Rita Ventura, Ricardo B. Ferreira, Gary Williamson, & Claudia N. Santos. 2015. “Phenolic Sulfates as New and Highly Abundant Metabolites in Human Plasma after Ingestion of a Mixed Berry Fruit Purée.” *British Journal of Nutrition* 113(3):454–63. doi: 10.1017/S0007114514003511.
- Puyares, Victoria, Gastón Ares, & Francisco Carrau. 2010. “Searching a Specific Bottle for Tannat Wine Using a Check-All-That Apply Question and Conjoint Analysis.” *Food Quality and Preference* 21(7):684–91. doi: 10.1016/j.foodqual.2010.05.008.
- Quijano, Celia, Laura Castro, Gonzalo Peluffo, Valeria Valez, & Rafael Radi. 2007. “Enhanced Mitochondrial Superoxide in Hyperglycemic Endothelial Cells: Direct Measurements and Formation of Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 293(6):3404–14. doi: 10.1152/ajpheart.00761.2007.
- Radi, Rafael, Homero Rubbo, Leonor Thomson, & Eugenio Prodanov. 1990. “Luminol Chemiluminescence Using Xanthine and Hypoxanthine as Xanthine Oxidase Substrates.” *Free Radical Biology and Medicine* 8(2):121–26. doi: 10.1016/0891-5849(90)90084-V.
- Rendeiro, Catarina, Justin S. Rhodes, & Jeremy P. E. Spencer. 2015. “The Mechanisms of Action of Flavonoids in the Brain: Direct versus Indirect Effects.” *Neurochemistry International* 89:126–39. doi: 10.1016/j.neuint.2015.08.002.
- Del Rio, Daniele, Ana Rodriguez-Mateos, Jeremy P. E. Spencer, Massimiliano



- Tognolini, Gina Borges, & Alan Crozier. 2013. “Dietary (Poly)Phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects against Chronic Diseases.” *Antioxidants and Redox Signaling* 18(14):1818–92. doi: 10.1089/ars.2012.4581.
- Rockenbach, Ismael Ivan, Elvira Jungfer, Christina Ritter, Beatrix Santiago-Schübel, Björn Thiele, Roseane Fett, & Rudolf Galensa. 2012a. “Characterization of Flavan-3-Ols in Seeds of Grape Pomace by CE, HPLC-DAD-MS n and LC-ESI-FTICR-MS.” *Food Research International* 48(2):848–55. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.001.
- Rockenbach, Ismael Ivan, Elvira Jungfer, Christina Ritter, Beatrix Santiago-Schübel, Björn Thiele, Roseane Fett, & Rudolf Galensa. 2012b. “Characterization of Flavan-3-Ols in Seeds of Grape Pomace by CE, HPLC-DAD-MS n and LC-ESI-FTICR-MS.” *Food Research International* 48(2):848–55. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.001.
- Rodriguez Lanzi, Cecilia, Diahann J. Perdicaro, Andrea Antonioli, Patricia Piccoli, Marcela A. Vazquez Prieto, & Ariel Fontana. 2018a. “Phenolic Metabolites in Plasma and Tissues of Rats Fed with a Grape Pomace Extract as Assessed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 651(April):28–33. doi: 10.1016/j.abb.2018.05.021.
- Rodriguez Lanzi, Cecilia, Diahann J. Perdicaro, Andrea Antonioli, Patricia Piccoli, Marcela A. Vazquez Prieto, & Ariel Fontana. 2018b. “Phenolic Metabolites in Plasma and Tissues of Rats Fed with a Grape Pomace Extract as Assessed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 651(April):28–33. doi: 10.1016/j.abb.2018.05.021.
- Da Silva, Cecilia, Gianpiero Zamperin, Alberto Ferrarini, Andrea Minio, Alessandra Dal Molin, Luca Venturini, Genny Buson, Paola Tononi, Carla Avanzato, Elisa Zago, Eduardo Boido, Eduardo Dellacassa, Carina Gaggero, Mario Pezzotti, Francisco Carrau, & Massimo Delledonne. 2013. “The High Polyphenol Content of Grapevine Cultivar Tannat Berries Is Conferred Primarily by Genes That Are Not Shared with the Reference Genome.” *Plant Cell* 25(12):4777–88. doi: 10.1105/tpc.113.118810.



- Stalmach, Angélique, Stéphanie Troufflard, Mauro Serafini, & Alan Crozier. 2009. “Absorption, Metabolism and Excretion of Choleadi Green Tea Flavan-3-Ols by Humans.” *Molecular Nutrition and Food Research* 53(SUPPL. 1):44–53. doi: 10.1002/mnfr.200800169.
- Steffen, Yvonne, Claudia Gruber, Tankred Schewe, & Helmut Sies. 2008. “Mono-O-Methylated Flavanols and Other Flavonoids as Inhibitors of Endothelial NADPH Oxidase.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469(2):209–19. doi: 10.1016/j.abb.2007.10.012.
- Steffen, Yvonne, Tobias Jung, Lars Oliver Klotz, Tankred Schewe, Tilman Grune, & Helmut Sies. 2007a. “Protein Modification Elicited by Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL) in Endothelial Cells: Protection by (-)-Epicatechin.” *Free Radical Biology and Medicine* 42(7):955–70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.024 .
- Steffen, Yvonne, Tobias Jung, Lars Oliver Klotz, Tankred Schewe, Tilman Grune, & Helmut Sies. 2007b. “Protein Modification Elicited by Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL) in Endothelial Cells: Protection by (-)-Epicatechin.” *Free Radical Biology and Medicine* 42(7):955–70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.024 .
- Verma, Sharad, Amit Singh, & Abha Mishra. 2013. “Gallic Acid: Molecular Rival of Cancer.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35(3):473–85. doi: 10.1016/j.etap.2013.02.011.
- Williamson, Gary, & Michael N. Clifford. 2010. “Colonic Metabolites of Berry Polyphenols: The Missing Link to Biological Activity?” *British Journal of Nutrition* 104(SUPPL.3):48–66. doi: 10.1017/S0007114510003946.
- Yu, Jinjin, Weifeng Li, Xin Xiao, Qiuxia Huang, Jiabao Yu, Yajie Yang, Tengfei Han, Dezhu Zhang, & Xiaofeng Niu. 2021. “(-)-Epicatechin Gallate Blocks the Development of Atherosclerosis by Regulating Oxidative Stress in Vivo and in Vitro.” *Food and Function* 12(18):8715–27. doi: 10.1039/d1fo00846c.
- Zymosan, Opsonized. 1995. “Lum i No1 - Enhanced C Hemi I Umi Nescence after Reaction of Hydroperoxides With.” (April 1994):71–76.

Análisis de Estilos de Aprendizaje Mediante Minería de Datos



C.29. Tecnologías de la Información y la Comunicación

Análisis de Estilos de Aprendizaje Mediante Minería de Datos

Autores: López Maldonado, Vladimir; vlopezmaldonado@fpune.edu.py,

Appleyard Arguello, Guadalupe Verónica; gappleyard4@gmail.com.

Profesor/a Guía: Bobadilla, Gabriela Matilde; gaby@fpune.edu.py;

Delgado González, Lourdes Beatriz; lourdes@fpune.edu.py

Resumen

El uso efectivo de las Tecnologías de la Información y la Comunicación (TICs) como recurso didáctico, potencia y consolida la adquisición de competencias en las diferentes áreas del conocimiento y esto en consecuencia mejora el rendimiento académico de los estudiantes. Ahora bien, las potencialidades ofrecidas por las TICs en algunos casos no son utilizados adecuadamente por el docente, por desconocer como captan la información sus alumnos, esto influye en el tiempo que le lleva a los mismos comprender el contenido desarrollado. El estudio sobre los patrones de aprendizaje, es considerado inicialmente en 1998 por Jan D. Vermunt, en el 2006 es propuesto por Neil Flemming y Collen Mills, un modelo de instrumento para determinar las predicciones de modalidad sensorial al momento de procesar información, al que denominan VARK (Visual, Auditivo, lector-escritor y kinestésico). Actualmente se aplican tecnologías como la del Descubrimiento de Conocimiento de Base de Datos (KDD), proceso utilizado para la identificación de patrones, que conlleva al descubrimiento de conocimiento, una parte de este proceso es la Minería de Datos (MD). Ante lo expuesto, este trabajo identificó patrones de aprendizaje de los alumnos de las carreras de grado de la Facultad Politécnica de la Universidad Nacional del Este (FPUNE), utilizando MD, a través del proceso KDD. Fue elaborado el instrumento VARK en Google Forms, aplicado durante el año 2020 a alumnos de las carreras con énfasis tecnológicos y sociales, los datos obtenidos fueron procesados por el software WEKA, es elegido el algoritmo Simple k-Means de clustering de MD, creando modelo de patrones, donde los estudiantes de las áreas tecnológicas han presentados un estilo de aprendizaje predominante kinestésico y lecto/escritura y los estudiantes del área social presentan un patrón predominante de lecto/escritura y auditiva.

Palabras clave: Descubrimiento de Conocimiento de Base de Datos, Minería de Datos, Estilos de Aprendizaje



Introducción

Las TICs ha avanzado vertiginosamente por lo que su uso es parte de la sociedad, esto ha generado grandes cambios en todos los ámbitos, y una de las áreas que ha sufrido grandes modificaciones es la educación. La incorporación de la TICs, a la educación se ha convertido en un proceso, cuya implicación, va mucho más allá de las herramientas tecnológicas que conforman el ambiente educativo, se habla de una construcción didáctica y la manera como se pueda construir y consolidar un aprendizaje significativo en base a la tecnología, en estricto pedagógico se habla del uso tecnológico a la educación. Las TICs aporta recursos que generan nuevas estrategias de organización visual, mental y cognitiva, que potencian, así como también consolidan la adquisición de competencias en las diferentes áreas del conocimiento, siempre que sean ajustadas a las condiciones y características de cada una de ella (Lacera Padilla, Orella Parra, & Cortez, 2018) .Ante estas potencialidades ofrecidas a la educación por la TIC, su uso efectivo como recurso pedagógico ayudaría al docente, para esto es importante reconocer el tipo de aprendizaje característico de su grupo de alumnos (Bahamón Muñetón, Vianchá Pinzón, Alarcón, & Bohórquez Olaya, 2012).

La academia realiza de manera constante

aportes para potenciar las capacidades de los estudiantes, para la mejora de su rendimiento académico, y uno de ellos es el estudio sobre patrones de aprendizaje, que es considerado inicialmente en 1998 Jan D. Vermunt (L. Espinoza-Poves, Miranda-Víl, & Chafloque Céspedes, 2010), que publica su artículo pionero en el que presenta el modelo de patrones de aprendizaje basado en un interés por la regulación de los procesos constructivos que inciden en los resultados de aprendizaje, confirmó la presencia de cuatro componentes clave en la comprensión de los procesos de aprendizaje. Dos de ellos ampliamente estudiados hasta finales de la década de los noventa: las estrategias cognitivas y las motivacionales. El modelo propuesto por Neil Fleming y Collen Mills, quienes terminan en el 2006 de desarrollar un instrumento sencillo a fin de determinar las predicciones de modalidad sensorial al momento de procesar información, al que denominan VARK: Visual, Auditivo, lector-escritor y kinestésico (Pedraza, 2014).

El KDD, a través de sus procesos permite la identificación de un patrón a partir de una base de datos, y con esto ayudar a la toma decisiones con respecto a lo que constituye conocimiento y lo que no lo es. Por lo tanto, el KDD requiere de un amplio y profundo conocimiento sobre un área de estudio.



Una parte del proceso del KDD, es la MD que a través de sus técnicas predictivas y descriptivas aportan al proceso de transformación de los datos a información útil, para lograr describir los patrones comunes de un grupo o la predicción de un determinado evento o acción de un grupo analizado en base a los datos (Pérez López & Santín González, 2010). Se ha empleado en numerosos campos, recientemente, se ha incrementado el interés en utilizar la minería de datos en el área de educación, centrándose en el desarrollo de técnicas de descubrimiento que utilicen los datos para comprender mejor a los estudiantes y el entorno en el que aprenden (Jiménez Galindo & Álvarez García, 2010).

Los estudiantes tienen métodos y estrategias distintas de aprendizaje, por lo que cada uno va captando informaciones de la mejor manera que le resulta aprender. Por otro lado, cada docente tiene distintos métodos de enseñanza. Una problemática surge cuando el profesor desconoce como captan la información sus alumnos, esto influye en el tiempo que los lleva a los mismos comprender el contenido desarrollado.

Ante este problema se planteó las siguientes preguntas:

General

¿Cuáles son los patrones de aprendizaje de alumnos de las carreras de FPUNE?

Específica

¿Cuáles son las características que definen los estilos de aprendizaje?

¿Cuáles son las técnicas de MD utilizados para la identificación de patrones de aprendizaje en un contexto educativo?

El presente trabajo utilizó técnicas de minería de datos, siguiendo la metodología KDD, aplicadas a los datos obtenidos mediante aplicación de un instrumento de captación de estilos de aprendizaje propuestos por Neil Fleming, a los alumnos de la FPUNE durante el año 2020.

Objetivos

General

Identificar patrones de aprendizaje de los alumnos de las carreras de grado de la FPUNE, utilizando Minería de Datos.

Específico

- Comprender los modelos utilizados para reconocer estilos de aprendizaje.
- Seleccionar el instrumento de captación de Estilos de Aprendizaje.
- Aplicar el Instrumento de captación de Estilos de Aprendizaje.
- Comprender las técnicas de MD.
- Seleccionar un software de MD para análisis de los patrones de aprendizaje.
- Preparar los datos.
- Aplicación de las técnicas de MD
- Analizar los resultados

Hipótesis

-El patrón predominante de captación de la

información de los alumnos del área de tecnología es la quinestésica y visual.

-El patrón de aprendizaje de los estudiantes del área social es la lectora y auditiva.

Método

Se realizó una investigación descriptiva, con enfoque cuantitativo, los datos fueron obtenidos en un tiempo único, a través de la aplicación del instrumento de captación de estilos aprendizaje VARK. Posteriormente se prepararon los datos, se aplicaron los algoritmos de MD con el software WEKA y se analizaron los resultados obtenidos, estas actividades se dividieron en seis etapas:

1-Estudio de Estilos de Aprendizaje

Esta etapa inicio con el estudio de los estilos de aprendizaje y se identificaron otros estilos de aprendizajes como: Felder-Silverman, KOLB, CHAEAVAK y VARK (Comparativa de los estilos de aprendizaje en el cuadro). Y fueron seleccionadas las metodologías VARK y CHAEA; por ser las que más empatizan con el objeto de estudio. En la (Tabla. 1) se muestran las diferencias:

	Felder/Silverman	KOLB	VAK	VARK	CHAEA
Variables	4	4	3	4	4
Cantidad de Preguntas	44	9	40	16	80
Observación	Extenso y no quieren responder los alumnos	Orientado a como tratan la información no como peroben.	No lleva en cuenta la Lectura como VARK	El más óptimo a aplicar de acuerdo al estudio.	Extenso y no quieren responder los alumnos

Tabla 1: Comparación de Estilos de Aprendizaje

Elaboración del Instrumento. Se elaboraron los instrumentos con Google Form (Figura. 1), y luego fueron validados aplicando inicialmente a un grupo de control, se observó resistencia en completar el instrumento CHAEA por ser extenso con 80 preguntas; teniendo mayor aceptación la metodología VARK, pues solo cuenta con 16 preguntas respondidas con selección múltiple.



Figura 1: Instrumento VARK en Google Forms

2- Recolección de Datos

Se recolectaron los datos obtenidos de los alumnos de las carreras; tecnológicas



(Licenciatura en Análisis de Sistemas, Ingeniería Eléctrica y de Sistemas y la del área social (Licenciatura en Turismo), desde los instrumentos de la metodología VARK, donde respondieron las 16 preguntas por el formulario online Google Form.

3-Selección del software de Minería de Datos

Se estudiaron softwares libres de Minería de Datos, como R, Rapidminer y Weka, luego de realizar un análisis, se seleccionaron los más utilizados, en la (Tabla. 2) se observa un cuadro comparativo, donde se seleccionó el software WEKA, debido a que presenta manuales instructivos que facilitaron su aprendizaje, así como su gran aceptación como herramienta de aprendizaje en la academia y en los negocios, tiene una comunidad activa.

	Ventaja	Desventaja
Weka	Software Libre. Mucha documentación. Gran Aceptación en otros análisis realizados. Uso académico.	Interpretación gráfica de los resultados
R	Software Libre	Se usa Scripts No dispone de buena documentación como Weka
Rapidminer	Software Libre.	Complejidad de la codificación semántica, es necesario unificar los estándares semánticos. La sintaxis RDF/ZML no es muy fácil de leer

Tabla 2.: Comparación de los Softwares

4- Exploración de los datos

En esta etapa una vez obtenido los resultados de las primeras iteraciones para mayor comprensión se establecen los parámetros que identifican los cuatro estilos de aprendizaje visualizados en la Tabla 3-.

Categoría	1	2	3	4
VARK	V	a	l/e	k
Descripción	Visual	Auditiva	Lectura/escritura	kinestésico

Tabla 3.: Descripción de parámetros VARK para procesar los datos.

Por cada instrumento aplicado lanza un resultado de un conjunto de 4 dígitos que representan las incidencias de los cuatro estilos de aprendizaje que se desea describir, una vez obtenidos esos datos son preparados, a través de la limpieza y corrección, eliminando ruidos, modificando formatos, y completándolos datos faltantes para que puedan ser procesados por WEKA.

5- Análisis de datos

En esta etapa se analizaron los datos, donde se selecciona el algoritmo simple k-means de clustering dividiendo las carreras con énfasis tecnológicos y sociales. Esta técnica crea modelos automáticos a partir del reconocimiento de patrones sobre un conjunto de datos.

6- Preparación de Resultados.

En esta etapa se evaluaron e interpretaron los clustering formados con los estilos de aprendizaje predominantes, luego de realizar varias iteraciones. Para finalmente llegar al resultado que se obtuvieron.

Resultados y Discusión

Resultados

El algoritmo de MD utilizado es el de clustering, simple k-means, con el cual se realizaron varias iteraciones donde se conformaron diferentes cantidades de clústeres para llegar a un resultado comprensible y con menos margen de error tanto en las carreras tecnológicas como en la social. En la (Figura. 2). se presenta los resultados del algoritmo, con 2 clúster, donde el primer clúster está conformado por 102 estudiantes cuyo estilo de aprendizaje es variado con un leve predominio en lecto/escritura y kinestésico que corresponde a los estudiantes de la carrera de Lic. en Análisis de Sistemas. El clúster 1 está conformado por 26 estudiantes también podemos observar un estilo de aprendizaje variado con predominio en kinestésico y lecto/escritura.

Final cluster centroids:

Attribute	Full Data (128.0)	Cluster#	
		0 (102.0)	1 (26.0)
carrera	AS	AS	IS
visual	3.0313	3.2255	2.2692
auditivo	3.6094	3.6373	3.5
lectoescritura	4.7734	4.6961	5.0769
kinestesico	4.5959	4.4412	5.1538

Figura 2: Resultados de Carreras Tecnológicas.

Por otra parte, se analizó la carrera de Lic. en Turismo en la cual se puede observar el resultado con 2 clúster. En el grupo 1 conforman 27 estudiantes, de los cuales los estilos de aprendizaje predominantes son el de lecto/escritura y auditivo, mientras que en el grupo 2 lo componen 17 estudiantes se observa que hay una pequeña variación en los estilos de aprendizaje donde predomina el auditivo y kinestésico (Figura. 3).

Final cluster centroids:

Attribute	Full Data (44.0)	Cluster#	
		0 (27.0)	1 (17.0)
carrera	T	T	T
visual	2.4545	2.7778	1.9412
auditivo	4.3182	3.963	4.8824
lectoescritura	4.9545	5.8519	3.5294
kinestesico	4.2727	3.4074	5.6471

Figura 3: Resultados de Lic. en Turismo.



Discusión

El presente trabajo se inició con el estudio de los estilos de aprendizaje donde fueron seleccionadas las metodologías VARK y CHAEA; por ser las que más empatizan con el objeto de estudio. Posteriormente fueron elaborados los instrumentos con Google Form, y validados, aplicando inicialmente a un grupo de control, se observó resistencia en completar el instrumento CHAEA por ser extenso con 80 preguntas; teniendo mayor aceptación la metodología VARK, que cuenta con 16 preguntas respondidas con selección múltiple. Se recolectaron 172 encuestas durante el año 2020 por alumnos de la FPUNE. Luego se seleccionó el software de Minería de Datos, software WEKA, debido a que es un software libre y de uso académico. Los datos obtenidos son preparados, a través de la limpieza y corrección, eliminando ruidos, modificando formatos, y completando los datos faltantes para que puedan ser procesados en WEKA. Es seleccionado el algoritmo de MD, simple k-means de clustering, dividiendo las carreras con énfasis tecnológicos y sociales. Esta técnica crea modelos automáticos a partir del reconocimiento de patrones sobre un conjunto de datos. Luego de varias interacciones se observa que el primer clúster está conformado por estudiantes

cuyo estilo de aprendizaje es variado con un leve predominio en lecto/escritura y quinestésico que corresponde a los estudiantes de la carrera de Lic. en Análisis de Sistemas. Por otra parte, se analizó la carrera de Lic. en Turismo en la cual se puede observar que los estilos de aprendizaje predominantes son el de lecto/escritura y auditivo.

Se identificó los patrones de aprendizaje de los alumnos de las carreras de grado de la FPUNE, utilizando Minería de Datos.

Donde el patrón predominante de captación de la información de los alumnos del área de tecnología es la quinestésica y visual y el patrón de aprendizaje de los estudiantes del área social es la lectora y auditiva, con lo que comprueba la hipótesis formulada.

Referencias

- Bahamón Muñetón, M. J., Vianchá Pinzón, M., Alarcón, L., & Bohórquez Olaya, C. (2012). Estilos y estrategias de aprendizaje relacionados con el logro académico en estudiantes universitarios. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1657-89612013000100008>
- Jiménez Galindo, A., & Álvarez García, H. (2010). Minería de Datos en la Educación. Obtenido de



"Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



AÑOS

<https://www.it.uc3m.es/jvillena/irc/practicas/10-11/08mem.pdf>

- L. Espinoza-Poves, J., Miranda-Víl, W., & Chafloque Cespedes, R. (2010). Los estilos de Aprendizaje Vark en estudiantes universitarios de las escuelas de negocios. Obtenido de Disponible: <http://www.scielo.org.pe/pdf/pyr/v7n2/a15v7n2.pdf>
- Lacera Padilla, E., Orella Parra, M., & Cortez, G. (2018). Tecnología de la información y comunicación como herramienta para la toma de decisiones en las instituciones educativas en Santa Marta. Obtenido de <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/328/3281312006/index.html>
- Pedraza, M. (2014). Los estilos de aprendizaje Vark. Obtenido de <https://www.orientacionandujar.es/wp-content/uploads/2014/05/los-estilos-de-aprendizaje-VARK.pdf>

DRL for Inter-Slice Resource Allocation in 5G Networks



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



C.29. Tecnologías de la información y comunicación

DRL for Inter-Slice Resource Allocation in 5G Networks

Autor: Lucas Inglés; linglesloggia@gmail.com

Profesor/a guía: Claudina Rattaro, crattaro@fing.edu.uy

Pablo Belzarena, belza@fing.edu.uy

Facultad de Ingeniería, UdelaR

Resumen

La creciente demanda de conectividad se refleja en la insondable cantidad de volúmenes de tráfico y la marcada tendencia a extender el alcance de las redes móviles a otros tipos de consumo.

En función de estas necesidades, los sistemas de quinta generación (5G) de redes móviles se presentan como el nuevo paradigma de las redes de comunicación de 3GPP. Ofrecen una plétora de nuevas características, tales como nueva tecnología de acceso de radio y una amplia gama de servicios. Las redes 5G deben permitir la coexistencia de clientes con diferentes requerimientos de servicio, mientras garantiza la autonomía e independencia entre ellos. Tal escenario de simultaneidad aumenta la complejidad para la asignación de recursos, pues se debe considerar restricciones de servicio diferenciales.

El concepto de *Network Slicing* se presenta como la herramienta clave para abordar este problema. Este implica el particionamiento de los recursos de radio en *slices* con el objetivo de cumplir con el nivel de servicio acordado con cada usuario. Tanto la academia como la industria han dedicado numerosos esfuerzos para resolver el problema de cómo asignar los finitos recursos entre las *slices*.

En este trabajo, se aborda el problema de asignación de recursos entre *slices* mediante la incorporación de técnicas basadas en el estado del arte de *Deep Reinforcement Learning*. En donde se obtiene un algoritmo capaz de realizar de manera óptima la asignación de



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



recursos. Además, se realiza un enfoque novedoso en este contexto, al incorporar a este algoritmo la capacidad de realizar configuración adaptativa de las *slices* a nivel de radio.

Palabras clave: Redes móviles, 5G, Deep Reinforcement Learning, aprendizaje automático



2. Introducción

Desde finales del siglo pasado, la tecnología ha tenido avances significativos en el campo de las telecomunicaciones, impulsado por los grandes avances en la electrónica y el aumento de la capacidad de cómputo. En la mayoría de los países son más los dispositivos que se conectan a la red que personas habitando. Esto, sumado a los cambios en los patrones de consumo, presenta nuevos desafíos que la red debe afrontar.

Inicialmente las redes móviles brindaban servicio de voz sobre su infraestructura. Estas redes fueron evolucionando en función de las necesidades, acompañados por los avances en la electrónica y nuevas tecnologías de radio, a redes proveedoras de servicios de datos. La cuarta generación de redes móviles implicó un gran cambio en este sentido, al ser la primera red diseñada para proveer servicios de datos. Si bien esta tecnología brinda una solución para la conectividad de dispositivos móviles, las necesidades de la industria apuntan a redes más veloces y flexibles.

Se espera que para la presente y siguiente década, las redes celulares 5G

sean la principal infraestructura desplegada. Además de incorporar mejoras significativas en términos de *throughput*, confiabilidad y cantidad de conexiones, el objetivo de 5G es incorporar una profunda transformación en el ecosistema de las redes móviles.

Para incorporar estas características, 5G introduce el novedoso concepto de *network slicing*, el cual permite dividir a la infraestructura en distintas particiones lógicas denominadas *slices*. Asimismo, cada *slice* puede invocar *virtual network functions* corriendo en la misma infraestructura común, y adaptarlos para cumplir con sus propios requerimientos. Entre las principales características de *Network Slicing* se encuentra la posibilidad de personalizar el servicio a distintos grupos de dispositivos (ver figura 2.1), lo cual permite mayor flexibilidad frente a las tecnologías de radio existentes hasta el momento. Sumado a lo anterior, *Network Slicing* tendrá un importante impacto en el modelo de negocio en el ecosistema de las telecomunicaciones, separando a los proveedores de infraestructura de los inquilinos de la red. Los primeros tendrán el despliegue e infraestructura que provee conectividad a los distintos inquilinos, y

estos últimos podrán hacer uso de su porción, agregar sus propias funcionalidades de red y ser proveedores a usuarios finales.

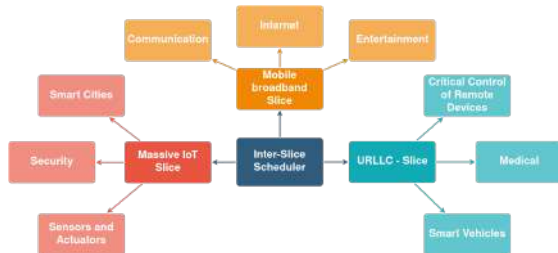


Figura 2.1

Por otra parte, actualmente la comunidad científica y la industria se están inclinando por soluciones basadas en *machine learning*, más específicamente *Reinforcement learning*.

El concepto de *machine learning* está asociado al aprendizaje de datos para realizar predicciones y/o decisiones. Para ello, se basa en probabilidad, estadística y optimización. Puede categorizarse en aprendizaje supervisado, no supervisado y *reinforcement learning*.

El *reinforcement learning* implica obtener una solución (o política) óptima, a partir de la interacción de un *software* al que denominaremos agente que interactúa con el entorno.

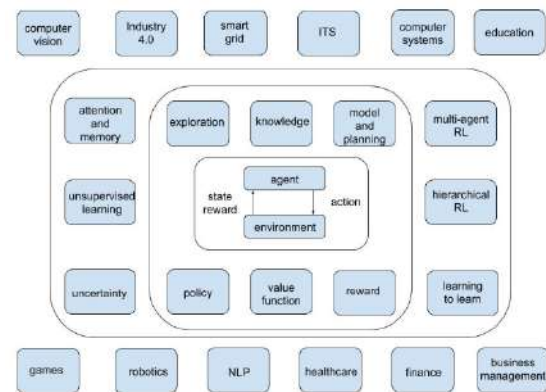


Figura 2.2 extraída de [5]

La obtención de dicha política óptima se dará a través de prueba y error con el entorno, el cual le retribuirá con una recompensa que definirá si dicha interacción es o no conveniente. Es este último método en el cual se desarrollarán las propuestas de esta tesis.

3. Objetivos

Las redes 5G deben asegurar la coexistencia de distintos tipos de servicio en una misma infraestructura. Esto genera un escenario de simultaneidad de requerimientos que la red debe afrontar. Los requerimientos pueden darse en forma de *service level agreement (SLA)* donde los dispositivos deben obtener el nivel de servicio acordado con el proveedor. Este nivel de servicio puede expresarse en diferentes requerimientos, sea *throughput*, *delay*, *packet loss*, etc. Este conjunto de requerimientos van a

definir la calidad de experiencia de los usuarios finales. Para atender a estas necesidades es fundamental incorporar el concepto de *Network Slicing*, en donde se puede definir distintas *slices* para cumplir con los requerimientos de diferentes grupos de usuarios finales.

Es posible visualizar dos niveles de asignación de recursos en las radio bases de 5G. Por un lado, la asignación de recursos de una misma *slice* entre los usuarios finales, a la cual llamaremos asignación *intra-slice*. Este tipo de asignación tiene una granularidad temporal muy pequeña, pero es posible implementarla a través de diversos métodos ya existentes de las anteriores generaciones de redes móviles. Por otro lado, y desde una perspectiva más global, los recursos de la celda deben ser distribuidos entre las distintas *slices*. Cada una de ellas con sus propios requerimientos de servicio. A dicha asignación entre *slices* la denominaremos asignación *inter-slice* y tiene una granularidad temporal muy superior a la asignación *intra-slice*.

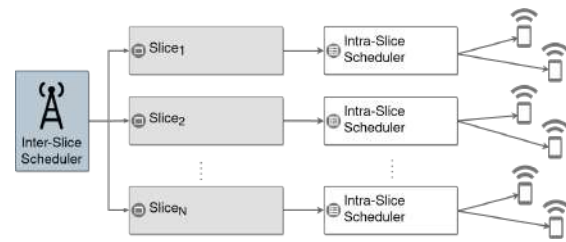


Figura 3.1

La figura 3.1 ilustra el concepto de ambos tipos de asignación.

En este sentido, la asignación *inter-slice* presenta un desafío novedoso, al ser propia de la tecnología 5G y contar con numerosas restricciones. Actualmente existe un considerable esfuerzo por parte de la academia y la industria por obtener un algoritmo eficiente de asignación de recursos *inter-slice*.

En este trabajo de maestría nos enfocamos en el problema de la asignación de recursos *inter-slice* utilizando técnicas de *machine learning*. Además, comparamos las propuestas más relevantes del estado del arte. Y finalmente tomamos lo anterior para formular una propuesta novedosa de asignación en la que se tiene en cuenta la configuración adaptativa de las *slices*. El presente documento expone los resultados obtenidos hasta el momento.

4. Materiales y métodos

Para el desarrollo de la tesis fue importante tener un entorno de simulación de redes 5G que se adapte fielmente al estándar. En este sentido, desarrollamos nuestro trabajo bajo el simulador de código abierto Py5GheSim [4]. Es un simulador de 5G de alto nivel desarrollado en la Facultad de Ingeniería de UdelAR. Permite el desarrollo de *schedulers* y ofrece grandes prestaciones de flexibilidad y *performance*. Sumado a lo anterior, existen varias líneas de investigación dentro de nuestra facultad, en donde se continúa su desarrollo incorporando nuevas características del estándar. Esta herramienta es de especial utilidad al ser de los pocos simuladores que tienen la capacidad de soportar *Network Slicing*.



Figura 4.1

En el código del simulador, en el marco de la tesis implementamos distintas funcionalidades, tales como la definición de perfiles de tráfico. Hemos introducido distintas distribuciones de tamaño de paquetes y distribuciones de tasas de

arribo, con el objetivo de obtener los escenarios más realistas posible.

Es así que, para la obtención de resultados y la propuesta de trabajo, definimos una celda con tres grandes grupos de usuarios, llamados eMBB-1, eMBB-2 y URLLC. Los primeros dos abrevian *enhanced Mobile Broadband* y sus requerimientos tienen un bajo nivel de exigencia hacia la red. Como referencia, un SLA para ver contenido multimedia en alta calidad, puede ser de 5 Mbps. Para eMBB-1 se define un SLA de 2.5Mbps de *throughput* medio mientras que para eMBB-2 un SLA de 7 Mbps de *throughput* medio. Por otra parte, el grupo de usuarios URLLC por *ultra-reliable low latency communications* define a un grupo de usuarios con altos niveles de requerimientos de *throughput*. Este tipo de usuarios está orientado a aplicaciones en la industria que impliquen manejo “instantáneo” de dispositivos a distancia. Para cada grupo de usuarios definimos una slice con los requerimientos que se observan en la tabla 4.1.

Slice	SLA (Mbps)
eMBB-1	2.5
eMBB-2	7
URLLC	16

tabla 4.1

Slice	Tasa de arribos medio (ms)	Tamaño de paquetes medio (bytes)
eMBB-1	6	6000
eMBB-2	25	8000
URLLC	60	100000

Para la obtención de la asignación de recursos *inter-slice* óptima, utilizamos técnicas de *Reinforcement Learning* conjuntamente con redes neuronales, más precisamente *Deep Q-Learning (DQN)*. Este método nos permite obtener un modelo a partir de una numerosa cantidad de experiencias simuladas, que predice la asignación óptima.

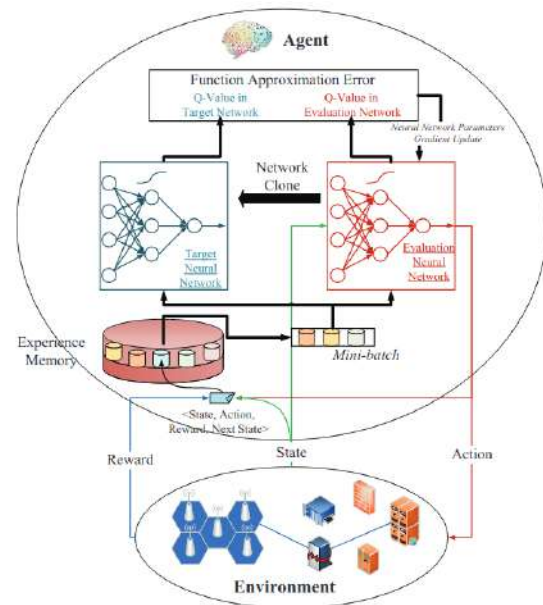


Figura 4.2 extraída de [6]

Utilizar redes neuronales para predecir la función de asignación tiene la virtud de poder obtener modelos que generalicen en entornos de mayor número de estados.

Para la obtención del modelo, el trabajo de tesis se basa fuertemente en el trabajo en [6]. De allí hemos tomado la tupla estado-acción-recompensa como se muestra en la siguiente tabla:

Estado	El número de paquetes arribados en una ventana de tiempo.
Acción	Asignar una distribución de ancho de banda a las <i>slices</i> .
Recompensa	La suma ponderada de la eficiencia espectral de cada <i>slice</i> y la cantidad de usuarios que satisfacen los requerimientos SLA de cada <i>slice</i> .

Tabla 4.2

A partir de lo mencionado anteriormente, se realizaron simulaciones de tráfico y asignación, en base a las cuales nuestro modelo fue aprendiendo una política que maximiza la recompensa de la tabla 4.2. En el caso de DRL, el agente comienza explorando de manera aleatoria la recompensa para distintas acciones. A medida que el tiempo de simulación evoluciona, la acción tomada tiende a ser determinada por el mismo modelo. Es así

que, a través de la experiencia de episodios de asignación, es posible obtener una asignación precisa.

5. Resultados parciales y discusión

Se obtuvo un modelo capaz de predecir la asignación entre *slices* que maximiza la recompensa considerada. Como el tamaño y tasa de arribo de paquetes son procesos estacionarios, la asignación de recursos tenderá a seguir una misma distribución. En la figura 5.1 se puede observar en media la distribución de recursos para cada *slice*.

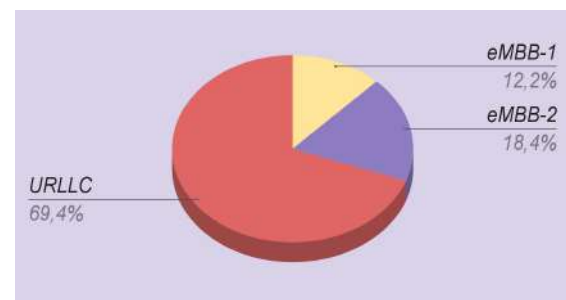


Figura 5.1

Es importante mencionar que el modelo obtenido aplica al escenario descrito, en donde se cuenta con las 3 *slices* con los requerimientos definidos. Sin embargo es rápidamente adaptable a nuevos entornos más complejos.

Asimismo, es posible combinar distintas técnicas de redes neuronales para obtener distintos desempeños, lo cual se continúa estudiando actualmente.



6. Conclusiones y trabajo futuro

Se han obtenido resultados muy positivos al momento: utilizando técnicas básicas de DRL es posible obtener una asignación muy eficiente.

El trabajo de investigación continúa en curso. Se espera investigar distintas técnicas que puedan mejorar la velocidad de aprendizaje del algoritmo.

Sumado a lo anterior, se está trabajando en una modificación del problema planteado, al cual se le incorporará la posibilidad de realizar configuración adaptativa de los parámetros de las *lices*. El problema puede ser formulado de la siguiente forma:

$$\text{argmax}_{(w,s)} \mathbf{E}\{\mathbf{R}(w, s, d)\}$$

$$\begin{aligned} \text{s.t.: } w &= (w_1, \dots, w_N) \\ s &= (s_1, \dots, s_N) \\ d &= (d_1, \dots, d_N) \end{aligned}$$

w_i ~ ith slice bandwidth
 s_i ~ ith slice numerology
 d_i ~ ith user traffic model

El estándar no especifica cómo realizar esta asignación, por lo que da libertad al

proveedor de elegir su propio sistema de asignación. En este sentido, el trabajo abarca temas muy aplicables en el campo de las redes móviles. A su vez, su posible implementación en la industria motiva el desarrollo y la exploración de este tipo de estudios.

Bibliografía

- [1] Caballero, P., Banchs, A., De Veciana, G., & Costa-Pérez. (2017). Multi-tenant radio access network slicing: Statistical multiplexing of spatial loads. 2022
- [2] Li, R., Zhao, Z., Sun, Q., Chih-Lin, I., Yang, C., Chen, X., ... & Zhang, H.. (2018). Deep reinforcement learning for resource management in network slicing. 2022, Sitio web: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8540003/>
- [3] Banchs, A., de Veciana, G., Sciancalepore, V., & Costa-Perez. (2020). Resource allocation for network slicing in mobile networks. 2022 .Sitio web: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/9272281>
- [4] Pereyra, G., Rattaro, C., & Belzarena, P. (2021). A 5G multi-Slice cell capacity framework. In *ACM SIGCOMM 2021*



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Networking Networking Women

Professional Development Workshop

(N2Women'21), online, 23-27 aug, pp 1-3.

ACM.

[5] Li, Y. (2017). Deep reinforcement learning: An overview. *arXiv preprint arXiv:1701.07274*.

[6] Li, R., Zhao, Z., Sun, Q., Chih-Lin, I., Yang, C., Chen, X., ... & Zhang, H. (2018). Deep reinforcement learning for resource management in network slicing. *IEEE Access*, 6, 74429-74441.

Financiamiento

La maestría es financiada por la agencia nacional de investigadores (ANII, <https://www.anii.org.uy/>), en el período de marzo 2021 a marzo 2023.

Agradecimientos

A mis tutores Claudina Rattaro y Pablo Belzarena por acompañarme en el proceso de investigación y motivarme a continuar en esta línea.

Minería de datos aplicada a salud mental en trabajadores
de Tecnología de la Información, Paraguay.



C.29. Tecnologías de la información y comunicación

Minería de datos aplicada a salud mental en trabajadores de Tecnología de la Información, Paraguay.

Autor: Otazú González, Yamila Belén; yamiotazu@fpune.edu.py

Profesor/a guía: Bobadilla de Almada, Gabriela Matilde; gaby@fpune.edu.py; Ayala Díaz, Katia Andrea; katiayala@fpune.edu.py; Delgado González, Lourdes Beatriz; loudel-glzpy@gmail.com

Resumen

En los últimos tiempos los casos de estrés laboral ha aumentado considerablemente especialmente entre los trabajadores de las Tecnologías de la Información (TI) dando lugar a importantes problemas de salud mental relacionados con la presión social y/o laboral forzada por parte de empresas y empleadores para estar actualizados con las nuevas tendencias tecnológicas. El objetivo del trabajo es estimar la frecuencia de trastornos psicológicos en trabajadores del área de trabajo de las TI en base a patrones de salud mental, aplicando técnicas de minería de datos (DM). Se ha aplicado el método denominado descubrimiento de conocimiento en bases de datos (KDD), donde se interpretan los patrones, modelos y análisis de los resultados. Los datos fueron recabados mediante encuesta aplicada a 300 personas validada por los expertos psicólogos. Principales resultados: 1) El 50 % de los empleadores que no brindan recursos para la información de los problemas de salud mental de sus trabajadores piensa que discutir con algunos de sus superiores sobre el tema tendrá una consecuencia negativa dentro del área laboral. 2) El 75 % de quienes piensan que discutir con sus superiores tendrá consecuencia negativa corresponde al sexo masculino. 3) El 78 % de quienes sí están dispuestos a discutir con sus supervisores poseen familiares con antecedentes de problemas de salud mental. Cabe señalar que los resultados expuestos son aún preliminares, y que sigue en curso el trabajo para obtener más información por medio de encuesta.

Palabras claves: Trabajadores de TI, salud mental, minería de datos.

1. Introducción.

La sobre carga laboral en trabajadores de TI hace que aumenten algunos trastornos

psicológicos. Además de la falta de conocimiento en esta área, esto hace que los tra-



bajadores pierdan el entusiasmo por el trabajo. Los trabajadores se enfrentan a cambios continuos y a un ámbito laboral cada vez más exigente, afectando directamente su bienestar psicológico.

Los casos de problema de salud mental tuvieron un incremento en varios países durante la cuarentena por la pandemia del COVID-19. Los estudios encontrados reportan incrementos en síntomas de depresión, ansiedad, estrés postraumático, ideación suicida y problemas de sueño. Las acciones que puedan realizar las universidades en beneficio de la salud mental de sus estudiantes y/o trabajadores en época de pos-pandemia podrían prevenir los efectos psicológicos del COVID-19 y beneficiar el desarrollo de la sociedad (Cobo-Rendón, 2020).

La depresión tiene efectos negativos significativos en el desempeño laboral de los empleados, lo que contribuye al ausentismo de estos. Esta pérdida de rendimiento en el lugar de trabajo a menudo es el resultado de algunos de los síntomas y complicaciones de estos problemas de salud mental (Moral, 2012).

1.1. Objetivos.

1.1.1. Objetivo General.

Estimar la frecuencia de trastornos psicológicos en trabajadores del área de trabajo de las TI en base a patrones de salud mental, aplicando técnicas de minería de datos.

1.1.2. Objetivos Específicos.

1. Identificar patrones de salud mental relacionados a la actividad laboral en tecnologías de la información.
2. Definir los procesos de acondicionamiento de datos.
3. Seleccionar los algoritmos para analizar los datos.
4. Extraer resultados significativos presentes en los datos.

2. Materiales y método.

En el presente trabajo se aplicaron las etapas del proceso denominado Knowledge Discoverd in Database (KDD). En el mismo se explican a continuación las cinco fases del método, que fueron aplicadas a datos provenientes de una encuesta aplicada a una muestra de trabajadores de TI de Paraguay.

Se han aplicado técnicas de minería de datos de los modelos de clasificación los cuales son Decision Tree y Naive Bayes, donde los resultados obtenidos serán interpretados para detectar patrones que permitan efectuar sugerencias para el posterior control de este tipo de enfermedades en los trabajadores.

2.1. Planificación del trabajo.

KDD es básicamente un proceso automático en el que se combinan descubrimiento y análisis. El proceso consiste en extraer patrones en forma de reglas o funciones, a partir de los datos, para que el usuario los

analice (Reyes Saldaña, 2005).

La minería de datos es el núcleo del proceso KDD, que implica la inferencia de algoritmos que exploran los datos, desarrollan el modelo y descubren patrones previamente desconocidos. El modelo se utiliza para comprender fenómenos a partir de los datos, el análisis y la predicción (Maimon, 2009).

A continuación, se presenta los procesos realizados en cada fase del KDD.

2.2. Selección de datos.

Los datos fueron obtenidos a través de una encuesta realizada mediante el formulario de Google los cuales fueron completados por los trabajadores de TI del Paraguay, la encuesta fue validada por psicólogos de la Facultad Politécnica (Fig. 1) del área de bienestar institucional, los datos fueron almacenados en la plantilla electrónica que provee el mismo formulario.



Figura 1. Validación de la encuesta

2.3 Limpieza de datos.

Debido a que en el formulario de la encuesta (Figs. 2 y 3) algunos campos no fueron completados se procedieron a eliminarlos además de cambiar la ciudad de residencia por el departamento ya que de esa forma se logra poder reducir de manera sustancial la cantidad de variables ayudando así a un mejor entrenamiento del algoritmo.



Encuesta de salud mental en tecnología

Con este formulario se quiere realizar un análisis de datos sobre salud mental con algunos algoritmos de Machine Learning, los datos son de forma anónima.

yamila.ota97@gmail.com (no se comparten) Cambiar cuenta

*Obligatorio

Edad *

Tu respuesta

Sexo *

Femenino

Masculino

Otros

Figura 2. Limpieza de datos.

A	B	C	A	B	C
1	Edad	Sexo	1	Edad	Sexo
2	23	Femenino	2	23	Femenino
3	19	Masculino	3	19	Masculino
4	24	Femenino	4	24	Femenino
5	21	Masculino	5	21	Masculino
6	35	Masculino	6	35	Masculino
7	25	Femenino	7	25	Femenino
8	37	Masculino	8	37	Masculino
9	37	Masculino	9	37	Masculino
10	25	Femenino	10	25	Femenino
11	26	Masculino	11	26	Masculino
12	30	Femenino	12	30	Femenino
13	25	Femenino	13	25	Femenino
14	26	Masculino	14	26	Masculino
15	40	Femenino	15	40	Femenino
16	38	Femenino	16	38	Femenino
17	23	Masculino	17	23	Masculino
18	26	Masculino	18	26	Masculino
19	45	Femenino	19	45	Femenino

Figura 3. Limpieza de datos.

2.4. Transformación.

Se procedió a estandarizar todas las variables cuantitativas de las preguntas realiza-

das a través del formulario además de normalizar todas las variables (Fig. 4).

J	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Edad	Sexo	Ciudad de residencia	¿Trabaja de forma independiente?	¿Tiene antecedentes	¿Ha buscado trabajo	¿Tiene una condición	¿Cuántos funcionarios	¿Trabaja de forma no	¿Su empleador es pri	¿Su empleador brinda
2	23	Femenino	Alto Parana	No	No	Si	A veces	Más de 1.000	No	Si	No lo sé
3	19	Masculino	Alto Parana	Si	Si	Si	N/A	1-9	No	No	No lo sé
4	24	Femenino	Alto Parana	No	No	No	N/A	10-25	No	Si	No
5	21	Masculino	Alto Parana	No	No	No	N/A	1-9	No	Si	No lo sé
6	35	Masculino	Central	No	No	No	N/A	101-500	No	No	No lo sé
7	25	Femenino	Alto Parana	No	Si	Si	Con frecuencia	10-25	No	Si	No
8	37	Masculino	Central	No	Si	Si	Nunca	Más de 1.000	No	No	No lo sé
9	37	Masculino	Asuncion	Si	No	No	Nunca	1-9	Si	No	No
10	25	Femenino	Alto Parana	No	No	No	Nunca	Ninguno	Si	No	No
11	26	Masculino	Alto Parana	No	Si	No	N/A	10-25	No	Si	No
12	30	Femenino	Alto Parana	Si	No	No	Casi nunca	1-9	Si	No	No
13	25	Femenino	Alto Parana	No	Si	No	Con frecuencia	1-9	No	Si	No
14	26	Masculino	Alto Parana	No	No	No	N/A	Más de 1.000	No	No	Si
15	40	Femenino	Alto Parana	No	No	No	Casi nunca	Ninguno	No	No	No lo sé
16	36	Femenino	Asuncion	No	No	No	Casi nunca	Más de 1.000	No	Si	No
17	23	Masculino	Alto Parana	No	No	No	N/A	1-9	No	Si	No
18	26	Masculino	Alto Parana	No	Si	No	N/A	1-9	Si	Si	No
19	45	Femenino	Alto Parana	Si	No	Si	A veces	Ninguno	No	No	No
20	26	Masculino	Alto Parana	Si	No	No	Con frecuencia	1-9	No	Si	No
21	24	Femenino	Caaguazú	No	No	Si	A veces	Ninguno	Si	No	No
22	25	Masculino	Alto Parana	No	No	No	Nunca	Ninguno	No	No	No
23	25	Masculino	Alto Parana	Si	No	Si	A veces	1-9	No	Si	No
24	36	Masculino	Asuncion	No	No	No	A veces	Más de 1.000	No	No	No
25	24	Masculino	Alto Parana	No	No	No	Nunca	Ninguno	No	No	No
26	38	Femenino	Alto Parana	No	No	No	Casi nunca	25-100	No	No	Si
27	21	Femenino	Alto Parana	Si	No	No	A veces	Ninguno	No	No	No lo sé
28	46	Femenino	Central	No	No	No	Nunca	10-25	No	No	No
29	26	Masculino	Alto Parana	No	Si	Si	Nunca	25-100	No	No	Si
30	24	Masculino	Alto Parana	Si	Si	Si	Casi nunca	10-25	Si	Si	No
31	24	Femenino	Alto Parana	No	Si	Si	Con frecuencia	10-25	No	Si	No
32	28	Femenino	Alto Parana	No	No	No	N/A	Más de 1.000	No	Si	Si
33	27	Masculino	Alto Parana	No	Si	Si	Casi nunca	1-9	No	Si	No

Figura 4. Tabla de datos.

2.5. Minería de datos.

Se realizaron los modelos predictivos con los algoritmos de clasificación (Fig. 5), los cuales son Decision Tree y Naive Bayes, donde lo que se busca predecir es, si dentro del lugar de trabajo se vio o se escuchó

alguna actividad sospechosa con consecuencias negativas asociadas a los problemas de salud mental.

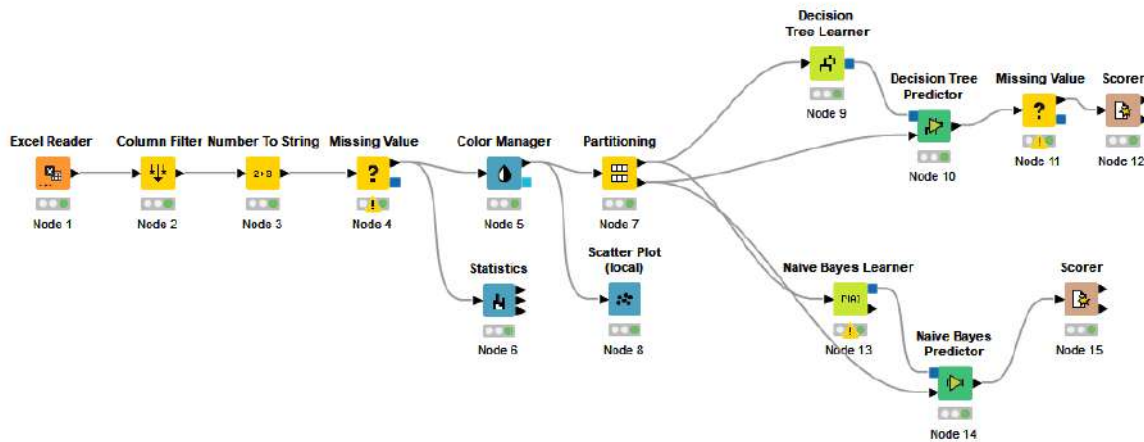


Figura 5. Modelo de los algoritmos utilizados.

Con los algoritmos utilizados se puede observar los patrones y correlaciones, y de esa manera poder predecir con los atributos correspondientes. Dentro del modelo, primeramente se leen los datos desde un archivo CSV para luego pasar por varios filtros nuevamente para que de esa forma el algoritmo produzca mejor resultado, luego se particionan los datos en un 80% para el entrenamiento de los algoritmos que corresponden a 210 registros y un 20% para la prueba de ese entrenamiento previo correspondiente a 90 registros, y por último dentro del modelado se pueden observar los resultados de cada algoritmo aplicado.

2.6. Interpretación y evaluación de resultados.

A través de la herramienta Knime se obtuvieron resultados de forma preliminar. A partir de estos datos se pueden identificar

los patrones de comportamiento de algunos trabajadores de TI con la ayuda de expertos en el área.

3. Resultados y discusión.

Como atributo principal (*target*) se averiguó si se ha oído hablar o si se han observado consecuencias negativas en los compañeros de trabajo con problemas de salud mental. También hay 22 atributos como variables aplicadas a 210 registros para el entrenamiento y 90 registros para la predicción. Se aplicaron dos algoritmos que fueron el árbol de decisión y Naive Bayes.

Árbol de Decisión: se obtuvo un árbol que como nodo inicial es el *target* (Fig. 6). En él se analizó la posibilidad de predecir si se observó o no consecuencias negativas en compañeros laborales considerando el siguiente nodo:

- Si discutir con su empleador tiene consecuencias negativas, a lo cual 34 personas

respondieron que no, 37 tal vez y 19 personas que sí.

El siguiente nodo se centra en las personas cuyas respuestas al nodo anterior fueron tal vez, donde se plantea si estaría dispuesto a discutir con su supervisor, se puede observar que las personas que respondieron no, en mayor cantidad son de sexo masculino. 14 personas respondieron que están dispuestas a discutir con algunos de sus supervisores, en este contexto, en

un 50% de los casos su empleador no proporciona recursos para obtener información sobre el principal tema de investigación que es el problema de salud mental.

- De las 19 personas que respondieron que están dispuestas a discutir con sus empleadores, 15 tienen antecedentes familiares con enfermedades mentales frente a 4 que respondieron que no poseen familiares con algún antecedente.

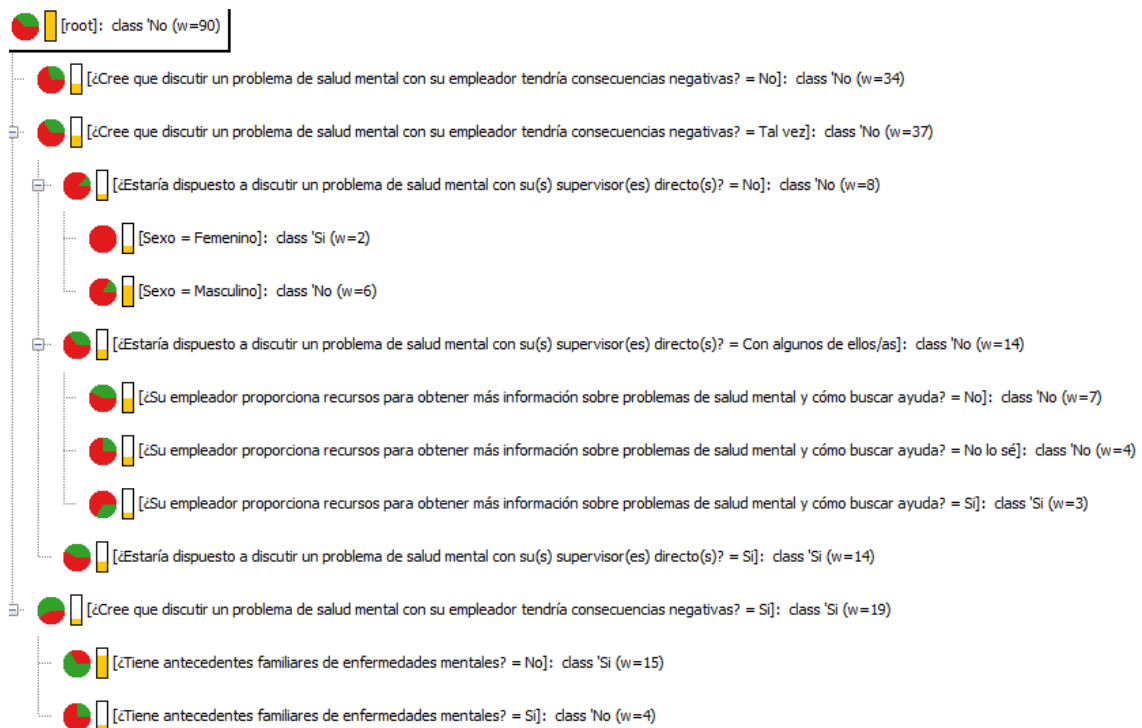


Figura 6. Árbol de decisión simple.

1 Se puede observar en la matriz de confu-
2 sión que fueron clasificadas de forma co-
3 rrecta un 62.921% mientras que un

4 37.079% lo fue de forma incorrecta, corres-
5 pondiendo a 56 correctas y 33 incorrectas.
6 El coeficiente de Kappa obtenido fue 0,21
7 %, este coeficiente mide la correlación de
8 concordancia con los datos recabados

9 hasta el momento, siendo un entrena-
10 miento preliminar ya que es un proyecto
11 que continua en ejecución.

¿Ha oído h...	No	Si
No	39	17
Si	16	17

Correct classified: 56 Wrong classified: 33
Accuracy: 62,921% Error: 37,079%
Cohen's kappa (κ): 0,21%

12

13 Figura 7. Matriz de confusión del árbol de
14 decisión.

15

16 **Naive Bayes:** Para este algoritmo de igual
17 manera se utilizó el mismo *target* donde se
18 obtuvo la siguiente tabla (Fig. 8) con una
19 columna generada con los resultados de la
20 predicción, donde se puede observar que
21 en mayor cantidad las respuestas por parte
22 de las personas que respondieron la en-
23 cuesta fue No.

Row ID	¿Qué t...	¿Cree q...	¿Cree q...	¿Estarí...	¿Estarí...	¿Hablár...	¿Hablár...	¿Siente...	¿Ha oíd...	Predicti...
Row3	No lo sé	Si	Tal vez	No	No	No	No	No lo sé	No	No
Row5	Muy difícil	Si	Sí	Con algunos...	No	No	No	No	Si	Si
Row7	Algo difícil	No	Sí	No	No	No	No	No	No	Si
Row12	Algo difícil	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	No
Row13	No lo sé	Tal vez	Tal vez	Con algunos...	Con algunos...	No	No	No	No	No
Row17	No lo sé	No	No	No	No	No	No	No lo sé	No	No
Row18	No lo sé	Si	Tal vez	Si	Si	No	No	No	Si	Si
Row20	No lo sé	No	No	No	No	Si	No	No lo sé	Si	No
Row27	Algo difícil	No	No	Con algunos...	No	Si	Si	No lo sé	No	No
Row31	Algo fácil	Tal vez	No	No	No	No	No	No lo sé	No	No
Row32	Muy fácil	No	No	Con algunos...	Con algunos...	No	No	No lo sé	No	No
Row33	No lo sé	No	No	Si	Si	No	No	No lo sé	No	No
Row34	No lo sé	No	No	Con algunos...	Con algunos...	Si	No	No lo sé	No	No
Row35	Algo fácil	Tal vez	No	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si
Row36	Algo fácil	Tal vez	No	Si	Con algunos...	No	Si	No lo sé	No	No
Row51	Muy fácil	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
Row52	Muy fácil	No	Tal vez	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
Row54	Algo fácil	Si	Tal vez	Si	No	No	No	Si	No	No
Row56	Algo difícil	No	No	Con algunos...	Con algunos...	No	No	No lo sé	Si	No
Row58	Muy difícil	Tal vez	No	No	No	No	Si	No	No	Si
Row60	Muy difícil	Tal vez	Tal vez	Con algunos...	Con algunos...	No	No	No lo sé	No	No
Row61	No lo sé	Tal vez	Sí	Con algunos...	Con algunos...	Si	Si	Si	Si	No
Row63	No lo sé	Tal vez	Tal vez	Con algunos...	Con algunos...	No	No	No lo sé	Si	No
Row68	No lo sé	Tal vez	No	Si	No	Si	No	Si	Si	No

Figura 8. Tabla generada por el algoritmo de Naive Bayes

En la matriz de confusión observa: fueron clasificadas de forma correcta un 71.111 % mientras que un 28.889 % lo fue de forma incorrecta, lo cual corresponde a 64 correctas y 26 incorrectas y el coeficiente Kappa lo cual corresponde a un coeficiente de correlación de concordancia igual a 0.363%, con los datos recabados hasta el momento, siendo un entrenamiento preliminar ya que es un proyecto que continua en ejecución (Fig. 9).

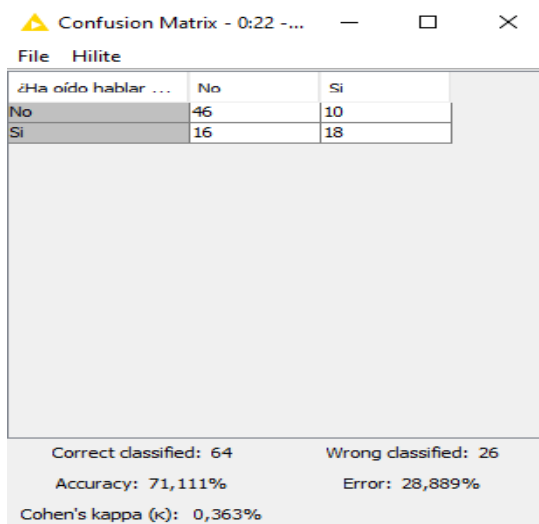


Fig. 9. Matriz de confusión del algoritmo Naive Bayes

Cada una de las técnicas presentadas anteriormente tiene la opción de devolver la predicción para luego comparar los resultados mediante la matriz de confusión que se obtuvo de cada procesamiento del algoritmo.

Al realizar una comparativa con respecto al

comportamiento de los algoritmos con estos datos, el algoritmo con mayor acierto fue el Naive Bayes con un porcentaje de acierto de 71,111 %.

4. Conclusión.

La salud mental es uno de los factores más importante en la vida de las personas y cumple un papel fundamental dentro del ambiente laboral ya que esto compromete el desempeño de las personas en su área de trabajo, en la actualidad los problemas de salud mental en gran porcentaje involucran el estrés laboral ya que una de cada cinco personas lo presenta.

Utilizando la técnica de minería de datos como recurso de información, y a partir de una gran cantidad de datos para este trabajo, con dicha técnica se aportó de forma acertada para el cumplimiento de lo planificado, además de reforzar los conocimientos sobre los recursos informáticos para el análisis de los datos.

El algoritmo con mejor resultado fue Naive Bayes con un porcentaje de acierto de 71,111 %, en total fueron 300 registros, de los cuales 210 registros fueron utilizados para el entrenamiento y 90 registros para la prueba de este. En el árbol de decisión se puede observar que es mayor el porcentaje de quienes no están dispuestos a hablar con sus superiores ya que esto puede generar repercusiones negativas dentro del entorno laboral.



Los resultados expuestos en este trabajo son preliminares, dado que el mismo sigue en ejecución y aún se genera más información que luego será analizada con las técnicas presentadas anteriormente. Con este método se podrán identificar los patrones de comportamiento en los lugares de trabajo y de esta manera intentar subsanar enfermedades mentales en gran porcentaje de forma preventiva dentro del entorno laboral.

Referencias Bibliográficas.

- Cobo-Rendón, R. a.-V.-Á. (2020). Consideraciones institucionales sobre la Salud Mental en estudiantes universitarios durante la pandemia de Covid-19. *CienciAmérica*, 9(2), 277-284. Obtenido de <http://cienciame-rica.uti.edu.ec/openjournal/index.php/uti/article/view/322>
- Maimon, O. a. (2009). Introduction to knowledge discovery and data mining. En *Data mining and knowledge discovery handbook* (págs. 1-15). Obtenido de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-09823-4_1

- Moral, O. V. (2012). *La salud mental de las y los Trabajadores*. Madrid: La Ley.
- Reyes Saldaña, J. F. (2005). El proceso de descubrimiento de conocimiento en bases de datos. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, 8(26), 37-47.

Um Sistema de Detecção de Intrusão Interno Baseado em Fog Computing para
Redes IoT com Restrição de Recursos



C.29. Tecnologia da Informação e Comunicação

Um Sistema de Detecção de Intrusão Interno Baseado em Fog Computing para Redes IoT com Restrição de Recursos

Autor: Lussi, Eduardo Willwock, eduardolussi@gmail.com

Coautores: Sampaio, Hugo Vaz, hvazsampaio@gmail.com; Souza, Cristiano Antonio de, cristiano.souza.c@posgrad.ufsc.br

Professor: Westphall, Carlos Becker, carlosbwestphall@gmail.com

Universidade Federal de Santa Catarina

Resumo

A internet das coisas (IoT) introduz uma série de novos dispositivos à rede de computadores que, por consequência, a torna cada vez mais complexa. Assim como a rede se torna mais complexa, questões de segurança tornam-se mais importantes, além do fato de que as redes IoT têm os mais diversos tipos de objetos sob controle. Esse controle precisa ser preciso e seguro, e a segurança, eficiente. A Cloud Computing tem sido bastante útil para gerenciar redes inteligentes, entretanto, aplicações de segurança demandam uma latência menor do que a Cloud pode oferecer. Dessa forma, este trabalho apresenta um sistema de detecção de intrusão (IDS) interno baseado em comportamento por especificação para ambientes inteligentes com restrição de recursos. A abordagem monitora o tráfego dos dispositivos IoT diretamente na camada Fog Computing, contornando problemas de latência e sendo capaz de proteger a Fog e camadas superiores de ataques de negação de serviço (DoS). Além disso, são investigadas alternativas de mitigação de ataques aproveitando a natureza distribuída da IoT e considerando não somente a camada Fog Computing, mas também a camada Mist Computing. Em um ambiente de condomínio inteligente composto de 300 dispositivos de alarme de incêndio, o IDS foi capaz de detectar ataques DoS de dispositivos IoT e reduzir o consumo de processamento do servidor Fog de 31%, quando sob ataque, para 24% com a atuação exclusiva da Fog, e 9% utilizando as camadas Fog e Mist atuando contra o atacante.

Palavras-chave: Sistema de Detecção de Intrusão, Fog Computing, Internet das Coisas.



Introdução

A Fog Computing é um paradigma distribuído que estende a Cloud Computing para a borda da rede local, oferecendo um acesso mais eficiente à dados, processamento, comunicação e armazenamento (Alrawais et al., 2017) e, por consequência, resolve os problemas de latência encontrados na nuvem e suportando as qualidades de serviço (QoS) de sistemas de tempo real. A Fog Computing também permite uma melhor eficiência na implementação de sistemas de gerenciamento de identidade, dados, energia, e também, sistemas de detecção de intrusão (IDS), que consistem de softwares que monitoram continuamente o tráfego e as atividades da rede afim de encontrar anormalidades no comportamento ou violação de políticas (Bashir and Cachoo, 2014).

Além do mais, o estudo de IDSs está em alta dentro da área de Smart Grids. Detectar intrusos é uma tarefa complicada, é necessário proteger o sistema contra ataques não autorizados e até usuários defeituosos que fazem parte do sistema ou que está acessando alguma área sem autorização. As abordagens baseadas em assinatura consistem em procurar por vestígios de um ataque em dados monitorados. Também existem técnicas baseadas em regras pré-definidas,

sistemas inteligentes, algoritmos genéticos, detecção de padrões, transições de estados e análise de assinaturas (Bashir and Cachoo, 2014). Entretanto, técnicas baseadas em assinaturas possuem certa dificuldade em encontrar novos ataques (Pundir et al., 2020).

IDSs baseados em anomalias procuram por comportamentos anormais nos dados monitorados da rede. Esse tipo de abordagem tem dificuldades com relação à alta taxa de falsos positivos, e é bastante complicado diminuí-las. Os principais métodos utilizados para detectar anomalias são modelos estatísticos, redes neurais e mineração de dados. Em técnicas baseadas em comportamento por especificação, um profissional humano é responsável por definir o comportamento considerado normal da rede (Mitchell and Chen, 2014). Em comparação com as técnicas baseadas em anomalias, IDSs baseados em especificação emprega regras e limites que definem o comportamento esperado para os componentes da rede, como nodos, protocolos e tabelas de roteamento. Essa técnica é semelhante à detecção de anomalias pelo motivo de que ambas detectam anomalias quando o comportamento da rede desvia do esperado. Essa abordagem é bastante



relevante para contextos onde há restrições de recursos, já que não demandam muito poder de processamento e armazenamento.

O planejamento de detecção de intrusão em ambientes da internet das coisas (IoT) pode ser bastante complexo dado que os dispositivos da rede geralmente têm recursos limitados (Bouzarkouna et al., 2018). É difícil encontrar um meio termo entre as diferentes técnicas de detecção de intrusão e é preciso estar ciente da possibilidade da ocorrência de ataques simultâneos. Ademais, ambientes IoT podem estar suscetíveis tanto à ataques externos quanto internos. Em (Cardoso et al., 2019), é proposto um IDS que busca proteger a camada Fog contra ataques de negação de serviço externos analisando os pacotes vindos por meio do protocolo TCP/IP. Entretanto, nessa mesma rede ainda existe uma vulnerabilidade quanto à possibilidade de dispositivos IoT internos à rede serem infectados e causarem até mais problemas do que ataques externos. Assim sendo, monitorar o tráfego desses dispositivos diretamente pode ser uma boa solução para prevenir esse tipo de ataque, que é o tema principal deste trabalho.

Objetivos

Neste trabalho, é proposto um módulo de um sistema de detecção de intrusão leve baseado em comportamento por especificação para redes IoT nomeado Serial IDS, que analisa o fluxo de pacotes de dispositivos IoT diretamente conectados ao servidor Fog por meio de portas seriais com o objetivo de detectar ataques internos e garantir as QoS das aplicações da camada IoT. Dessa forma, as principais contribuições desse trabalho são:

- Obter vantagem da baixa latência da camada Fog para propor um sistema de monitoramento para uma rede IoT.
- Detectar e agir contra ataques de negação de serviço (DoS) internos em ambientes inteligentes distribuídos.
- Considerando um ambiente com restrição de recursos, propor uma abordagem leve de detecção de intrusão.
- Explorar a escalabilidade da rede e aproveitar as camadas Fog e Mist Computing para mitigar ataques.
- Propor uma interface web para o monitoramento e análise do tráfego da rede.



Trabalhos Relacionados

Uma revisão bibliográfica foi feita com o objetivo de contextualizar este trabalho no seu respectivo tema no estado da arte. Com relação ao tema de detecção de intrusão, dada a necessidade de monitorar todo o tráfego da rede, a Cloud Computing pode não ser capaz de oferecer as QoS com relação ao tempo de resposta. A Fog Computing têm sido uma boa solução para problemas de latência em sistemas de detecção de intrusão, (de Souza et al., 2020; Kumar et al., 2021; Cardoso et al., 2019; Zhou et al., 2019; Tajalli et al., 2020) seguem essa tendência de descentralizar o controle dos dispositivos IoT obtendo vantagem da baixa latência encontrada na Fog para monitorar a rede IoT local.

A Fog Computing também é útil para sistemas de gerenciamento de energia em ambientes IoT, especialmente quando há dispositivos que funcionam com baterias ou para aplicações em larga escala. (Sampaio et al. 2021) introduz um sistema autônomo de gerenciamento de energia que executa na camada Fog ajustando os tempos de operação e espera de um sistema de alarme de incêndio para condomínios inteligentes. Os cálculos estimados de consumo de energia consideram uma rede que utiliza antenas ZigBee com 300 nós IoT e um nó Fog. O nó coordenador ZigBee é conectado

diretamente à porta serial do dispositivo Fog. A avaliação de performance também considera uma análise de rede de filas para estimar os tempos totais de espera dos pacotes nas portas seriais do dispositivo Fog e seus impactos na economia de energia.

A natureza descentralizada da IoT faz com que a rede seja mais suscetível a problemas de segurança. Além do mais, a IoT pode ser implementada aos mais variados ambientes e pode ser difícil encontrar uma solução que se encaixe bem em todos eles. Alguns ambientes são especificamente sensíveis a problema de segurança, (Kumar et al. 2021) e (Tabassum et al. 2021) apresentam soluções de segurança para áreas relacionadas à saúde e à internet das coisas médicas (IoMT). Além disso, há sistemas de larga escala que são ainda mais vulneráveis, mas por outro lado, eles oferecem uma grande quantidade de informações que podem ser utilizadas para investigar anomalias, como em (Sampaio et al. 2021) e (Cauteruccio et al. 2021), que focam em locais públicos e cidades inteligentes. Também existem aplicações em Smart Grids (Tajalli et al., 2020), internet dos drones (Bera et al., 2021), internet das coisas industrial (IIoT) (Zhou et al., 2019; Tajalli et al., 2020) dentre várias outras.



A detecção de intrusão pode ser feita de várias formas. Diversos trabalhos utilizam técnicas de Machine Learning (ML) para construir módulos IDS baseados em anomalias, ou até mesmo híbridos (Sadikin et al., 2020; de Souza et al., 2020; Kumar et al., 2021; Cauteruccio et al., 2021; Tabassum et al., 2021; Zhou et al., 2019). Dentre as abordagens de IDS híbridos, (Sadikin et al. 2020) apresenta um IDS que combina métodos baseados em comportamento com o uso de ML para detectar anomalias e métodos baseados em assinaturas para detectar ataques já conhecidos. O trabalho considera a aplicação do IDS em um ambiente IoT que utiliza o protocolo ZigBee e apresenta uma forma segura e eficiente de coletar dados da rede sem afetar a performance e detectar dados falsos enviados por um possível invasor. Em (de Souza et al. 2020), uma abordagem híbrida também é proposta para operar de maneira distribuída na camada Fog, executando em cada um dos nós sem interagir com a Cloud, à menos que ocorra um evento que seja classificado como um ataque. A abordagem também utiliza técnicas de ML com o objetivo de melhorar as detecções. Por vezes, os ambientes IoT são limitados em termos de poder de processamento, armazenamento e até mesmo energia, não sendo capazes de executar técnicas

complexas de ML. Abordagens baseadas em comportamento por especificação permitem a implementação de IDS leves em ambientes com restrições de recursos (Mitchell and Chen, 2014). (Yaseen et al. 2016) apresenta um IDS baseado em uma especificação de limites para a detecção de ataques de encaminhamento seletivo em Wireless Sensor Networks (WSNs). A abordagem se baseia em watchdogs que mantêm tabelas dos pacotes recebidos e enviados. O sistema que executa no servidor Fog analisa a informação recebida dos watchdogs e determina quais nós são maliciosos baseados em limites pré-definidos. Além disso, em (Aliyu et al. 2018) é proposta uma técnica de detecção na camada Fog baseado em desafio/resposta. Nós de detecção periodicamente avaliam nós próximos por meio do envio de pacotes, enquanto o nó do IDS observa o comportamento do receptor. Quando o pacote de retorno foge do comportamento especificado, o IDS conclui que o nó é malicioso. Ademais, (Potrino et al. 2019) propõe um IDS baseado em restrições preventivas e políticas de descarte de pacotes baseado em limites para diferentes tópicos para um ambiente que utiliza o protocolo Message Queue Telemetry Transport (MQTT). Apesar de haver várias boas abordagens para o tema de detecção de intrusão,



poucos consideram ataques internos em redes IoT, que pode facilmente ter um grande número de dispositivos vulneráveis que podem comprometer a rede. Também, não foram encontradas abordagens no sentido de arquiteturas Fog-Cloud que consideram dispositivos com limitações de recursos.

Materiais e Métodos

Em (Cardoso et al. 2019), é proposto um módulo de proteção contra ataques DoS para casas inteligentes que opera na camada Fog analisando o protocolo TCP/IP com o objetivo de proteger o sistema contra ataques externos, o trabalho também é baseado no sistema de alarme de incêndio para ambientes inteligentes proposto por (Sampaio et al. 2019) e busca atender as demandas de segurança do sistema, investigando ataques do tipo SYN Flood, Ping Flood e UDP Flood. Como trabalhos futuros, é citada uma possível abordagem para analisar os dados enviados pelos sensores dos dispositivos IoT para o nó Fog por meio da porta serial com o objetivo de detectar possíveis ataques internos, que é o tema do presente trabalho. O Serial IDS desenvolvido também considera (Sampaio et al. 2021), que explora o gerenciamento de energia em redes IoT de larga escala,

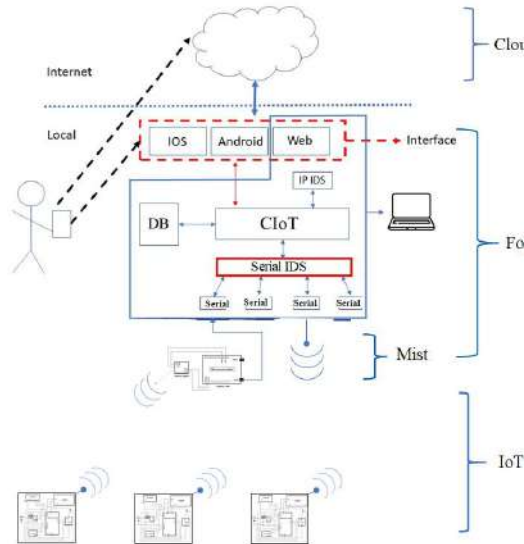
como o sistema de alarme de incêndio proposto em (Sampaio et al. 2019).

Este trabalho propõe um módulo de detecção de intrusão baseado em comportamento por especificação que executa na camada de Fog Computing com o objetivo de detectar ataques DoS internos iniciados por dispositivos IoT infectados contra camadas superiores. Diversas soluções nesse contexto consideram a proteção do sistema contra ataques internos, entretanto, poucas consideram possíveis ataques internos causados pela infecção de algum nó ou um mal funcionamento. Portanto, esta abordagem busca proteger a camada Fog e superiores contra possíveis ataques DoS internos em um contexto de casas e condomínios inteligentes. Além disso, uma aplicação web de monitoramento e controle também é proposta para facilitar a análise dos dados e operação do IDS.

Arquitetura da Rede IoT

A figura 1 mostra a arquitetura da rede IoT. A camada IoT é composta de sensores do sistema de alarme de incêndio proposta em (Sampaio et al. 2019) e (Sampaio et al., 2021). Esses dispositivos se comunicam com o servidor Fog por meio de uma rede ZigBee. Ademais, é considerada um dispositivo da camada Mist Computing, que permite a distribuição do processamento

Figura 1 – Arquitetura da rede IoT



dos pacotes e bloqueio de dispositivos, no caso da existência de anomalias, em camadas mais baixas do que na Fog.

O dispositivo Fog possui uma base de dados local e um servidor web que executa o módulo CloT, responsável por gerenciar subsistemas, serviços e comunicações. O módulo IP IDS proposto em (Cardoso et al. 2019) executa na CloT, monitorando o protocolo TCP/IP. O módulo Serial IDS proposto neste trabalho também executa na CloT, funcionando entre a CloT e as portas seriais na qual os dispositivos da camada Mist estão conectados. A camada Cloud executa um website que oferece uma interface que permite ao administrador do sistema monitorar visualmente todo o sistema. Essa aplicação suporta a escalabilidade de serviços, permitindo que o administrador monitore vários servidores

Fog, mas esse aspecto não será explorado neste trabalho porque é tema de trabalhos futuros.

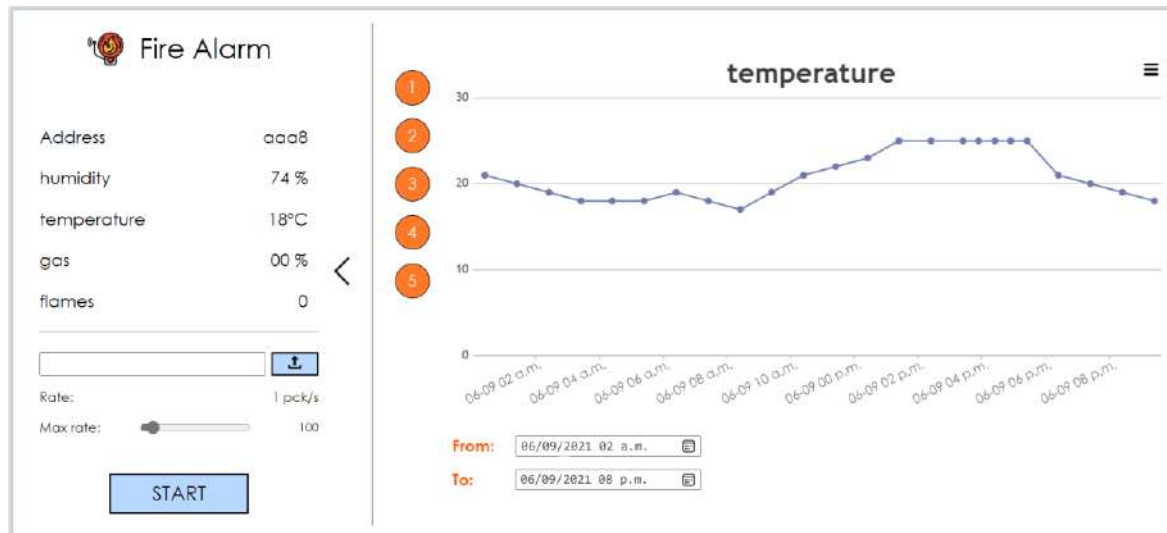
Funcionamento do Website

O sistema proposto consiste de duas principais partes, um servidor Fog nomeado CloT, que gerencia toda a camada IoT, onde o Serial IDS opera, e uma interface web utilizada para gerenciar os serviços Fog. A figura 2 mostra a visão do website sobre o sistema de alarme de incêndio que não está sendo monitorado. Para iniciar o monitoramento do dispositivo, primeiramente é necessário definir a limiar do IDS, que consiste na taxa máxima de pacotes por segundo recebida pelo dispositivo Fog do dispositivo. Com o monitoramento ativo, os dados dos sensores são mostrados em tempo real e a taxa de pacotes é apresentada no campo *Rate*. Essa visualização também permite buscar e analisar dados armazenados dos sensores e taxas de pacotes ao longo do tempo por meio de um gráfico.

Modelo de Ataque

Esta pesquisa busca oferecer uma solução de segurança para o sistema proposto em (Sampaio et al. 2019) e ambientes inteligentes como casas e condomínios inteligentes de maneira geral. Esses

Figura 2 – Visualização do dispositivo de alarme de incêndio no website



sistemas estão suscetíveis à ataques externos da internet, como já foi investigado por (Cardoso et al. 2019). Além do mais, esses sistemas também podem ser alvos de ataques internos. Neste contexto, um atacante é considerado uma entidade maliciosa que conseguiu se autenticar no sistema Fog ou algum dispositivo IoT legítimo que se tornou malicioso. Esse dispositivo então inicia um ataque de negação de serviço enviando uma grande taxa de pacotes à Fog, sobrecarregando o servidor Fog e camadas superiores prejudicando ou até mesmo causando a interrupção total dos recursos oferecidos por esses sistemas. Esses serviços, em muitos casos, são extremamente importantes e suas operações são críticas, como o sistema de

alarme de incêndio discutido neste trabalho.

Funcionamento do Módulo Serial IDS

Cada sistema da aplicação Fog, como o sistema de alarme de incêndio, possui um Protocol Data Unit (PDU), que descreve os atributos lidos por cada sistema e cujo principal objetivo é filtrar os pacotes. Nesse sentido, é possível prevenir ataques verificando o endereço de origem, estrutura do pacote, taxa de recebimento dos pacotes bloqueando o dispositivo malicioso se a taxa de pacotes ultrapassar um limite pré-estabelecido. O PDU também permite o armazenamento dos dados para futuras análises e comparações.

O Serial IDS funciona com base no PDU, que reduz o pacote ZigBee antes de processá-lo. A camada Mist é responsável



por receber todos os pacotes ZigBee e reencaminhar em sua forma reduzida para o nó Fog por meio de uma porta serial. O primeiro byte do PDU corresponde ao identificador do dispositivo IoT, como o sistema de alarme de incêndio, os próximos dois bytes correspondem ao endereço de origem do pacote. Os restantes dos bytes são dados lidos pelos sensores do ambiente em seu contexto de aplicação. Cada categoria de atributo é armazenada da base de dados com informações como seu tamanho e PDUs para cada dispositivo. Esses valores são utilizados pela Fog para reconhecer automaticamente os dispositivos.

A detecção de intrusão é baseada na análise do comportamento de cada dispositivos. Ou seja, um limiar que modela o comportamento de cada dispositivo é previamente definido baseado no contexto de cada aplicação. No escopo deste trabalho, o foco está em ataques de negação de serviço. Dessa forma, a modelagem do comportamento é feita por meio de limites à taxa de pacotes. O Serial IDS analisa cada pacote individualmente, verifica se sua estrutura, endereço e identificador correspondem ao PDU e em seguida, realiza a contagem de pacotes que é atualizada a cada segundo.

Quando a taxa de pacotes é atualizada, o sistema verifica se ela é adequada ao

comportamento especificado para o dispositivo correspondente. No caso de uma anomalia no comportamento, o IDS automaticamente bloqueia o dispositivo malicioso descartando seus pacotes e enviando uma notificação ao nó Mist, que mantém uma lista negra de dispositivos infectados.

Dessa forma, a conexão serial não é sobrecarregada no caso de um ataque. Além disso, como o dispositivo Fog não recebe esses pacotes, ele não precisa processá-los, o que afetaria a performance no caso de um ataque. Após bloquear o dispositivo IoT, a Fog também alerta o gerenciador do sistema para tomar ações de contramedida.

Para reduzir a taxa de falsos positivos, a limitar estabelecida possui uma tolerância de 1% sobre a limiar definida no website. Quando o pacote ultrapassa esse limite, o dispositivo só é bloqueado caso essa anomalia permaneça por cinco segundos ou mais.

Resultados e Discussão

Em um contexto de casas inteligentes, o ambiente de testes é composto pelo sistema de alarme de incêndio proposto por (Sampaio et al. 2019) e (Sampaio et al., 2021) conectados à um Arduino Uno R3 que atua como dispositivo Mist, que consiste em um nó controlador ZigBee que



organiza, reduz e reencaminha os pacotes para a Fog diretamente via conexão serial USB. O dispositivo utilizado como servidor Fog é um notebook com um processador Intel Core i5 7300HQ e 8 GB de memória RAM. Os principais objetivos dos destes realizados são:

- Testar a performance da camada Fog de acordo com o uso da conexão serial
- Verificar se o Serial IDS pode responder a mudanças no consumo de processamento conforme a taxa de pacotes muda, simulando uma tentativa de ataque DoS.
- Comparar a eficiência da utilização da camada Mist como auxiliar no bloqueio de dispositivos infectados.

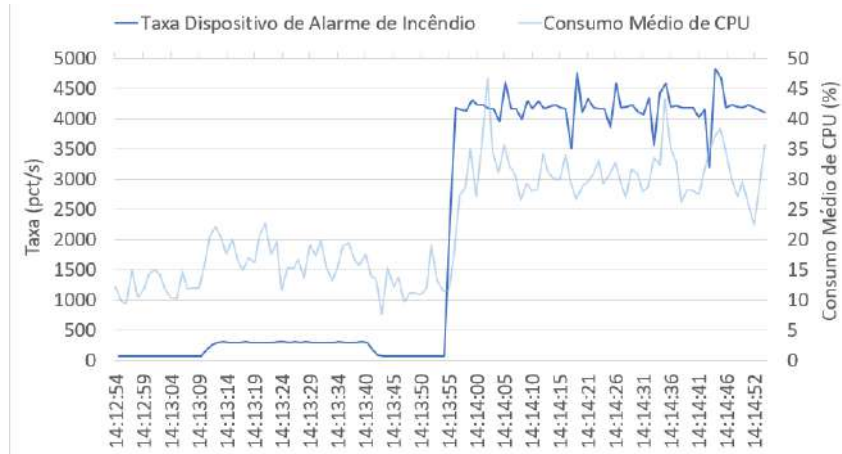
Com base no trabalho desenvolvido em (Sampaio et al., 2021), os experimentos realizados consideram um complexo de três construções compostas de 100 apartamentos cada, onde cada apartamento possui um sistema de alarme de incêndio, totalizando 300 dispositivos IoT. Esses dispositivos possuem duas variações na taxa de pacotes. Em condições normais, eles produzem cerca de 62 pct/s na Fog. Se algum nó indica incêndio, todos os nós entram em modo de incêndio, aumentando a taxa de pacotes para 300 pct/s na Fog. A conexão serial utilizada está limitada à 500 kbps. O

tamanho do pacote reduzido do sistema de alarme de incêndio é de 10 bytes (Sampaio et al., 2021).

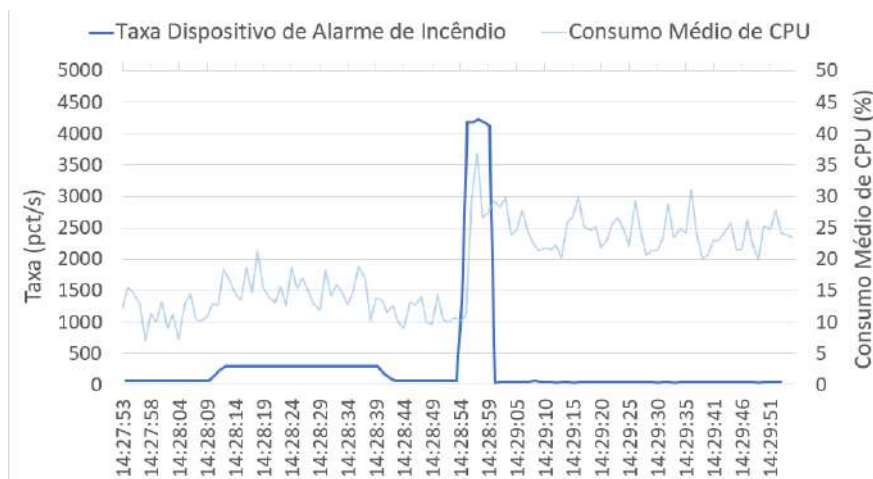
A figura 3 (a) mostra a primeira simulação considerando a operação do sistema com o Serial IDS desativado. O gráfico ilustra a taxa de pacotes do sistema de alarme de incêndio recebidos na Fog com relação à porcentagem de uso da CPU do servidor Fog.

Inicialmente, o sistema de alarme de incêndio atua em seu modo normal, alcançando uma taxa de aproximadamente 62 pct/s na Fog, com um consumo de processamento aproximado de 12%. Então, um incêndio ocorre. Os dispositivos começam a operar em modo de emergência gerando pacotes a cada segundo, totalizando 300 pct/s à Fog. Esse aumento na taxa de pacotes faz com que o consumo de processamento aumente para cerca de 17%. Os dispositivos permanecem em modo incêndio por um tempo e voltam ao estado normal. Por fim, uma simulação de ataque DoS é feita, onde um dos dispositivos começa à enviar o máximo de pacotes que consegue, atingindo uma taxa de 4 000 pct/s. Nesse caso o consumo de processamento sobe para uma média de 31%, como indica o gráfico. O consumo máximo de processamento medido foi de 46,6%.

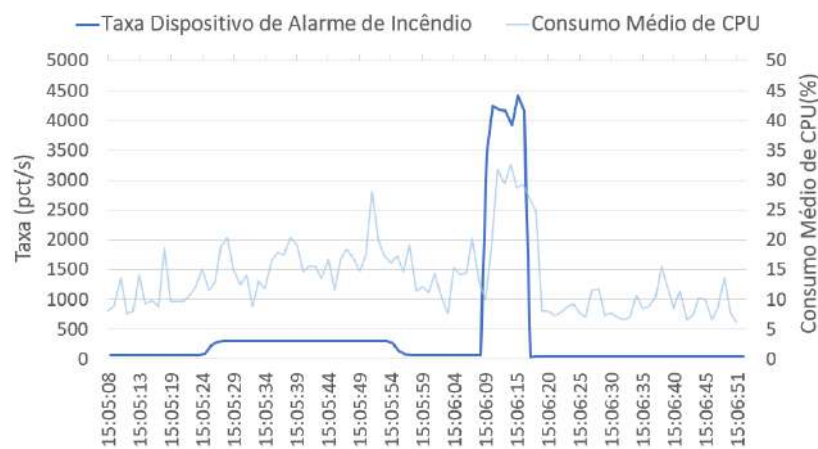
Figure 3 – Simulações Experimentais de Ataques DoS



(a) Sem o Serial IDS



(b) Com o Serial IDS e bloqueio exclusivo na Fog



(c) Com o Serial IDS e bloqueio utilizando os dispositivos Fog e Mist



bloqueio do dispositivo malicioso feito exclusivamente na camada Fog. A figura 3 (b) mostra o gráfico com os dados obtidos para essa simulação. O comportamento dos dispositivos IoT desse experimento é semelhante ao experimento anterior apresentado na figura 3 (a). Inicialmente, a taxa total de pacotes é de aproximadamente 62 pct/s. Assim que uma tentativa de ataque DoS é feita, a taxa de pacotes sobe para 4 175 pct/s, causando um pico de 36,8% de consumo da CPU. O Serial IDS identifica o comportamento anômalo, bloqueia localmente o dispositivo atacante e começa a descartar os pacotes com aquele endereço de origem. Dessa forma, o consumo de processamento durante o ataque permaneceu em torno de 31% para o primeiro experimento e foi reduzido para uma média de 24%.

Apesar da Fog descartar os pacotes com o endereço do atacante, ela ainda continua os recebendo e identificando para só então, descartá-los. A redução no consumo de processamento é de cerca de 7%, dado que o servidor Fog não armazena os dados da base de dados, nem exibe os valores na aplicação web.

Por esse motivo, o uso exclusivo da Fog para bloquear dispositivos infectados é eficiente, mas não tanto para prevenir ataques DoS. Essa técnica é mais útil para proteger a Fog de um ataque da camada

Mist, que está diretamente conectada com ela via porta serial. Entretanto, não é possível mitigar outros ataques que vêm de nós IoT de outras construções ou uma possível sobrecarga na porta serial.

Por fim, o último experimento considera a versão completa do Serial IDS. Nesse caso, quando um ataque é detectado, além do descarte de pacotes, a camada Fog também envia uma mensagem de controle ao dispositivo Mist, que adiciona o dispositivo infectado à uma lista negra. Os dispositivos incluídos nessa lista não têm mais seus pacotes enviados da Mist à Fog. A figura 3 (c) mostra o gráfico com os resultados do terceiro experimento. Assim que o ataque é detectado e o dispositivo bloqueado, o consumo de processamento da CPU, que se manteve em uma média de 24% no segundo experimento, cai para uma média de 9%.

No caso de ataques com apenas um nó Mist conectado ao servidor Fog, é possível perceber que não foi possível sobrecarregar o sistema. Todavia, dada a escalabilidade da rede, a presença de mais nós Mist conectados nas portas seriais do dispositivo Fog com mais limitações de recursos pode fazer com que o servidor Fog pare de responder e comprometa as QoS.

A tabela 1 resume o resultado dos experimentos. Durante um ataque DoS

Tabela 1 – Resumo dos Três Experimentos

		Consumo médio de CPU (%)	Taxa (pct/s)
Operação Normal	Modo Normal	12	62
	Modo Incêndio	17	300
Ataque DoS	Sem IDS	31	4 175
	Fog IDS	24	41 (4 175)
	Fog + Mist IDS	9	41

sem o Serial IDS, o consumo médio de CPU com 4 175 pct/s foi de 31%. Utilizando o Serial IDS com bloqueio apenas na Fog, o consumo reduz para 24% com uma taxa de 41 pct/s sendo processados e 4 175 pct/s sendo recebidos. Quando utilizando o nó Mist, a média de consumo de CPU cai para 9% com 41 pct/s sendo processados. A taxa máxima de consumo de processamento com o módulo Serial IDS desativado foi de 46,6%, com apenas um sistema malicioso.

Conclusão e Trabalhos Futuros

O módulo Serial IDS proposto se provou efetivo, bloqueando dispositivos maliciosos e prevenindo ataques DoS que sobrecarregariam o servidor Fog. Apesar de que apenas um dispositivo conectado à porta serial não ter sido capaz de sobrecarregar a Fog, múltiplos dispositivos conectados à diferentes portas seriais em um ataque de negação de serviço distribuído (DDoS) provavelmente poderiam causar uma interrupção

completa dos serviços. Os experimentos também mostraram que o uso exclusivo da camada Fog como contramedida de um ataque não é tão eficiente quanto explorar a camada Mist para tal.

Como trabalho futuro, poderão ser investigados ataques DDoS, feitos por vários dispositivos IoT na rede em outras portas seriais, buscando analisar sua influência no servidor Fog e a efetividade da abordagem atual do Serial IDS nesse tipo de situação. Além disso, outras formas de limiares para o IDS também poderiam ser exploradas, como o consumo da porta serial, sobrecarga da CPU ou o uso de técnicas de ML e redes neurais para identificar a ocorrência de possíveis ataques.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), concedida sob 23038.013359/2017-71, pela Coordenação



de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Referências

Aliyu, F., Sheltami, T. and Shakshuki, E.M. (2018). A detection and prevention technique for man in the middle attack in fog computing. *Procedia Computer Science, The 9th International Conference on Emerging Ubiquitous Systems and Pervasive Networks (EUSPN-2018)/The 8th International Conference on Current and Future Trends of Information and Communication Technologies in Healthcare (ICTH-2018)/Affiliated Workshops*, Vol. 141, pp.24–31 [online] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877050918317733>.

Alrawais, A., Alhothaily, A., Hu, C. and Cheng, X. (2017). Fog computing for the internet of things: security and privacy issues. *IEEE Internet Computing*, Vol. 21, No. 2, pp.34–42.

Bashir, U. and Chachoo, M. (2014). Intrusion detection and prevention system: challenges & opportunities. *International Conference on Computing for Sustainable Global Development, INDIACom 2014*, pp.806–809.

Bera, B., Das, A.K. and Sutrala, A.K. (2020). Private blockchain-based access control mechanism for unauthorized UAV detection and mitigation in internet of drones environment. *Computer Communications*, December, Vol. 166, pp.91–109 [online] <https://doi.org/10.1016/j.comcom.2020.12.005>.

Bouzarkouna, L., Sahnoun, M., Sghaier, N., Baudry, D. and Gout, C. (2018). Challenges facing the industrial implementation of fog computing, *Proceedings – 2018 IEEE 6th International Conference on Future Internet of Things and Cloud, FiCloud 2018*, pp.341–348.

Cardoso, J.V., Sampaio, H.V., Souza, C.A. and Westphall, C.B. (2019). DoS attack detection and prevention in fog-based intelligent environments, *Brazilian Journal of Development*, Vol. 5, No. 11, pp.23934–23956.

Cauteruccio, E., Cinelli, L., Corradini, E., Terracina, G., Ursino, D., Virgili, L., Savaglio, C., Liotta, A. and Fortino, G. (2021). A framework for anomaly detection and classification in multiple IoT scenarios, *Future Generation Computer Systems*, Vol. 114, pp.322–335 [online] <https://doi.org/10.1016/j.future.2020.08.010>.



de Souza, C., Westphall, C., Machado, R., Sobral, J. and Vieira, G. (2020). Hybrid approach to intrusion detection in fog-based IoT environments, *Computer Networks*, July, Vol. 180, p.107417 [online] <https://doi.org/10.1016/j.comnet.2020.10417>.

Kumar, P., Gupta, G.P. and Tripathi, R. (2021). An ensemble learning and fog-cloud architecture-driven cyber-attack detection framework for IoMT networks, *Computer Communications*, April, Vol. 166, pp.110–124 [online] <https://doi.org/10.1016/j.comcom.2020.12.003>.

Mitchell, R. and Chen, I-R. (2014). A survey of intrusion detection techniques for cyber-physical systems, *ACM Comput. Surv.*, March, Vol. 46, No. 4 [online] <https://doi.org/10.1145/2542049>.

Potrino, G., de Rango, F. and Santamaria, A.F. (2016). Modeling and evaluation of a new IoT security system for mitigating DoS attacks to them QTT broker, in *2019 IEEE Wireless Communications and Networking Conference (WCNC)*, pp.1–6.

Pundir, S., Wazid, M., Singh, D.P., Das, A.K., Rodrigues, J.J. and Park, Y. (2020) Intrusion detection protocols in wireless sensor networks integrated to internet of things deployment: survey and future

challenges, *IEEE Access*, Vol. 8, pp.3343–3363, DOI: [10.1109/ACCESS.2019.2962829](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2962829).

Sadikin, F., van Deursen, T. and Kumar, S. (2020). A ZigBee intrusion detection system for IoT using secure and efficient data collection, *Internet of Things*, Vol. 12, p.100306 [online] <https://doi.org/10.1016/j.iot.2020.100306>.

Sampaio, H.V., de Jesus, A.L.C., do Nascimento Boing, R. and Westphall, C.B. (2019). Autonomic IoT battery management with fog computing, *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, Vol. 11484LNCS, No. C, pp.89–103.

Sampaio, H.V., Westphall, C.B., Koch, F., do Nascimento Boing, R. and Santa Cruz, R.N. (2021) 'Autonomic energy management with fog computing', *Computers and Electrical Engineering*, June, Vol. 93, p.107246 [online] <https://doi.org/10.1016/j.compeleceng.2021.107246>.

Tabassum, A., Erbad, A., Mohamed, A. and Guizani, M. (2021) 'Privacy-preserving distributed IDS using incremental learning for IoT health systems', *IEEE Access*, Vol.



9, pp.14271–14283, DOI:
10.1109/ACCESS.2021.3051530.

Tajalli, S.Z., Mardaneh, M., Taherian-Fard, E., Izadian, A., Kavousi-Fard, A., Dabbaghjamanesh, M. and Niknam, T. (2020) ‘DoS-resilient distributed optimal scheduling in a fog supporting IIoT-based smart microgrid’, IEEE Transactions on Industry Applications, March, Vol. 56, No. 3, pp.2968–2977.

Yaseen, Q., AlBalas, F., Jararweh, Y. and Al-Ayyoub, M. (2016) ‘A fog computing based system for selective forwarding detection in mobile wireless sensor networks’, in 2016 IEEE 1st International Workshop on Foundations and Applications of Self*Systems (FAS*W), pp.256–262.

Zhou, L., Guo, H. and Deng, G. (2019) ‘A fog computing based approach to DDoS mitigation in IIoT systems’, Computers and Security, Vol. 85, pp.51–62 [online] <https://doi.org/10.1016/j.cose.2019.04.017>.

Análisis de mezclas de derivados proteicos de espirulina y caseinato de sodio
con miras al diseño de productos lácteos con valor agregado



C. 23. Biofísica

Análisis de mezclas de derivados proteicos de espirulina y caseinato de sodio con miras al diseño de productos lácteos con valor agregado

Autora: Sanchez, María Florencia; maflorenciasanchez@fcv.unr.edu.ar

Co-autores: Ingrassia, Romina; romina_ingrassia@yahoo.com.ar; Risso, Patricia; phrisso@yahoo.com.ar

Tutora: Ingrassia, Romina; romina_ingrassia@yahoo.com.ar

Universidad Nacional de Rosario (UNR)

Resumen

La *Arthrospira (Spirulina) platensis* o espirulina (ESP) es un alga microscópica que ha demostrado ser una fuente potencial para el enriquecimiento de alimentos, no sólo desde un punto de vista nutricional sino también debido a que presenta en su composición valiosas sustancias bioactivas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción de derivados proteicos bioactivos de ESP (DPE) y el caseinato de sodio (NaCAS) como estrategia de incorporación de los DPE a productos lácteos. Los DPE se extrajeron a partir de ESP en polvo usando buffer fosfato 100 mM o CaCl_2 1,5% como soluciones extractoras (DPEB y DPEC, respectivamente). Éstos DPE fueron caracterizados por espectroscopía de absorción para determinar su contenido de ficobiliproteínas (FBP) y color (a^* , b^* y L^*). Se observó que DPEB presentó una mayor concentración de FBP totales y una la coloración más azulada. La interacción DPE - NaCAS se evaluó por espectroscopía de fluorescencia, verificándose la interacción entre ambos compuestos proteicos por los cambios en los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los residuos aromáticos. El conocimiento adecuado del efecto de la composición y el procesamiento en futuros estudios de estas mezclas contribuirán al entendimiento del comportamiento micro y macroscópico, especialmente de alimentos lácteos gelificados, como base para el desarrollo y agregado de valor al producto final.

Palabras claves: proteínas de espirulina, proteínas lácteas, fluorescencia



1. Introducción

Los conceptos actuales de nutrición tienen como objetivo establecer dietas balanceadas tendientes a maximizar las funciones fisiológicas para asegurar una buena salud y prevenir el riesgo de aparición de enfermedades. Es así, que se puso en auge el concepto de alimentos funcionales, siendo aquellos a los que se les ha añadido componentes bioactivos, se les ha reducido o eliminado componentes perjudiciales para la salud o se les ha aumentado la presencia de componentes benéficos para la salud.

Las microalgas son, desde hace varios siglos, incorporadas en la alimentación humana debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos y elevado aporte nutricional. Sin embargo, las especies utilizadas son en número restringidas y se cuenta con pocos estudios de la adición de microalgas como compuestos bioactivos en alimentos. La *Arthrospira (Spirulina) platensis*, comúnmente denominada espirulina (ESP), ha demostrado poseer un contenido proteico elevado (60-70% en base seca), con un buen balance de aminoácidos esenciales, ácidos grasos poli-insaturados, vitaminas y minerales, como así también una eficiente protección contra patologías como diabetes, efectos hipolipidémicos y anticancerígenos, entre otros (Anitha & Chandralekha, 2010; Narmadha et al., 2012; Seyidoglu et al.,

2017). No obstante, su aplicación en alimentos presenta características organolépticas poco atractivas para los potenciales consumidores, y es por ello que se requiere de un estudio en profundidad, y al mismo tiempo, la utilización de tecnologías que permitan mantener sus características nutricionales de interés para el consumidor.

Las microalgas del género *Arthrospira* presentan un complejo multimérico denominado ficobilisoma, donde se encuentran pigmentos y ficobiliproteínas denominadas ficoeritrina (PE), aloficocianina (APC) y ficocianina C (FCC). Estas proteínas son solubles en agua, presentan colores intensos y elevada fluorescencia. De todas ellas, la FCC es la que se encuentra en mayor cantidad y presenta una coloración azul intensa, presentando demostradas propiedades antioxidantes, antivirales e inmunomoduladoras, lo que resulta promisorio para su potencial utilización como nutracéutico en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. (Capelli & Cysewski, 2010; Fernández-Rojas et al., 2014; Pandey et al., 2013). En este contexto, es de gran interés poder adicionar DPE a alimentos de consumo masivo como los derivados lácteos y, para ello, es de suma importancia estudiar en detalle las interacciones fisicoquímicas que podrían ocurrir entre sus componentes.



Las proteínas lácteas, caseínas (CN) y proteínas del lactosuero, son importantes ingredientes alimenticios debido a sus propiedades nutricionales y funcionales (Kinsella & Morr, 1984). Particularmente, las CN son fosfoproteínas específicas de la leche que precipitan a pH 4,6 y representan alrededor del 80% del contenido proteico de la leche bovina. Las CN precipitadas a pH 4,6 pueden ser resolubilizadas por incremento del pH, obteniéndose caseinatos. Con la adición de NaOH se obtiene caseinato de sodio (NaCAS), un ingrediente muy utilizado en la industria alimentaria (Mulvihill & Fox, 1989).

La fluorescencia intrínseca (FI) de las proteínas es atribuida a los residuos aminoacídicos aromáticos triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Los grupos indólicos del Trp son dominantes en cuanto a la absorción en la zona ultravioleta y a la emisión de proteínas. Si bien las Tyr presentan un rendimiento cuántico similar al Trp, su espectro de emisión se distribuye en un rango estrecho de longitudes de onda, lo que da la impresión de un mayor rendimiento cuántico. Para el caso de las proteínas nativas, la emisión de la Tyr es a menudo extinguida debido probablemente a la su interacción con la cadena peptídica o por transferencia de energía hacia el Trp. Por otro lado, el espectro de emisión de la Phe se observa únicamente cuando la proteína

carece tanto de residuos de Tyr como de Trp, lo cual raramente ocurre. La emisión del Trp es altamente sensible a su ambiente local, y por ende, es utilizada a menudo para reportar cambios conformacionales proteicos en consecuencia de diversos fenómenos: unión de ligandos, asociación proteína-proteína, desplegamiento proteico, etc. El máximo de emisión de las proteínas refleja la exposición promedio de sus residuos Trp hacia la fase acuosa (Lakowicz, 1986). Es por eso que puede utilizarse la espectroscopía de fluorescencia para estudiar la interacción entre el NaCAS y los DPE.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Otorgar valor agregado a alimentos de consumo masivo (productos lácteos) a través de la incorporación de derivados proteicos bioactivos de ESP.

2.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar la capacidad extractiva de dos solventes acuosos para la obtención de derivados proteicos de ESP (DPE).
- Estudiar la interacción proteica de DPE y NaCAS por métodos fluorescentes y en función de la fluorescencia intrínseca de los residuos aromáticos de ambos grupos proteicos.

-Analizar el efecto de la presencia de NaCAS en los espectros de emisión de la FCC de los DPE.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención y caracterización de DPE

3.1.1. Preparación de los DPE

Se prepararon dos extractos acuosos de DPE a partir de dispersiones acuosas de ESP en polvo de producción local (Empresa Hydro Farming S.A., Santa Fe, Argentina) al 2%(P/P). En un caso se utilizó buffer fosfato 100 mM pH 7 como solución extractora (muestras DPEB) y, en otro caso, CaCl₂ 1,5 % (muestras DPEC).

3.1.2. Determinación de parámetros de color

Se tomaron imágenes de los extractos bajo condiciones de iluminación apropiadas usando una cámara de alta resolución. Las mismas fueron analizadas con el Programa Image J (versión 1.47) con la finalidad de obtener los parámetros L*, a* y b* (Abràmoff et al., 2004).

3.1.3. Cuantificación de proteínas solubles (ficobiliproteínas)

A los extractos proteicos obtenidos se les determinó:

- la concentración de FCC (C_{FCC}, en mg/mL) como $(Abs_{615}-0,474 \times Abs_{652})/5,34$);
- la concentración de APC (C_{APC}, en mg/mL) como $(Abs_{652}-0,208 \times Abs_{615})/5,09$);
- y la concentración de PE (C_{PE}, en mg/mL) como $(Abs_{562}-2,41 \times C_{FCC}-$

$0,849 \times C_{APC})/9,62$), siendo Abs₆₁₅, Abs₆₅₂ y Abs₅₆₂ las absorbancias a 615, 652 y 562 nm, respectivamente (Bennett & Bogorad, 1973).

3.2. Preparación de mezclas DPE-NaCAS y obtención de espectros de emisión de fluorescencia intrínseca

El NaCAS se preparó al 3% (%P/P) en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.

Para los ensayos de fluorescencia se utilizó un espectrofluorómetro Aminco-Bowman serie 2. En una primera etapa, se realizaron espectros de excitación de muestras de NaCAS y DPEB con el objetivo de determinar las longitudes de onda máximas de excitación (λ_{exc}) a utilizar para la obtención de los espectros de emisión correspondientes a los residuos aromáticos de las muestras de NaCAS y DPE y a la FCC de las muestras de DPE.

En todas las mediciones, se realizó la corrección de efecto de filtro interno para cada valor de intensidad de fluorescencia (IF) a partir de los valores de Abs registrados a la λ_{em} y λ_{exc} utilizados, de acuerdo la siguiente fórmula: $IF \times 10^{\Lambda((Abs(\lambda_{em})+Abs(\lambda_{exc}))/2)}$ (Lakowicz, 1986).

3.2.1. Espectros de emisión de residuos aromáticos

Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia en la zona de residuos aromáticos (300-400 nm; $\lambda_{exc}=288$ nm) trabajando con una dilución inicial de 1/50 en buffer Tris 10 mM pH 7 de la muestra de

NaCAS 3% y posterior agregado de alícuotas de 10 μ L del DPE correspondiente (DPENC o DPENB). Además, se procedió de manera similar partiendo de una dilución inicial de 1/241 con buffer Tris 10 mM pH 7 del DPE (DPENC o DPENB) para obtener los espectros de emisión de fluorescencia de sus residuos aromáticos y se adicionaron alícuotas de 10 μ L de NaCAS 3%.

3.2.2. Espectros de emisión de FCC

Para la obtención de los espectros de emisión de la FCC (630-700 nm; $\lambda_{exc}=620$ nm), presente en los DPE, y para evaluar el efecto de la presencia del NaCAS, se preparó una dilución inicial de 1/241 y 5/241 con buffer Tris 10 mM pH 7 para el DPENB y DPENC, respectivamente. Posteriormente, se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia ante el agregado de sucesivas alícuotas de 10 μ L de NaCAS 0,06%.

3.3. Análisis estadístico

Las distintas determinaciones se realizaron al menos en dos experimentos independientes. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test ANOVA y Tukey con el Programa R (versión de prueba 4.0.2). Los valores reportados son los valores promedio \pm su desvío estándar. Las diferencias entre los mismos fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos para las concentraciones de cada una de las ficobiliproteínas presentes en los DPE obtenidos.

Tabla 1. Concentración de FCC, APC y PE de extractos obtenidos a partir de 2% ESP en Buffer Fosfato 100 mM pH 7 y CaCl_2 1,5% (DPEB y DPEC, respectivamente).

	DPEB	DPEC
C_{FCC} (mg/mL)	1,1 \pm 0,1 ^{a,b}	0,6 \pm 0,1 ^a
C_{APC} (mg/mL)	0,46 \pm 0,06 ^b	0,23 \pm 0,05 ^a
C_{PE} (mg/mL)	0,12 \pm 0,03 ^b	0,041 \pm 0,007 ^a

(*) Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se puede observar que el contenido proteico de FCC, PE y APC es significativamente mayor en todos los casos para los extractos preparados con buffer fosfato en comparación con los preparados en CaCl_2 , siendo (1,6 \pm 0,2) mg/mL y (0,9 \pm 0,1) mg/mL la concentración de ficobiliproteínas totales para DPEB y DPEC, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabla 2. Parámetros de color obtenidos para los DPE en medios acuosos de Buffer Fosfato 100 mM y CaCl_2 1,5%, DPEB y DPEC, respectivamente.

	L* (0 a 100)	a* (-120 a 120)	b* (-120 a 120)
DPEB	24 \pm 1 ^{a,*}	9,8 \pm 0,1 ^b	-37,4 \pm 0,8 ^a
DPEC	41 \pm 2 ^b	-3,2 \pm 0,6 ^a	-36,3 \pm 0,6 ^a

(*) Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A partir de los resultados del análisis de color de los extractos (Tabla 2), se evidencia que los DPEB presentan una menor tendencia al blanco (menor L*) y al

verde (menor a^*) y una mayor tendencia al azul (menor b^*). Estos resultados muestran una buena correlación con la concentración de FCC (de color azul) y la cantidad relativa de APC (color azul-verdoso) en los DPE. Mientras DPEB tiene una mayor concentración de ambas proteínas, la relación másica de FCC/APC por unidad de volumen es prácticamente el doble respecto a DPEC, lo que explicaría la coloración más intensa y menos verde (Tabla 2). Estos resultados indican que el medio buffer sería más adecuado para extraer las proteínas hidrosolubles presentes en la ESP, de manera contrapuesta a lo reportado por Ílter et al. (2018) y con trabajos previos del grupo de investigación (Sanchez et al., 2020). Esta tendencia podría estar relacionada al tipo de secado de la ESP de partida (secado por aspersión vs. secado por convección) y al impacto del mismo sobre las proteínas extraíbles a elevada fuerza iónica (CaCl_2 1,5%).

Por otro lado, con el objetivo de determinar la existencia de interacciones entre las proteínas presentes en los DPE y el NaCAS, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia. En primer lugar, se evaluó la emisión de fluorescencia de los residuos proteicos aromáticos, partiendo de NaCAS (0,06%) y ante el agregado sucesivo de alícuotas de DPE. La Figura 1 muestra dichos espectros para

NaCAS y sus mezclas con concentraciones crecientes de DPEB y DPEC (Figuras 1A y 1B, respectivamente). En ausencia de DPE, los espectros de emisión de fluorescencia del NaCAS de la Figura 1A y 1B muestran el típico pico centrado en ≈ 340 nm, esperable para soluciones proteicas, y que se asocia a la emisión de fluorescencia especialmente de residuos de Trp (Lakowicz, 1986). Si bien ante el agregado de alícuotas de DPE la λ_{em} permaneció sin cambios, la IF aumentó significativamente ante el incremento de la concentración de los DPE en las mezclas: desde $(14,2 \pm 0,4)$ hasta (29 ± 2) y (51 ± 3) , para las concentraciones más elevadas de DPEB y DPEC, respectivamente ($p < 0,05$). Este incremento en la IF en la zona de emisión de residuos aromáticos frente al aumento relativo de proteínas lácteas/DPE fue reportado recientemente por Zhang (2021) para mezclas de extracto de FCC y proteínas de lactosuero. En este trabajo, los autores sugieren que este fenómeno ocurre debido a que la presencia de proteínas del suero “estiran” la cadena de tetrapirroles de la FCC, promoviendo un incremento de la emisión de IF, y lo infieren por estudios complementarios de espectroscopía infrarroja donde demuestran la transformación de estructura α hélice a lámina β en la FCC.

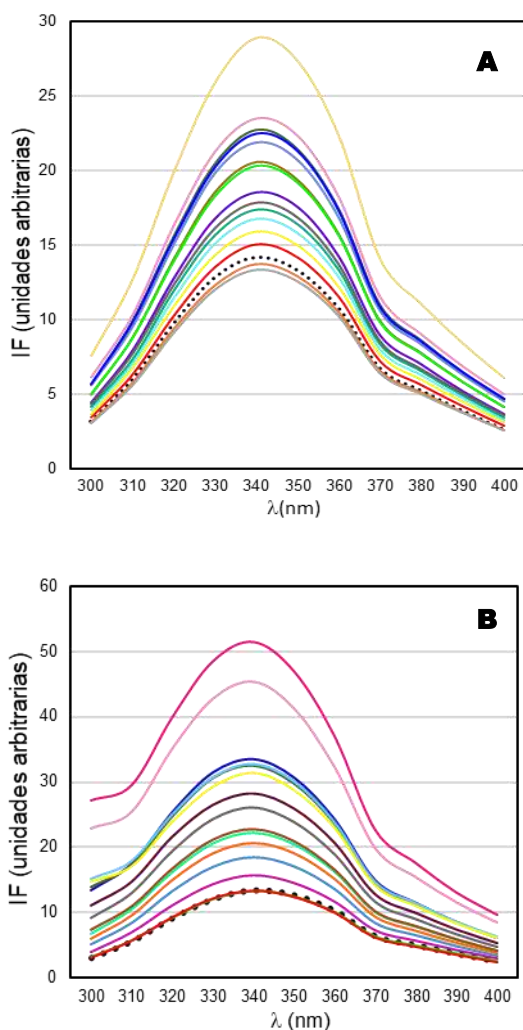


Figura 1. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de soluciones acuosas de NaCAS 0,06% en ausencia (•••) y en presencia de diferentes concentraciones crecientes de DPE. Concentración de ficobiliproteínas en la mezcla con DPEB (mg/100mL) **(A):** 6,5(-);13,0(-); 19,4(-); 25,8(-); 32,1(-); 38,4(-); 44,6(-); 50,8(-); 57,0(-); 63,0(-); 69,1(-); 75,1(-); 81,0(-); 86,9(-); 92,8(-); y DPEC (mg%) **(B):** 0,35(-); 0,70(-); 1,05(-); 1,39(-); 1,73(-); 2,07(-); 2,41(-); 2,74(-); 3,07(-); 3,40(-); 3,72(-); 4,04(-); 4,36(-); 4,68(-); 5,00(-). ($\lambda_{em}=288$ nm)

Este comportamiento puede atribuirse también a un aumento de la concentración

proteica (y exposición de residuos Trp al medio acuoso) en las mezclas NaCAS-DPE, y por ende, a un aumento de la cantidad de fluoróforos proteicos en los sistemas: a pesar de que la concentración de NaCAS disminuye levemente por el efecto de la adición de las alícuotas de DPE desde 0,0600% hasta 0,0566%, mientras que la concentración de las proteínas del DPE (Tabla 1) en el sistema se incrementan hasta $(0,0928 \pm 0,009)\%$ para el caso de DPEB y $(0,0050 \pm 0,0006)\%$ para el de DPEC, representando un incremento total de proteína en el sistema desde 0,06% hasta 0,15% y hasta 0,062%, para DPEB y DPEC, respectivamente. Por otra parte, no se descarta que este incremento de la IF pudiera estar indicando además la existencia de fenómenos de interacción proteína-proteína y/o agregación proteica para estas mezclas. Además, es interesante destacar que se observa que la IF aumenta en mucha mayor medida para el agregado del DPE que contiene casi la mitad de ficobiliproteínas (DPEC). Esto podría explicarse por el elevado contenido de Ca^{+2} en dicho extracto, que promovería la agregación proteica por apantallamiento de la carga superficial de las proteínas en la mezcla.

Se ensayó, además, el efecto de la adición de alícuotas de NaCAS 0,06% a una

dilución inicial del DPE de manera tal de partir de 0,68 mg/100mL y 0,37 mg/100mL de FBP totales para DPEB y DPEC, respectivamente. Los espectros de emisión de fluorescencia de los residuos aminoacídicos aromáticos de las mezclas DPE-NaCAS se muestran en la Figura 2.

Los picos de los espectros de DPE en ausencia de NaCAS centrados en ≈ 340 nm en las Figuras 2A y 2B se corresponden, al igual que en el caso de la Figura 1, con la fluorescencia intrínseca de los residuos de Trp de las proteínas presentes en los DPE. A medida que se incrementa la concentración de proteínas totales (ficobiliproteínas + NaCAS) en las mezclas, la IF aumenta. Este comportamiento también podría indicar la existencia de interacciones proteína-proteína y/o fenómenos de agregación proteica que conduzcan a cambios conformacionales con mayor exposición de los fluoróforos proteicos (Trp y Tyr).

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la FCC frente a la presencia de NaCAS, se obtuvieron los espectros de fluorescencia intrínseca de la FCC en ausencia y en presencia de distintas relaciones de NaCAS. Los resultados se muestran en la Figura 3.

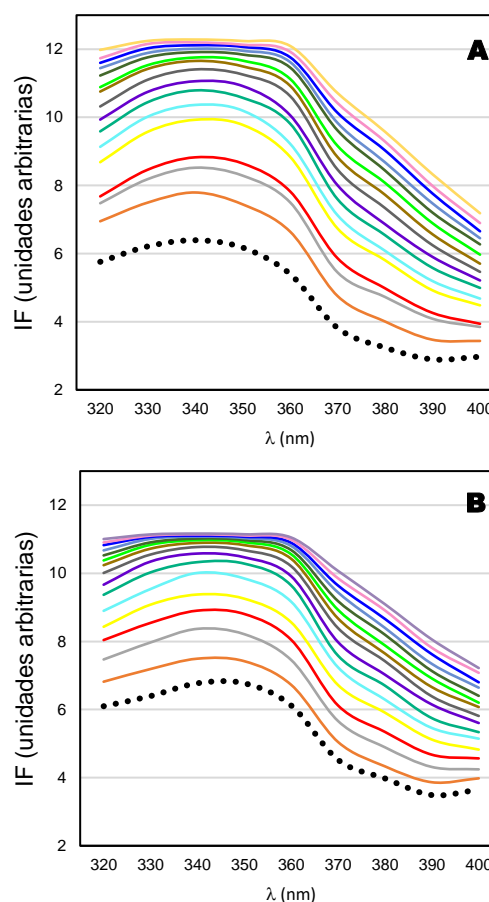


Figura 2. Espectros de emisión de FI de soluciones acuosas de (A) DPEB (0,68 mg/100mL) y (B) DPEC (0,37 mg/100mL) en ausencia (•••) y en presencia de diferentes concentraciones crecientes de NaCAS 0,06%. **(A)** Concentración DPE:Concentración de NaCAS en las mezclas DPEB-NaCAS (mg/100mL:mg/100mL): (—) 0,677:0,25; (—) 0,674:0,49; (—) 0,672:0,74; (—) 0,669:0,98; (—) 0,666:1,22; (—) 0,664:1,46; (—) 0,661:1,69; (—) 0,658:1,93; (—) 0,656:2,16; (—) 0,653:2,39; (—) 0,650:2,62; (—) 0,648:2,85; (—) 0,645: 3,07; (—) 0,643: 3,29; (—) 0,640: 3,52. **(B)** Concentración DPE:Concentración de NaCAS en las mezclas DPEC-NaCAS (mg%:mg%): (—) 0,365:0,25; (—) 0,363:0,49; (—) 0,362:0,74; (—) 0,360:0,98; (—) 0,359:1,22; (—) 0,357:1,46; (—) 0,356:1,69; (—) 0,355:1,93; (—) 0,353:2,16; (—) 0,352:2,39; (—) 0,350:2,62; (—) 0,349:2,85; (—) 0,348:3,97; (—) 0,346:3,29; (—) 0,345:3,52 ($\lambda_{em}=288$ nm).

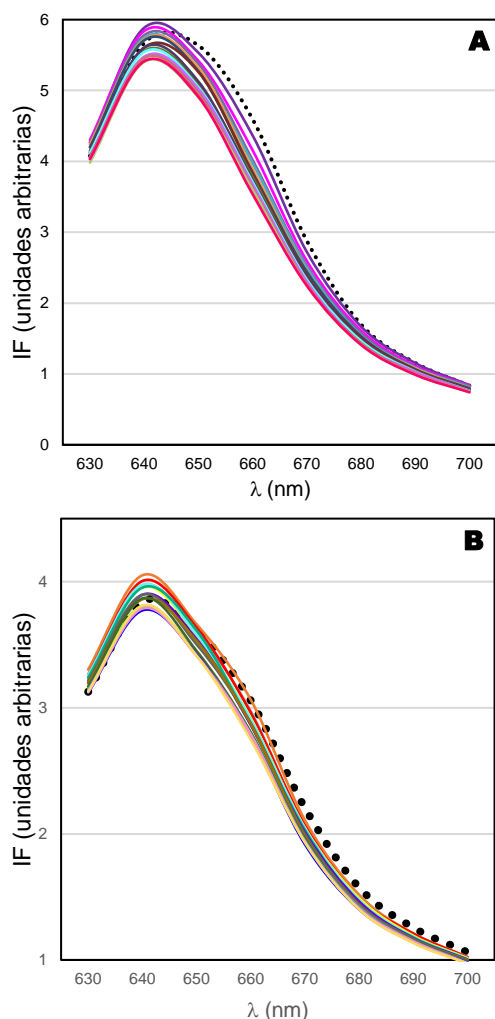


Figura 3. Espectros de emisión de FI de soluciones acuosas de (A) DPEB (0,68 mg/100mL) y (B) DPEC (1,83 mg/100mL) en ausencia (•••) y en presencia de diferentes concentraciones crecientes de NaCAS 0,06%. **(A)** Concentración DPE:Concentración de NaCAS en las mezclas DPEB-NaCAS (mg/100mL:mg/100mL): (—) 0,677:0,25; (—) 0,674:0,49; (—) 0,672:0,74; (—) 0,669:0,98; (—) 0,666:1,22; (—) 0,664:1,46; (—) 0,661:1,69; (—) 0,658:1,93; (—) 0,656:2,16; (—) 0,653:2,39; (—) 0,650:2,62; (—) 0,648:2,85; (—) 0,645: 3,07; (—) 0,643: 3,29; (—) 0,640: 3,52. **(B)** Concentración DPE:Concentración de NaCAS en las mezclas DPEC-NaCAS (mg%:mg%): (—) 0,365:0,25; (—) 0,363:0,49; (—) 0,362:0,74; (—) 0,360:0,98; (—) 0,359:1,22; (—) 0,357:1,46; (—) 0,356:1,69; (—) 0,355:1,93; (—) 0,353:2,16; (—) 0,352:2,39; (—) 0,350:2,62; (—) 0,349:2,85; (—) 0,348:3,97; (—) 0,346:3,29; (—) 0,345:3,52 ($\lambda_{em}=288$ nm).

Los espectros de IF vs. λ muestran el pico característico de la FCC centrado a ≈ 642 nm, destacando la fluorescencia roja característica de esta ficobiliproteína (Yan et al., 2011) (Figura 4).

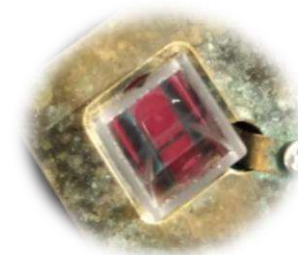


Figura 4. DPEB (0,68 mg/100mL) en ausencia de NaCAS durante las mediciones de fluorescencia intrínseca de FCC. Se observa la fluorescencia roja característica de la FCC. ($\lambda_{exc}=620$ nm)

En la Figura 3 se observa que no se detectan cambios en los espectros de emisión de la FCC presente en los DPE frente al incremento másico relativo de NaCAS: la λ_{em} máxima y la IF se mantuvieron sin cambios significativos en un valor de $(642,4 \pm 0,6)$ nm y $(45,5 \pm 0,5)$, y de (643 ± 3) nm y $(43,5 \pm 0,7)$, para el caso de DPEB y DPEC, respectivamente ($p > 0,05$). Esto estaría indicando que el rendimiento cuántico de la FCC no se ve afectado por la presencia del NaCAS, al menos en las condiciones ensayadas. Es probable que esto se deba a la baja sensibilidad de este fluoróforo a las condiciones de su entorno, especialmente en estos sistemas diluidos. Este resultado es promisorio ya que apunta a que la fluorescencia roja y el color azul característico de la FCC no sería afectado por la presencia del NaCAS.

5. Conclusiones

En primer lugar, el medio buffer fosfato permitió extraer las proteínas hidrosolubles de la ESP con mayor rendimiento respecto al medio CaCl_2 . Por otro lado, se verificó la interacción proteica (y/o agregación) entre las proteínas presentes en los DPE obtenidos y el NaCAS a través de cambios en los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de los residuos aromáticos.

Es interesante destacar que el aumento de la cantidad relativa DPEC en las mezclas con NaCAS se evidenció como un incremento en mayor grado de la IF de los residuos aromáticos, probablemente debido a la elevada fuerza iónica del medio extractivo utilizado para preparar el DPE.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la FCC no presentaron cambios significativos ante la presencia de NaCAS, por lo cual la posible interacción entre ambas fracciones proteicas no afectaría significativamente las propiedades de color de la FCC, vinculadas estrechamente a la capacidad antioxidante de esta proteína.

El conocimiento adecuado del efecto de la composición y el procesamiento en futuros estudios de estas mezclas contribuirán al entendimiento del comportamiento micro y macroscópico especialmente de alimentos lácteos gelificados adicionados con DPE como agente bioactivo y colorante natural,

como base para el desarrollo y agregado de valor del producto final.

6. Bibliografía

- Abràmoff, M. D. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36-42.
- Anitha, L., & Chandralekha, K. (2010). Effect of supplementation of Spirulina on blood glucose, glycosylated hemoglobin and lipid profile of male non-insulin dependent diabetics. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(1), 36-46.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58(2), 419-435. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- Capelli, B., & Cysewski, G. R. (2010). Potential health benefits of spirulina microalgae. *Nutrafoods*, 9(2), 19-26. <https://doi.org/10.1007/bf03223332>
- Fernández-Rojas, B. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11(Supplement C), 375-392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
- Íter, I. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88.



<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>

Kinsella, J. E., & Morr, C. V. (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 21(3), 197-262.

Lakowicz, J. R. (1986). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press.

Mulvihill, D. M., & Fox, P. F. (1989). Caseins and manufactured. In P. F. F. Ed. (Ed.), *Development in Dairy Chemistry* (Vol. 4, pp. 97-130). Elsevier Applied Science.

Narmadha, T. (2012). Effect of Spirulina on lipid profile of hyperlipidemics. *World Journal of Science and Technology*, 2(1).

Pandey, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2(9), 89-97.

Sanchez, M. F. (2020, 24 y 25 de noviembre de 2020). Estudios preliminares para la obtención de colorantes naturales a partir de una microalga. Congreso y XL Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Seyidoglu, N. (2017). A Prominent Superfood: Spirulina platensis. In N. Shiomi & V. Waisundara (Eds.), *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine* (pp. Ch. 01). InTech. <https://doi.org/10.5772/66118>

Yan, S.-G. (2011). Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin with high purity and recovery from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9525-7>

Zhang, S. (2021). Whey protein improves the stability of C-phycoerythrin in acidified conditions during light storage. *Food Chemistry*, 344, 128642. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128642>

Sistemas 1D acoplados débilmente por intercambio



C. 23. Biofísica

Sistemas 1D acoplados débilmente por intercambio

Autor: Kemmerer, Axel. axelkemmerer@hotmail.com

Profesores guía: Brondino, Carlos Dante. brondino@fcb.unl.edu.ar

Pérez, Ana Laura. alopez@fcb.unl.edu.ar

Universidad Nacional del Litoral (UNL)

Resumen

Se presentan estudios magnéticos, de EPR y computacionales sobre dos sistemas moleculares de una dimensión (1D) estructuralmente bien caracterizados: los complejos CuPic y CuDipic. Los resultados experimentales y teóricos confirmaron que las cadenas estructurales en ambos compuestos se comportan como cadenas magnéticas en las que los iones de cobre están débilmente acoplados por intercambio isotrópico. Las mediciones de susceptibilidad magnética de CuPic sugirieron que los iones de cobre están acoplados antiferromagnéticamente, mientras que las mediciones de EPR sugirieron un acoplamiento ferromagnético a una temperatura superior a 100 K, que se vuelve antiferromagnético a bajas temperaturas. Los cálculos computacionales indicarían que el cambio ferromagnético-antiferromagnético puede deberse al acortamiento de la distancia entre el átomo de Cu(II) y sus ligandos oxígeno apicales ($d_{\text{Cu-Oap}}$) al bajar la temperatura, que redistribuye la pequeña densidad de espín no apareado de Cu(II) deslocalizada en el ligando apical al cobre. Las mediciones de susceptibilidad magnética en CuDipic junto con los cálculos computacionales mostraron que los caminos químicos que dan lugar a la escalera 1D transmiten interacciones de intercambio ferromagnético con diferentes intensidades, y la interacción más fuerte se transmite a lo largo de los peldaños.

Palabras clave: EPR, sistemas 1D, propiedades magnéticas



Introducción

El estudio de sistemas acoplados por intercambio es un campo del magnetismo molecular que impacta en disciplinas muy diferentes, desde el diseño de materiales magnéticos hasta la caracterización de los caminos químicos de transferencia electrónica en proteínas redox.^[1] El diseño de imanes moleculares de estado sólido requiere sintetizar compuestos formados por grupos magnéticos aislados, un objetivo difícil de lograr ya que los caminos químicos que unen estos centros suelen transmitir interacciones de intercambio no despreciables que pueden dar forma al comportamiento magnético general de un compuesto dado. Se aplican consideraciones idénticas para los sistemas magnéticos de una dimensión (1D) y dos dimensiones (2D), para los cuales se requiere la presencia de interacciones de intercambio entre cadenas/capas insignificantes.^[1b,2] El impacto en la biología es quizás menos visible. Los sistemas biológicos como las proteínas de transferencia electrónica y las enzimas redox realizan reacciones de transferencia electrónica a largas distancias mediadas por caminos químicos que involucran centros paramagnéticos unidos por enlaces no covalentes y covalentes,^[3] que además pueden transmitir interacciones de intercambio

muy débiles.^[1a, 4] Las constantes de acoplamiento de intercambio asociadas con estos enlaces se pueden usar para inferir la capacidad de estos caminos químicos en la transferencia electrónica y, por lo tanto, aprender sobre los procesos de transferencia electrónica en los sistemas redox biológicos.^[5]

En los últimos años se han enfocado los esfuerzos en caracterizar sistemas moleculares 1D acoplados por intercambio. Además del interés teórico en el estudio de sistemas magnéticos 1D formados por topologías de espín similares y diferentes, el descubrimiento de que pueden experimentar el bloqueo de la magnetización a temperaturas muy bajas sugirió su uso en aplicaciones tecnológicas basadas en el magnetismo.^[1b,6] La caracterización magnética de los sistemas acoplados por intercambio 1D generalmente se realiza mediante mediciones magnéticas convencionales en el rango de temperatura de 2 K a temperatura ambiente asignando el eje magnético 1D al predicho por los datos estructurales.^[6e,7] Esta metodología ha demostrado ser muy valiosa, pero su utilidad es bastante limitada para aquellos casos de sistemas acoplados por intercambio muy débil ($|J| < 2 \text{ cm}^{-1}$), ya que los datos magnéticos de sistemas extendidos en el rango de 2 K a

temperatura ambiente, muestran en la mayoría de los casos, comportamientos simples de Curie-Weiss. Estas limitaciones se pueden superar mediante la espectroscopia de EPR aplicada a monocristal, que, independientemente de la fuerza de la interacción de intercambio, permite confirmar sin ambigüedades la dirección de la cadena magnética a partir de la variación angular del ancho de línea de EPR sobre la base del efecto causado por la dimensionalidad en la dinámica de espín de los sistemas.^[8] Además, estos procedimientos también han mostrado en algunos casos no solo un desajuste entre los ejes magnético y estructural,^[9] sino también una dimensionalidad diferente.^[10] Los complejos de cobre cadena-[bis(μ -piridina-2-carboxilato)-cobre-dihidratado]^[11] y cadena-[(μ -2-piridina-2,6-dicarboxilato)-diagua-cobre(II)]^[12] (en adelante CuPic y CuDipic, respectivamente) son dos ejemplos representativos de sistemas moleculares 1D estructuralmente bien caracterizados. El ácido piridina-2-carboxílico y el ácido piridina-2,6-dicarboxílico, también conocidos como ácidos picolínico y dipicolínico, son moléculas orgánicas ampliamente estudiadas como ligandos en química de coordinación debido a su baja toxicidad, naturaleza anfófila y numerosas

actividades biológicas y respuestas inmunitarias.^[13]

Con el fin de proporcionar información sobre las propiedades magnéticas de los sistemas estructurales 1D acoplados débilmente por intercambio, presentamos aquí un estudio detallado de las propiedades magnéticas de CuPic y CuDipic.

Objetivos

Sintetizar y cristalizar sistemas inorgánicos de iones Cu(II) con ligandos de relevancia biológica, como el ácido picolínico y dipicolínico.

Estudiar las propiedades magnéticas y de EPR de CuPic y CuDipic para comprender las propiedades de los sistemas estructurales 1D acoplados débilmente por intercambio.

Materiales y métodos

Síntesis y cristalización

Las síntesis de CuPic y CuDipic se realizaron de acuerdo a Takenaka, Furusaki et al. 1970 y Cingi, Villa et al. 1971, respectivamente, pero con algunas modificaciones.

Para CuPic se disolvieron Cu(CH₃COO)₂·H₂O (0,5 mmol, 0,099 g, Fluka) y ácido picolínico (1 mmol, 0,123 g, Sigma-Aldrich) en 100 mL de agua. La mezcla se agitó a 80 ° C hasta su

disolución. Para CuDipic se disolvió $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ (4 mmol, 0,221 g, Fluka) junto con ácido dipicolínico (4 mmol, 0,167 g, Sigma) en 200 mL de agua. La solución se agitó dos horas a 60°C. Ambas soluciones se filtraron usando una membrana de nitrato de celulosa Millipore de 0,22 μm y se dejaron evaporar lentamente a temperatura ambiente para CuPic y a 60 °C para CuDipic. Después de unos días se obtuvieron monocristales prismáticos de color azul y celeste, respectivamente.

EPR

Los espectros de EPR tomados en muestras policristalinas fueron obtenidos en banda X y banda Q utilizando un espectrómetro Bruker EMX-Plus equipado con un criostato de flujo continuo de nitrógeno (100-340 K) y con un criostato de flujo continuo de helio Oxford (4-100 K) y una cavidad rectangular y modulación de campo de 100 kHz. Para las mediciones en monocristales orientados, se determinó previamente la morfología del cristal usando un microscopio goniométrico Carl Zeiss para conocer el hábito del crecimiento del cristal. Posteriormente se montó el monocristal sobre un cristal cúbico de KCl (que define un sistema de referencia ortogonal xyz), y este se apoyó sobre un pedestal cilíndrico solidario a un

goniómetro, el cual se introdujo en la cavidad resonante del espectrómetro de EPR, y se adquirieron espectros de EPR desde 0° a 180° cada 10°, en los planos cristalinos xy, zx y zy para ambos compuestos. Se determinó la posición central \mathbf{B}_0 de las resonancias observadas y se calculó el factor g para cada orientación, utilizando la ecuación

$$g = \frac{h\nu}{\mu_B B_0} \quad (1)$$

donde μ_B es el magnetón de Bohr, h la constante de Planck y ν la frecuencia de microondas. La variación angular del factor g^2 fue ajustada con la ecuación

$$g^2(\theta, \varphi) = g_{zx}^2 \text{sen}^2 \theta \cos^2 \varphi + g_{yy}^2 \text{sen}^2 \theta \text{sen}^2 \varphi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta + 2g_{xy}^2 \text{sen}^2 \theta \cos \varphi \text{sen} \varphi + 2g_{zx}^2 \text{sen} \theta \cos \varphi \cos \theta + 2g_{zy}^2 \text{sen} \theta \text{sen} \varphi \cos \theta \quad (2)$$

en la cual θ representa el ángulo que forma el campo magnético \mathbf{B} con la proyección del eje cristalino c (c^*) y φ el ángulo que forma la proyección del campo magnético \mathbf{B} en el plano ab con el eje a . Los espectros de EPR fueron ajustados por cuadrados mínimos utilizando derivadas de funciones Lorentzianas para ambos compuestos.

Susceptibilidad magnética

Las medidas de susceptibilidad magnética se obtuvieron con un magnetómetro

Quantum Design MPMS2 SQUID. Las mediciones se realizaron en muestras de polvo de CuPic (53,0 mg) y CuDipic (40,7 mg) utilizando una cápsula de gelatina como portamuestras con una pequeña y conocida contribución diamagnética a 50 mT en el rango de temperatura de 1,8 y 300 K. Los valores de susceptibilidad magnética molar se corrigieron por diamagnetismo usando las constantes de Pascal.

Cálculos computacionales

Las interacciones de intercambio isotrópicas se calcularon utilizando condiciones de contorno periódicas con el primer principio de densidad híbrida de intercambio filtrada funcional de Heyd, Scuseria y Ernzerhof (HSE)^[18] y el conjunto de bases 6-311G(d,p). Ambos compuestos se modelaron asumiendo cadenas cortas periódicas de centros de Cu(II) dentro de la celda unitaria, dos para CuPic y seis para CuDipic. La constante de acoplamiento de intercambio isotrópico se calculó con la ecuación $J = (E_{AFM} - E_{FM})$, donde E_{FM} es la energía de una cadena acoplada ferromagnéticamente, y E_{AFM} es la energía de la misma cadena, pero con espín invertido. Las constantes de intercambio isotrópicas calculadas comprenden interacciones tanto covalentes como no covalentes. Las constantes de intercambio

entre cadenas se calcularon suponiendo dos cadenas adyacentes con dos centros de cobre cada una. En el caso de CuDipic, para evaluar las diferentes constantes de intercambio que contribuyen a J , se rotaron las moléculas de agua O_{5w} y O_{6w} y luego se calcularon las energías FM y AFM. Los cálculos se realizaron con los datos estructurales de ambos compuestos sin relajación.

Estructura y morfología de monocristales

Se realizaron mediciones de difracción de rayos X (DRX) de polvo en un difractor Shimadzu XD-D1 para confirmar que las estructuras corresponden a las reportadas previamente (ver la sección de Resultados). La morfología de los monocristales, necesaria para orientar la muestra para el experimento de EPR, se determinó con un microscopio goniométrico Carl Zeiss Axiolab. Las muestras de polvo para espectroscopía EPR o mediciones magnéticas se prepararon moliendo muestras monocristalinas con morfología bien definida.

Resultados y discusión

Estructura cristalina y molecular

Las mediciones de DRX en polvo realizadas en la mayor parte del material cristalizado confirmaron que los

compuestos sintetizados corresponden a las estructuras informadas anteriormente para CuPic y CuDipic (Figura 1), pero el difractograma de CuPic reveló la presencia de una contaminación o una fase adicional. Dado que la pureza de las muestras es esencial para los estudios que informamos aquí, confirmamos mediante cristalografía de rayos X de monocristal que la estructura de CuPic corresponde a las informadas previamente^[11], y que los monocristales no muestran evidencias de fases adicionales. La tabla 1 contiene los datos cristalográficos más importantes para CuPic, junto con una comparación con las estructuras reportadas por otros autores que se utilizaron en los cálculos teóricos. La estructura de CuPic fue reportada por primera vez por Takenaka et al,^[11r] seguido

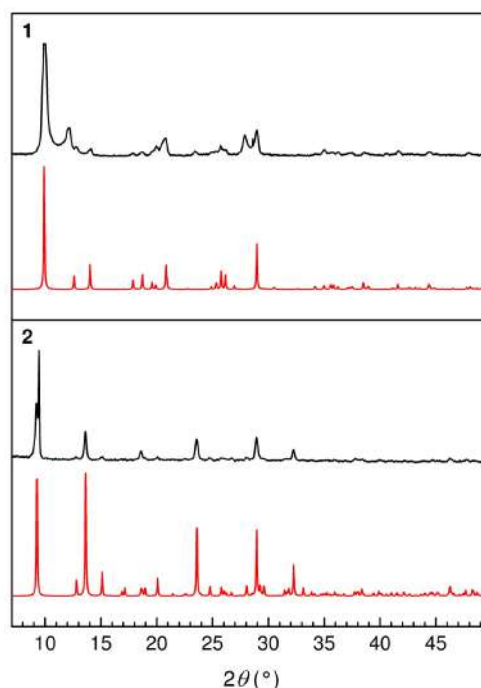


Figura 1. Difractogramas de rayos X en polvo de CuPic y CuDipic (negro) junto con sus simulaciones (rojo).

	CUPICH02 ^[a]	CUPICH14 ^[b]	CUPICH17 ^[c]	CUPICH20 ^[d]	CUPIC
Datos del cristal					
Grupo espacial	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$
a (Å)	5.172 (1)	5.090 (2)	5.13042 (15)	5.1820 (5)	5.1019 (4)
b (Å)	7.654 (2)	7.480 (4)	7.6958 (2)	7.7209 (7)	7.5418 (6)
c (Å)	9.175 (2)	9.067 (6)	9.2849 (2)	9.3191 (8)	9.1048 (10)
α (°)	74.92 (3)	75.89 (5)	74.450 (2)	74.8620 (10)	75.581 (8)
β (°)	84.22 (3)	84.94 (5)	84.436 (2)	84.392 (2)	84.814 (8)
γ (°)	71.69 (3)	71.96 (4)	71.252 (3)	71.3750 (10)	71.934 (7)
V (Å ³)	332.872	318.306	334.412	341.025	322.535
Factor R (%)	4.29	2.81	2.76	3.59	3.41
Temperatura(K)	283-303	120	283-303	283-303	293(2)

Tabla 1. Datos del cristal de CuPic [C₁₂H₈CuN₂O₄·2(H₂O)]. ^[a] P. Segl'a, M. Jamnický, M. Koman, J. Šima, T. Glowiak, *Polyhedron*. **1998**, *17*, 4525-4533. ^[b] D. Dutta, A. D. Jana, A. Ray, J. Marek, M. Ali, *Indian J. Chem., Sect. A*. **2008**, *47*, 1656-1660. ^[c] J. Tessarolo, A. Venzo, G. Bottaro, L. Armelao, M. Rancan, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 30-34. ^[d] L. L. Zheng, Lai; Wei, Li; Shiliang, Chen, *J. Molec. Sci.* **2014**, *30*, 106-111.

por una serie de informes de la misma estructura con calidad variable.^[11a-q,11s-x] La estructura de CuDipic fue reportada cuatro veces.^[12] Se presenta una breve descripción de las estructuras cristalinas y moleculares de CuPic y CuDipic como se informa en ^[11s] y ^[12b] para interpretar experimentos magnéticos y de EPR y cálculos computacionales.

CuPic cristaliza en el sistema triclínico, grupo espacial $P\bar{1}$, $Z=1$.^[11s] Los iones Cu(II) se encuentran en un entorno octaédrico ligeramente distorsionado coordinado a cuatro átomos de oxígeno carboxílico (O1, O1A, O2 y O2A) y a dos átomos de nitrógeno de piridina (N1 y N1A). La red cristalina de CuPic está compuesta por cadenas de iones Cu(II) magnéticamente equivalentes que corren a lo largo del eje

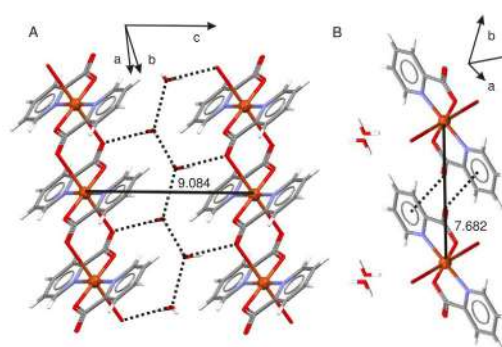


Figura 2. Entorno de coordinación del ion cobre (II) de CuPic y caminos intra e intercadena que unen los iones cobre (II). Los enlaces entre cadenas son proporcionados por enlaces de hidrógeno (A) e interacciones CO- π (B). Las distancias Cu-Cu están en Å. Se indican los ejes cristalográficos.

cristalográfico a (Figura 2A). El camino químico intracadena está compuesto por dos restos de carboxilato relacionados por simetría, en los que los átomos de oxígeno actúan como ligandos ecuatoriales y apicales para los iones Cu(II) adyacentes.

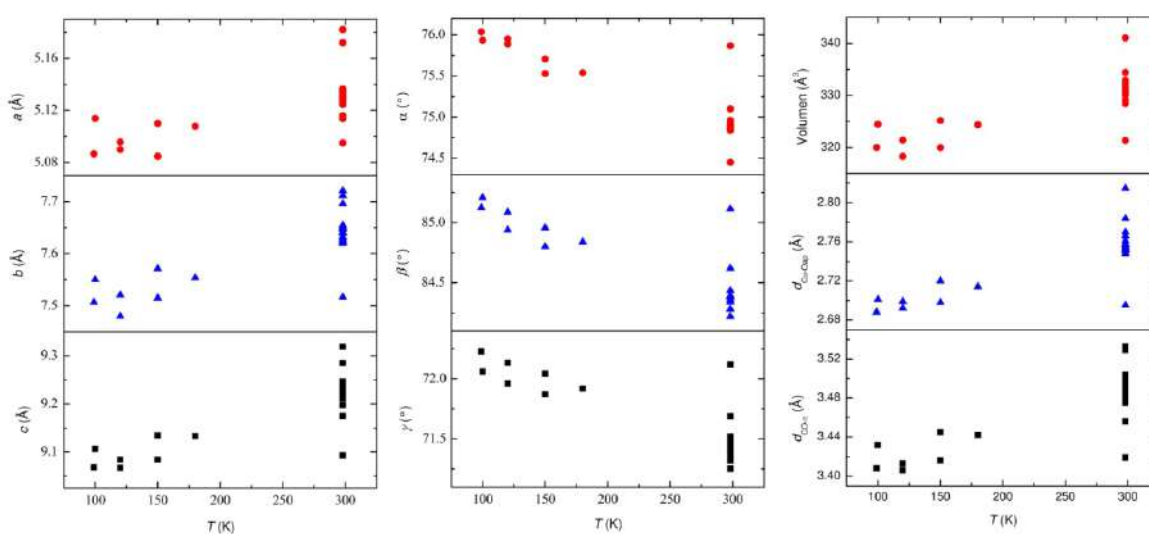


Figura 3. Parámetros de celda y algunas distancias relevantes de CuPic en función de la temperatura para todas las entradas informadas en el Centro de datos cristalográficos de Cambridge.

Las cadenas adyacentes se estabilizan principalmente mediante dos tipos de interacciones. Una de ellas está formada por cadenas reticulares de moléculas de agua en zigzag, unidas por hidrógenos, que corren a lo largo del eje cristalino a (Figura 2A). La segunda interacción está determinada por interacciones dobles simétricas de tipo $\text{CO}-\pi$ entre el grupo carboxilato y el anillo piridínico (Figura 2B). Hay 24 estructuras cristalográficas reportadas de CuPic en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC).^[11] La mayoría de ellos se determinaron a temperatura ambiente, mientras que los restantes en el rango de temperatura de 99-180 K. Una inspección de los parámetros de celda para 22 de estas estructuras en función de la temperatura revela una distorsión leve, pero no despreciable, de la celda unitaria del cristal cuando la temperatura varía. A medida que la temperatura disminuye, las longitudes de los bordes de la celda unitaria (a , b , c) y el volumen de la celda unitaria disminuyen, mientras que los ángulos entre los bordes (α , β , γ) aumentan (Figura 3). Los cambios en los parámetros de la celda unitaria se correlacionan con un acortamiento esperado a baja temperatura tanto de la distancia $\text{Cu}-\text{O}_{\text{ap}}$ como de la separación entre los restos de ácido picolínico que interactúan a través de interacciones $\text{CO}-\pi$

(Figura 3). Este comportamiento se tendrá en cuenta al analizar los resultados de EPR y susceptibilidad magnética que se dan a continuación.

CuDipic cristaliza en el sistema monoclinico, grupo espacial $\text{P2}_1/\text{c}$, $Z=4$.^[12b] Los iones $\text{Cu}(\text{II})$ están en un entorno octaédrico ligeramente distorsionado coordinado con dos átomos de oxígeno del agua (O5 y O6), dos átomos de oxígeno carboxílico (O1 y O3) y el átomo de nitrógeno de la piridina (N1) del ácido dipicolínico, y un átomo de oxígeno (O3C) de una molécula de ácido dipicolínico adyacente. O3C y O6 ocupan las posiciones apicales del octaedro. Las cadenas de iones de cobre de CuDipic

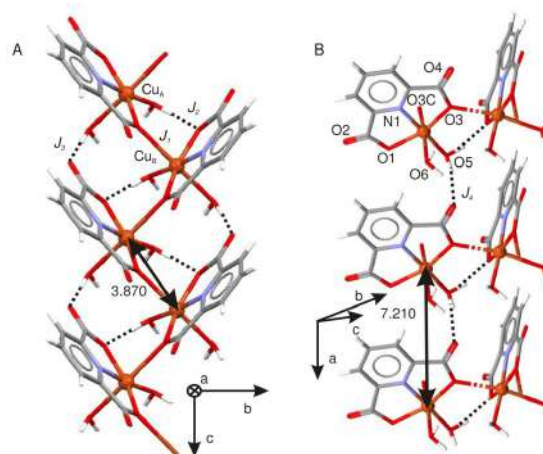


Figura 4. Entorno de coordinación de los iones de cobre (II) de CuDipic. A) Perspectiva de la red cristalina que muestra una cadena de iones de $\text{Cu}(\text{II})$ a lo largo del eje del cristal c . J_1 , J_2 y J_3 indican rutas dentro de la cadena que conectan iones $\text{Cu}(\text{II})$. B) Perspectiva de red cristalina que muestra interacciones entre cadenas. Las distancias $\text{Cu}-\text{Cu}$ están en Å. Se indican los ejes cristalográficos.

presentan una estructura en forma de escalera con laterales que recorren el eje *c* del cristal y peldaños en zigzag (Figura 4A). La cadena está compuesta por moléculas relacionadas por simetría *C2b* identificadas como Cu_A (*x*, *y*, *z*) y Cu_B (-*x*, 1/2+*y*, 1/2-*z*) (*d*_{Cu-Cu} = 3.870 Å). Las rutas entre laterales se identifican como *J*₁ (-Cu-O₃-Cu-) y *J*₂ (-Cu-O₅...O₁-Cu-) mientras que la ruta intralateral como *J*₃ (-Cu-O₆...O₂-C-Cu-). Las cadenas adyacentes se estabilizan mediante la vía identificada como *J*₄ en la Figura 4B.

Mediciones de susceptibilidad magnética

Las mediciones de susceptibilidad magnética (χ) dependiente de la temperatura de muestras de polvo de CuPic y CuDipic se muestran en los paneles superior e inferior de la Figura 5. Ambos compuestos muestran un comportamiento Curie-Weiss típico de los centros mononucleares de cobre(II) acoplados débilmente por intercambio. Un gráfico de χT frente a *T* de CuPic muestra un comportamiento antiferromagnético a bajas temperaturas en línea con Luo et al,^[11] pero los datos de χT a alta temperatura no muestran el comportamiento constante esperado para espines *S*=1/2 acoplados por intercambio débil.^[14] En este sentido, nuestros resultados no son concluyentes sobre el

comportamiento ferromagnético por encima de 40 K informado anteriormente.^[11] Por otro lado, a partir de la comparación de todas las estructuras informadas, notamos que CuPic experimenta cambios estructurales sutiles con la temperatura, sugiriendo que podrían ser responsables del comportamiento magnético atípico de CuPic con la temperatura. El hecho de que no se pudiese obtener una conclusión clara de las mediciones magnéticas nos llevó a

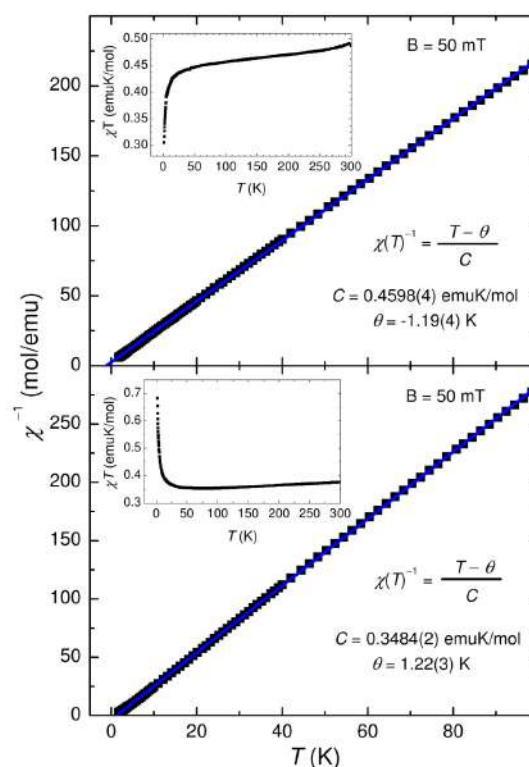


Figura 5. Gráfico de la inversa de la susceptibilidad magnética $\chi^{-1}(T)$ vs *T* para CuPic (superior) y CuDipic (inferior). Los parámetros se obtuvieron por mínimos cuadrados ajustando un modelo de Curie-Weiss a los datos. Los gráficos χT vs *T* de los datos se muestran en los recuadros. El análisis de Curie-Weiss se realizó en el rango de temperatura de 1,8 a 100 K.

realizar más estudios de EPR en función de la temperatura para CuPic, que se mostrarán y racionalizarán con los cálculos de DFT (teoría del funcional de la densidad).

En contraste con lo observado en CuDipic, la gráfica χT vs T de CuDipic indica acoplamiento ferromagnético entre iones de cobre en el rango de temperatura (Figura 5, panel inferior). El análisis de estos datos asumiendo un modelo de Curie-Weiss arrojó $C = 0,3484$ (2) emuK/mol y $\theta = 1,22$ (3) K.

Espectros de EPR de polvo

Los espectros de EPR de polvo en banda X y Q de CuPic y CuDipic a temperatura ambiente se muestran en la Figura 6. Los espectros de CuPic muestran una simetría casi axial ($g_{\parallel,\perp} = 2,239, 2,059$ en banda X; $g_{1,2,3} = 2.229, 2.049, 2.042$ en banda Q) sin

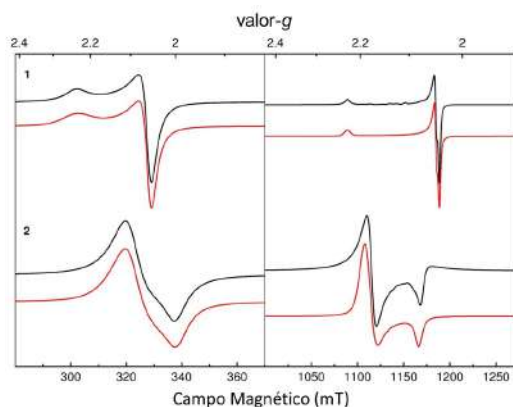


Figura 6. Espectros de EPR en polvo (líneas continuas negras) de 1 (CuPic, superior) y 2 (CuDipic, inferior) a temperatura ambiente junto con simulación (líneas continuas rojas). Panel izquierdo, banda X; panel derecho, banda Q.

evidencias de estructura hiperfina con el núcleo de cobre, lo que indica que esta interacción colapsa por intercambio.^[15] Los espectros de EPR de CuDipic también muestran simetría axial pero con $g_{\perp} > g_{\parallel}$ ($g_{\parallel,\perp} = 2.089, 2.191$, en banda X; $g_{\parallel,\perp} = 2.085, 2.188$, en banda Q). Al igual que CuPic, no se observan evidencias de estructura hiperfina debido a interacciones de intercambio Cu-Cu. Esta simetría axial no debe asociarse con sitios de cobre individuales porque los espectros de EPR de CuDipic resultan del colapso de las resonancias asociadas con dos iones Cu_A y Cu_B magnéticamente no equivalentes (Figura 4).

Como se dijo anteriormente, como no se pudo obtener una conclusión clara de los datos magnéticos dependientes de la temperatura de CuPic, realizamos mediciones de EPR en banda X de

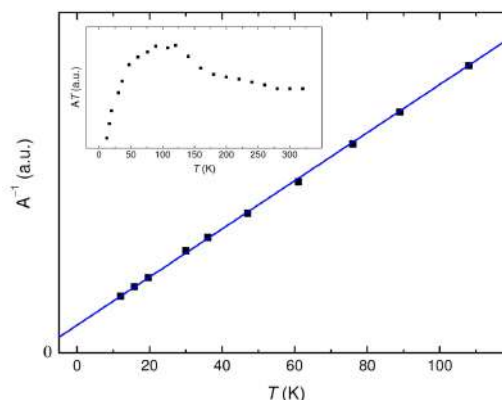


Figura 7. Inversa del área (A) de absorción del polvo de EPR en función de la temperatura. El recuadro muestra el gráfico de AT frente a T . A se obtuvo mediante doble integración de los espectros.

muestras de polvo en función de la temperatura. Los espectros tomados a diferentes temperaturas (4 K - temperatura ambiente) en condiciones no saturadas son esencialmente idénticos, siendo la diferencia más significativa la intensidad de la señal de EPR, cuanto menor es la temperatura, mayor es la intensidad. Como la absorción de potencia de la transición de resonancia magnética es proporcional a la susceptibilidad magnética dinámica χ'' ,^[16] graficamos el producto AT vs T , siendo A el área de absorción de EPR (Figura 7). Los resultados de EPR sugieren un comportamiento ferromagnético a alta temperatura, que no se observa en las mediciones magnéticas (Figura 5). Este hecho podría deberse a los bajos valores del momento magnético a alta temperatura, lo que resulta en la curva atípica χT vs T a altas temperaturas.

EPR de monocristal

Los espectros de EPR de monocristal en banda X y Q, a temperatura ambiente de CuPic y CuDipic mostraron una sola línea de resonancia lorentziana sin evidencias de estructura hiperfina para todas las direcciones de campo magnético probadas (Figuras 8 y 9). Esto indica, de acuerdo con las mediciones del polvo, la presencia de interacciones de intercambio lo suficientemente fuertes como para

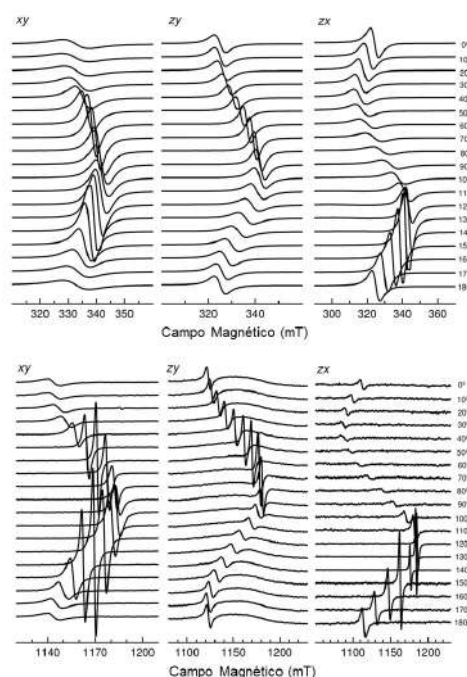


Figura 8. Espectros EPR de los tres planos cristalinos de CuPic en las bandas X y Q (superior e inferior, respectivamente).

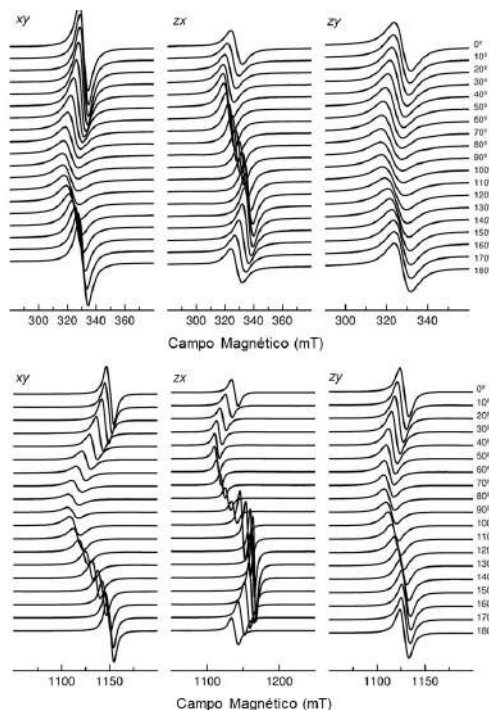


Figura 9. Espectros EPR de los tres planos cristalinos de CuDipic en las bandas X y Q (superior e inferior, respectivamente).

colapsar la estructura hiperfina de los iones Cu(II) en ambos compuestos, así como las resonancias de los dos iones Cu(II) magnéticamente no equivalentes de CuDipic.

EPR de monocristal: Ancho de línea (ΔB)

Los anchos de línea en los sistemas 1D pueden presentar dos contribuciones distintas que impactan tanto en la forma de la línea de resonancia como en la variación angular. Los datos de ancho de línea que se muestran en la Figura 10 muestran dos contribuciones principales distinguibles. Una de ellas es similar a la de la variación angular de g^2 (periodicidad 180°), en línea con dependencias angulares regidas principalmente por el segundo momento de la interacción hiperfina con los núcleos de cobre.^[19,20] La segunda contribución

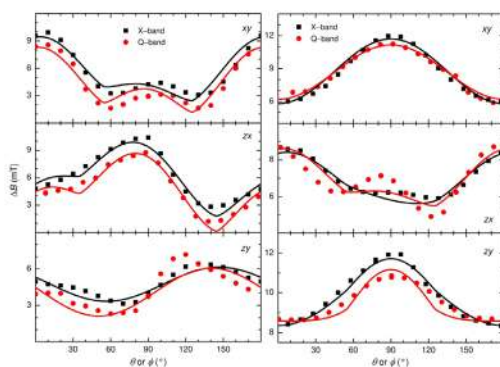


Figura 10. Variación angular de los datos de ancho de línea (ΔB) en las bandas X y Q (negra y roja) en tres planos de cristal de CuPic (panel izquierdo) y CuDipic (panel derecho). Las líneas continuas se obtuvieron mediante el ajuste de la ecuación 3 por mínimos cuadrados a los datos suponiendo un comportamiento magnético 1D.

principal es claramente perceptible en los planos xy y zx de CuPic y CuDipic, respectivamente, y proviene de interacciones dipolares que dependen en gran medida de la dimensionalidad magnética del sistema.

Para desentrañar las contribuciones dipolo-dipolo de la variación angular del ancho de línea total, analizamos los datos en la Figura 10 con la ecuación

$$\Delta B_{pp}(\theta, \phi) = A_1 \sin^2 \theta \cos^2 \phi + A_2 \sin^2 \theta \sin^2 \phi + A_3 \cos^2 \theta + A_4 2 \sin^2 \theta \cos \phi \sin \phi + A_5 2 \sin \theta \cos \phi \cos \theta + A_6 2 \sin \phi \sin \theta \cos \theta + A_7 f(\theta, \phi) \quad (3)$$

en la que los coeficientes A_1 - A_6 tienen en cuenta contribuciones con variaciones angulares de periodicidad de 180° , mientras que las contribuciones de interacciones dipolares son ponderadas por A_7 . $f(\theta, \phi)$ en la ecuación 3 representa dos alternativas diferentes para analizar la contribución dipolar, es decir, el segundo momento dipolar y $(1-3 \cos^2 \theta_c)^{4/3}$ en los casos 3D y 1D, respectivamente. Además, los datos de ancho de línea en ambos compuestos muestran pequeñas contribuciones dependientes de la frecuencia,^[19, 20] que evidencian en los coeficientes A_1 - A_6 . El análisis de mínimos cuadrados de la ecuación 3 de los datos considerando el modelo de cadena para la interacción dipolar se muestra como líneas continuas en la Figuras 10. A su vez, el

análisis de mínimos cuadrados de los datos asumiendo el modelo 3D (segundo momento de la interacción dipolar) arrojó coeficientes A_7 menores que la incertidumbre del método (~ 0.1 mT), lo que indica que ni CuPic ni CuDipic se comportan como sistemas 3D respecto a la interacción dipolar. La buena concordancia entre los datos de ajuste y experimentales para CuPic indica una buena correlación entre el magnetismo y la estructura, es decir, las cadenas estructural y magnética son las mismas. Por el contrario, los análisis de mínimos cuadrados de CuDipic produjeron un parámetro A_7 más alto, más cercano a la incertidumbre del método EPR ($\sim 0,1$ mT). Y si bien estos resultados también están en línea con un comportamiento magnético 1D, la cadena de escalera en zigzag de CuDipic no se detecta claramente como en CuPic.

Cálculos computacionales

Para CuPic el cálculo del primer principio del acoplamiento intracadena J se realizó utilizando las coordenadas de cuatro estructuras cristalinas de rayos X depositadas en el CCDC, que se identifican con el Código de referencia respectivo (ID de entrada). Los cálculos indicaron que los iones Cu(II) están acoplados ferromagnéticamente por encima de ~ 50 K con valores J de $1,2$ cm^{-1} (CUPICH02),^[11o]

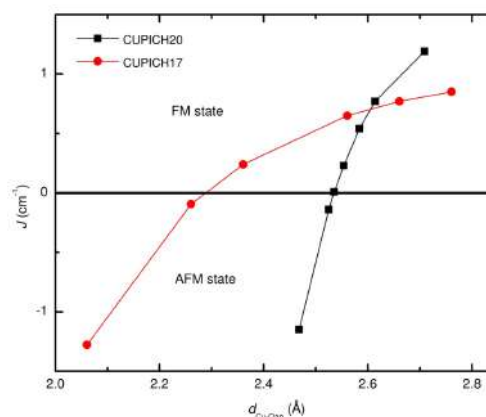


Figura 11. Interacción de intercambio (J) en función de $d_{\text{Cu-Oap}}$ calculado a partir de estructuras de rayos X CUPICH17 y CUPICH20 de CuPic. Las líneas continuas que unen los símbolos son para ayudar a la vista.

$1,2$ cm^{-1} (CUPICH17),^[11s] $1,1$ cm^{-1} (CUPICH14),^[11g] y $0,85$ cm^{-1} (CUPICH20).^[11i] Aunque se obtuvieron valores disímiles relacionados con pequeñas diferencias estructurales en las distancias de enlace de las cuatro estructuras, son indicativos del signo y magnitud de la interacción de intercambio transmitida por la cadena intracadena, camino químico que se muestra en la Figura 2A. La constante de intercambio entre cadenas calculada suponiendo dos cadenas aisladas está dentro del error del método teórico utilizado ($J < 0,01$ cm^{-1} , Figura 2). Los valores de J intra e intercadena están en línea con la naturaleza 1D de CuPic detectada en el experimento de EPR. También están en línea con los datos de EPR por encima de ~ 50 K (Figura 7), pero son inconsistentes

con el hecho de que CuPic se vuelve antiferromagnético por debajo de esa temperatura.

Dado que la mayoría de los datos del monocristal muestran una pequeña disminución en la longitud del enlace Cu-O_{ap} al bajar la temperatura (Figura 3), investigamos la dependencia de J en función de $d_{\text{Cu-Oap}}$ al acercarse simétricamente dos complejos de Cu (II) adyacentes situados a lo largo la cadena, al reducir el eje a de la celda unitaria de las estructuras CUPICH17 y CUPICH20 (Figura 2A). Estos cálculos mostraron que el acortamiento $d_{\text{Cu-Oap}}$ produce acoplamientos ferromagnéticos más bajos, que se vuelven antiferromagnéticos a distancias inferiores a 2,30 Å ($\Delta \approx 0,4$ Å) y 2,54 Å ($\Delta \approx 0,16$ Å) para CUPICH17 y CUPICH20, respectivamente (Figura 11).

Para racionalizar la transición FM-AFM de CuPic, calculamos la densidad de espín no apareado del ion Cu(II) y sus ligandos a dos distancias arbitrarias $d_{\text{Cu-Oap}}$ de 2.706 Å (estado FM) y 2.2606 Å (estado AFM) usando como modelo la estructura CUPICH17.^[11s] Como se muestra en la Figura 12, una pequeña fracción de la densidad de espín no apareada del ion Cu(II) está deslocalizada en el orbital “p_{||}” del ligando apical O-carboxilato Cu(II) en el estado ferromagnético, mientras que en el orbital “p_⊥” en el estado AFM (// y ⊥ se

refieren a las direcciones paralela y perpendicular a la dirección Cu-O_{ap}). La inspección de la densidad de espín no apareada en el resto de los ligandos de cobre indicó que no cambia significativamente en función de $d_{\text{Cu-Oap}}$. Por lo tanto, los resultados computacionales indicarían que la causa del cambio FM-AFM implica la reorganización de la pequeña deslocalización del espín de cobre no apareado en el ligando apical de Cu(II).

Para CuDipic la Figura 13 muestra una vista esquemática de las cadenas tipo escalera representadas en la Figura 3, que también se denomina escalera tipo triángulo en la literatura.^[17] Los cálculos de las interacciones de intercambio entre cadenas (J_4 , consulte también la Figura 4B) como se explica en la sección experimental arrojaron valores dentro del error del método ($J \sim 0,01$ cm⁻¹) y, por lo tanto, no se consideraron en nuestro análisis.

El cálculo de la energía de la cadena periódica que contiene 6 Cu (Figura 13) con todos los espines hacia arriba (estado ↑↑↑↑↑) y con un espín hacia abajo (indicado en rojo en la Figura 13, estado ↑↑↑↓↑), produjo, $\Delta E_{\text{AFM-FM}} = 7$ cm⁻¹, lo cual está en línea con la naturaleza ferromagnética de CuDipic revelada por los datos de susceptibilidad magnética (panel inferior de la Figura 5).

Para dilucidar la contribución tanto en signo como en magnitud de J_1 , J_2 y J_3 a J , rotamos sistemáticamente las moléculas de agua O_{5w} y O_{6w} juntas o individualmente para debilitar la interacción del enlace H asociada con J_2 y J_3 (Figura 4A). La rotación de las seis moléculas de agua O_{5w} involucradas en J_2 (J_1 y J_3 permanecieron sin modificar) produjo una desestabilización de los estados FM y AFM, pero el estado fundamental resultante permaneció ferromagnético ($\Delta E_{AFM-FM} = (J_1 + J_3) = 5,4 \text{ cm}^{-1}$). Esto demostró que J_2 estabiliza el estado ferromagnético. Se obtuvo el mismo resultado rotando las seis moléculas de agua O_{6w} (J_1 y J_2 permanecieron sin modificar) lo que produjo $\Delta E_{AFM-FM} (O_{6w}) = (J_1 + J_2) = 6,7 \text{ cm}^{-1}$. La rotación de O_{5w} y O_{6w} (J_1 permaneció sin modificar) produjo

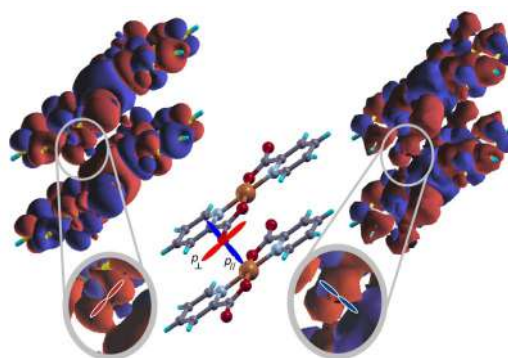


Figura 12. Densidad de espín desapareado de los estados AFM (izquierda) y FM (derecha). Las densidades de espín alfa y beta están en azul y rojo, respectivamente. El esquema en el centro muestra los orbitales de tipo 2p del ligando O_{ap} , donde los símbolos // y \perp se refieren a las direcciones paralela y perpendicular a la dirección Cu- O_{ap} , respectivamente. La figura se construyó con un valor de isosuperficie de $0,0001 \text{ e}/\text{Å}^3$.

$\Delta E_{AFM-FM} (O_{5w}/O_{6w}) = J_1 = 6,1 \text{ cm}^{-1}$. Estos procedimientos en conjunto indicaron que los tres caminos químicos transmiten interacciones de intercambio ferromagnético.

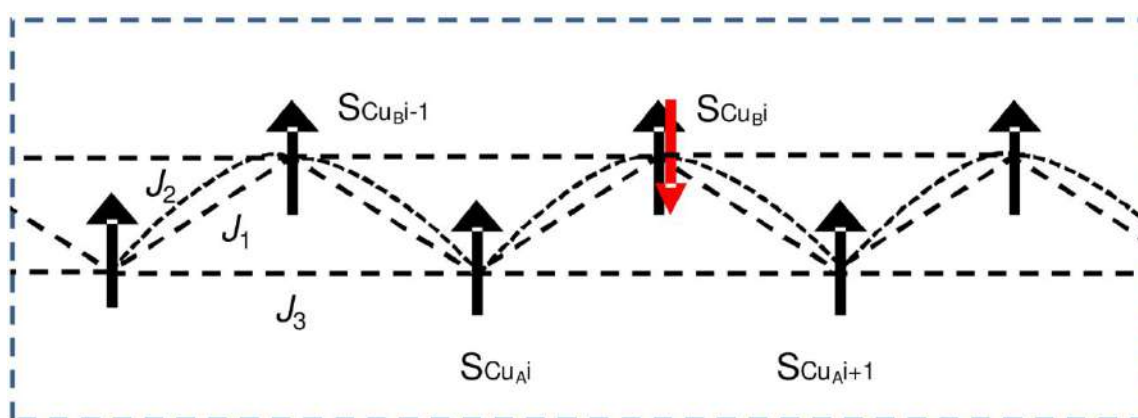


Figura 13. Vista esquemática de la cadena de escalera en zigzag de CuDipic que indica las constantes de intercambio isotrópicas asociadas a los caminos químicos que unen espines vecinos. J_1 y J_2 corresponden a las interacciones de intercambio transmitidas a través de los peldaños y J_3 a lo largo de los laterales (ver también la Figura 3A). El estado ferromagnético se indica con flechas negras (espín hacia arriba), mientras que la flecha roja indica un espín hacia abajo.

Conclusiones

La espectroscopía EPR monocristalina junto con las medidas de susceptibilidad magnética confirmaron que CuPic y CuDipic presentan cadenas magnéticas en las que los iones de cobre están acoplados débilmente por intercambio isotrópico.

Las mediciones de EPR en función de la temperatura en CuPic sugirieron que los iones de cobre están acoplados ferromagnéticamente a temperaturas superiores a 50 K pero antiferromagnéticamente por debajo de esa temperatura. Los cálculos computacionales indicaron que este cambio de FM \rightarrow AFM se debe al acortamiento de $d_{\text{Cu-O}_{\text{ap}}}$ al bajar la temperatura, lo que reorganiza la pequeña densidad de espín no apareado de Cu(II) deslocalizada en el ligando O_{ap} a cobre. Los experimentos de espectroscopia de EPR en monocristal a muy baja temperatura fueron necesarios para verificar si el comportamiento magnético 1D a temperatura ambiente se mantiene en el estado AFM.

Aunque la cadena de escalera en zigzag de CuDipic se puede clasificar como una red magnética 1D, el EPR de monocristal indicó un comportamiento magnético 1D menos evidente que el de CuPic.

Las mediciones de susceptibilidad magnética junto con los cálculos

computacionales mostraron que los caminos químicos que dan lugar a la escalera 1D transmiten interacciones de intercambio ferromagnético. Sin embargo, es evidente que las interacciones de intercambio más débiles transmitidas a lo largo de los laterales tienen cierta influencia en la dinámica de espín de CuDipic, lo que da como resultado un comportamiento magnético con algunas diferencias en relación con las cadenas magnéticas individuales.

Bibliografía

- [1] a) A. C. Rizzi, N. I. Neuman, P. J. González, C. D. Brondino, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 192-207; b) L. Bogani, A. Vindigni, R. Sessoli, D. Gatteschi, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4750-4758.
- [2] Y. Journaux, J. Ferrando-Soria, E. Pardo, R. Ruiz-García, M. Julve, F. Lloret, J. Cano, Y. Li, L. Lisnard, P. Yu, H. Stumpf, C. L. M. Pereira, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, *2018*, 228-247.
- [3] C. C. Moser, J. L. R. Anderson, P. L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1573-1586.
- [4] M. G. Rivas, P. J. González, F. M. Ferroni, A. C. Rizzi, C. D. Brondino, *Sci. Rev. Few.* **2020**, *1*, 6-23.
- [5] R. Calvo, E. C. Abresch, R. Bittl, G. Feher, W. Hofbauer, R. A. Isaacson, W.



- Lubitz, M. Y. Okamura, M. L. Paddock, J. *Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7327-7341.
- [6] C. Coulon, H. Miyasaka, R. Clérac, in *Single-Molecule Magnets and Related Phenomena* (Ed.: R. Winpenny), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2006**, pp. 163-206.
- [7] T. Ezuhara, K. Endo, K. Matsuda, Y. Aoyama, *New J. Chem.* **2000**, *24*, 609-613.
- [8] R. E. Dietz, F. R. Merritt, R. Dingle, D. Hone, B. G. Silbernagel, P. M. Richards, *Phys. Rev. Lett.* **1971**, *26*, 1186-1188.
- [9] a) I. Y. Drozdyuk, K. Y. Maryunina, R. Z. Sagdeev, V. I. Ovcharenko, E. G. Bagryanskaya, M. V. Fedin, *Mol. Phys.* **2013**, *111*, 2903-2907; b) R. A. Allao, A. K. Jordao, J. A. L. C. Resende, A. C. Cunha, V. F. Ferreira, M. A. Novak, C. Sangregorio, L. Sorace, M. G. F. Vaz, *Dalton T.* **2011**, *40*, 10843-10850.
- [10] a) L. J. de Jongh, A. R. Miedema, *Adv. Phys.* **1974**, *23*, 1-260; b) S. J. Blundell, F. L. Pratt, *J. Phys: Condens. Matter.* **2004**, *16*, R771-R828.
- [11] a) R. Cargnelutti, C. P. Delgado, R. Cervo, B. Tirloni, R. A. Burrow, E. S. Lang, *New J. Chem.* **2018**, *42*, 17185-17189; b) D. M. Čechová, *Jan CSD Commun.* **2020**; c) Y.-M. X. Chen, Qing-Fan; Xian, Jing-Chun, *Chinese J. Spectroscopy Lab.* **2004**, *21*, 167; d) W. H. Clegg, R.W. , *CSD Commun.* **2017**; e) D. K. Das, V. K. Kumar Pampana, K. C. Hwang, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7318-7326; f) M. Du, X.-H. Bu, M. Shionoya, M. Shiro, *J Mol Struct.* **2002**, *607*, 155-161; g) D. Dutta, A. D. Jana, A. Ray, J. Marek, M. Ali, *Indian J. Chem., Sect. A.* **2008**, *47*, 1656-1660; h) E. C. C. Lingafelter, H.J. , *ACA Abstr. Papers (Winter).* **1970**, *25*; i) L. L. Liu Zheng, Li Wei, Chen Shiliang, *J. Mol. Sci.* **2014**, *30*, 106-111; j) J. H. Luo, M. C. Hong, Q. Shi, Y. C. Liang, Y. J. Zhao, R. H. Wang, R. Cao, J. B. Weng, *Transition Met. Chem.* **2002**, *27*, 311-315; k) M. Mikuriya, H. Azuma, R. Nukada, Y. Sayama, K. Tanaka, J.-W. Lim, M. Handa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 2493-2498; l) R. N. S. Patel, Yogendra Pratap; Singh, Yogendra; Butcher, Raymond J., *CSD Commun.* **2015**; m) F. A. A. G. Paz, P.I.; Nogueira, H.I.S.; Trindade, T.; Klinowski, J., *Private Commun.* **2003**; n) J. Ran, X. Li, Q. Zhao, Z. Qu, H. Li, Y. Shi, G. Chen, *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, *13*, 526-528; o) P. Segl'a, M. Jamnický, M. Koman, J. Šima, T. Glowiak, *Polyhedron.* **1998**, *17*, 4525-4533; p) Z. A. Siddiqi, P. K. Sharma, M. Shahid, M. Khalid, Anjuli, A. Siddique, S. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 102-111; q) K. A. Siddiqui, *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 4168-4176; r) A. Takenaka, A. Furusaki, I. Nitta, H. Utsumoi, T. Yamamoto, *Nippon Kagaku zasshi.* **1970**, *91*, 928-935; s) J. Tessarolo, A. Venzo, G. Bottaro, L. Armelao, M. Rancan, *Eur. J. Inorg. Chem.*



2017, 2017, 30-34; t) L.-j. S. Wang, Li-ping; Liu, Chun, *J. Northeast Normal Univ. Nat. Sci. Ed.* **2006**, 38, 138; u) Q. Wang, Z. Yu, Q. Wang, W. Li, F. Gao, S. Li, *Inorg. Chim. Acta.* **2012**, 383, 230-234; v) J. Xia, M. Zhang, B. Zhao, P. Cheng, *Chin. J. Inorg. Chem.* **2006**, 22, 1406-1410; w) Q. H. Zhao, M. S. Zhang, R. B. Fang, *J. Struct. Chem.* **2006**, 47, 764-767; x) L. L. Zheng, Lai; Wei, Li; Shiliang, Chen, *J. Molec. Sci.* **2014**, 30, 106.

[12] C. Xie, Z. Zhang, X. Wang, X. Liu, G. Shen, R. Wang, D. Shen, *J. Coord. Chem.* **2004**, 57, 1173-1178.

[13] a) C. Janiak, *Dalton Trans.* **2003**, 2781-2804; b) R. Shrivastava, R. Nagar, G. Ravishankar, R. Upreti, U. Chaturvedi, *Indian J. Med. Res.* **2007**, 126, 440-446; c) Ö. Tamer, B. Sarıboğa, İ. Uçar, O. Büyükgüngör, *Spectrochim. Acta, Part A.* **2011**, 84, 168-177; d) M. Pilar Brandi-Blanco, J. María González-Pérez, D. Choquesillo-Lazarte, R. Carballo, A. Castiñeiras, J. Niclós-Gutiérrez, *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, 6, 270-273.

[14] O. Kahn, *Molecular Magnetism*, VCH Publishers New York, **1993**.

[15] a) C. D. Brondino, R. Calvo, A. M. Atria, E. Spodine, O. R. Nascimento, O. Peña, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 3183-3189; b) N. I. Neuman, V. G. Franco, F. M. Ferroni, R. Baggio, M. C. G. Passeggi, A.

C. Rizzi, C. D. Brondino, *J. Phys. Chem. A.* **2012**, 116, 12314-12320.

[16] J. A. Weil, J. R. Bolton, *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2007**.

[17] Y. I. Dublenych, *Phys. Rev. B.* **2016**, 93, 054415.

[18] J. Heyd, G. E. Scuseria, M. Ernzerhof, *J Chem Phys.* **2003**, 118, 8207-8215.

[19] Z. G. Soos, T. Z. Huang, J. S. Valentine, R. C. Hughes, *Phys. Rev. B.* **1973**, 8, 993-1002.

[20] A. M. Gennaro, R. Calvo, *J. Phys: Condens. Matter.* **1990**, 2, 2873-2873.

Financiamiento

Agradecemos a FONCyT, CONICET y CAI+D-UNL por el apoyo financiero.

USO DE HERRAMIENTAS BIOFÍSICAS PARA LA COMPARACIÓN DE MÉTODOS
DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA APLICADOS AL ESTUDIO DEL DETERIORO EN
SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.).

Autora: Rodríguez María Emilia¹

Tutoras: Schneider Teixeira Aline¹, Deladino Lorena¹, Ixtaina Vanesa¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA), CONICET, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Contacto: emiliaagronomia@gmail.com

C_23_Biofísica.

USO DE HERRAMIENTAS BIOFÍSICAS PARA LA COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN LIPÍDICA APLICADOS AL ESTUDIO DEL DETERIORO EN SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.).

RESUMEN

El análisis de extracción lipídica en semillas de chía, abordado desde un enfoque para estudios de deterioro, se encuentra escasamente desarrollado. El método más empleado para la extracción y cuantificación lipídica se realiza con un equipo Soxhlet. Sin embargo, otros métodos de extracción, a temperatura ambiente, denominados "en frío", son utilizados para el estudio del deterioro de semillas almacenadas. Las núculas de chía presentan un tenor lipídico de 25-32%, con un contenido mayoritario de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales representan alrededor del 80-85%. Éstos son altamente reactivos y susceptibles a la oxidación, siendo la temperatura un factor importante en la velocidad de reacción de dicho proceso. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad del aceite de chía obtenido a partir de dos métodos de extracción fríos y compararlos con el método de Soxhlet en semillas de

chía. Se determinó: humedad, rendimiento de materia grasa, composición de ácidos grasos, ácidos grasos libres, índices de saponificación y de yodo. La evaluación del estado oxidativo de los aceites se realizó a través de la determinación de compuestos primarios (hidroperóxidos, dienos (K_{232}) y trienos (K_{270}) conjugados) y secundarios de oxidación (malondialdehído mediante ensayo del ácido tiobarbitúrico, TBA). Además, se realizó un análisis biofísico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fournier (FT-IR). Los resultados obtenidos mostraron que los aceites extraídos por métodos fríos presentaron un mayor % de ácido linolénico y un valor de peróxido más alto con respecto al método de referencia (Soxhlet). La menor acidez libre correspondió a los aceites obtenidos por el método de Biondo, al igual que la entalpía de fusión, denotando

un mayor nivel de instauración y coincidiendo con las relaciones de áreas calculadas para FT-IR. Por otra parte, no se encontraron diferencias para el valor de TBA ni para los coeficientes K_{232} y K_{270} . Así, los métodos en frío resultaron más

1. INTRODUCCIÓN

Salvia hispanica L., cuyo nombre común es chía, es una planta herbácea anual, que pertenece a la familia de las *Lamiaceae*. Esta especie es originaria del sur de México y norte de Guatemala. Actualmente, su cultivo se realiza comercialmente en Argentina, Australia, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Nicaragua, Paraguay, Perú y Sudeste de Asia (Ayerza & Coates, 2005; Orona-Tamayo, Valverde, & Paredes-Lopez, 2017). La chía es originalmente una planta de día corto, iniciándose la fase reproductiva cuando el acortamiento del día sobrepasa un umbral determinado (10,5-12 h) (Ayerza & Coates, 2005; Hildebrand, Jamboonsri, & Phillips, 2013). Se trata de un cultivo sensible a las heladas, que se desarrolla óptimamente en climas tropicales y subtropicales, creciendo apropiadamente en latitudes que van aproximadamente desde 20° N a 25° S. El fruto de la chía, al igual que otras especies de la familia *Lamiaceae*, es típicamente un esquizocarpo consistente en lóculos indehiscentes que se separan para formar 4 mericarpos parciales denominados núculas, comúnmente

apropiados para la extracción de aceite de chía con fines de estudios de conservación de germoplasma a largo plazo.

Palabras clave: FT-IR, DSC, Conservación

conocidos como "semillas", los cuales son monospermicos, ovales, suaves y brillantes, de color pardo grisáceo con manchas irregulares marrones en su mayoría y algunos blancos (Ayerza & Coates, 2005). El contenido de lípidos, proteínas, fibra y cenizas de las núculas varía aproximadamente entre 25-32%, 19-29%, 27-29% y 4-5%, respectivamente, registrándose además la presencia de tocoferoles y polifenoles (miricetina, ácidos clorogénico y cafeico, kaempferol y quercetina (Ixtaina et al., 2011). La fracción lipídica de las semillas de chía está conformada principalmente por triacilgliceroles, siendo la trilinolenina el principal compuesto (Ixtaina et al., 2011). Como en otras plantas cultivadas, en la chía ha existido pérdida de variabilidad genética en el proceso de domesticación. La erosión genética tiene serias implicancias para el bienestar de la humanidad y de nuestro planeta. La conservación *ex situ* es una de las formas más eficaces de conservar el germoplasma de semillas tolerantes a la desecación (Smith & Berjak, 2017). Sin embargo, en el largo plazo, las mismas pueden perder viabilidad, con lo cual es

necesaria la evaluación de su deterioro a lo largo del tiempo. Los bancos de semillas son una estrategia reconocida para conservar la diversidad genética, proporcionando información sobre la biodiversidad de la Tierra (Walters & Pence, 2021). Si bien se han llevado a cabo algunas investigaciones relacionadas con el almacenamiento poscosecha de semillas de chíca (Cruz-Tirado et al., 2021; Moreira, Chenlo, Prieto, & Torres, 2012) no se ha encontrado información disponible acerca de la conservación y almacenamiento *ex situ* a largo plazo, ni sobre los eventos y cambios asociados tanto a la pérdida de viabilidad de las semillas, como a las modificaciones de las características físicas y químicas de estos sistemas durante el almacenamiento. La longevidad de semillas con alto contenido lipídico, suele ser en muchos casos reducida. Así es importante llevar a cabo estudios que permitan comprender el comportamiento de los lípidos durante el almacenamiento de las mismas. Diversas reacciones bioquímicas de deterioro se encuentran asociadas al proceso de envejecimiento de las semillas, tales como la peroxidación lipídica iniciada por radicales libres, la inactivación enzimática, la degradación de proteínas, la ruptura de membranas celulares y el daño a la integridad genética (ADN) (Castellón, 2008; Derek Bewley, 1986; Ferguson, TeKrony, & Egli, 1990;

McDonald, 1999; Smith & Berjak, 2017; Walters, 1998). Así, la aplicación de estudios fisiológicos, biofísicos y bioquímicos podría contribuir al desarrollo de biomarcadores a partir de diversas señales de envejecimiento. La selección de un método de extracción lipídica, que conserve el estado de estos compuestos tal como se encuentran en la semilla resulta indispensable para su estudio, ya que estas macromoléculas pueden brindar información sobre el nivel oxidativo de la semilla ayudándonos a comprender el proceso de envejecimiento. El método comúnmente empleado para la extracción y cuantificación lipídica se realiza con calor mediante un equipo Soxhlet, utilizando diversos solventes. Sin embargo, los estudios de deterioro de semillas centran la extracción lipídica en métodos que no utilicen calor para evitar alteraciones en los ácidos grasos, ya que la temperatura podría estar actuando como un catalizador de las reacciones oxidativas. Además de los métodos convencionales que permiten el estudio del estado oxidativo de los lípidos (valor de peróxido, dienos y trienos conjugados, malondialdehído, entre otros), existen otras técnicas, que no requieren del uso de solventes, en las cuales se utiliza escasa cantidad de muestra, muchas veces limitante para llevar a cabo los distintos estudios, como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la

espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). La primera brinda información termodinámica de la muestra, permitiendo analizar la temperatura de fusión de los lípidos, la cual se encuentra relacionada inversamente con el contenido de ácidos grasos insaturados, si bien es destructiva utiliza muy poca cantidad de muestra. La segunda, ha resultado eficaz para la determinación del estado oxidativo de aceites comestibles. Se trata de una técnica analítica simple, que proporciona información sobre los cambios estructurales en las moléculas. Entre las ventajas asociadas a la espectroscopía de reflectancia total atenuada (ATR) FT-IR puede mencionarse, además de las previamente citadas, que permite mediciones sensibles en muy poco tiempo, monitoreando simultáneamente diferentes grupos funcionales en las moléculas (Timilsena, Vongsvivut, Adhikari, & Adhikari, 2017). Por lo previamente expuesto, es muy importante poder determinar el método de extracción más adecuado para el estudio de lípidos en semillas de chía. Así, el objetivo del presente trabajo fue comparar las características fisicoquímicas de aceite de chía obtenido a partir de tres métodos de extracción a fin de ser aplicados en el estudio del deterioro de semillas de chía.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos utilizados

Isopropanol y Sulfato de Sodio (Anedra), Ciclohexano, Hexano, Etanol, Cloroformo, 1-butanol, Ácido Clorhídrico e Hidróxido de Sodio (Cicarelli), Metanol (J-T-Baker), Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA) (Tetrahedron), Tiocianato de Amonio, Cloruro Férrico (Sigma).

2.2. Material vegetal

Se analizaron los aceites extraídos de tres poblaciones de chía, dos de semillas mezcla y uno de semillas blancas. Las semillas mezcla se obtuvieron de fuentes comerciales utilizadas por productores de Salta, Argentina, mientras que las blancas consistieron en una población mejorada por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán, Argentina (EEOC), en proceso de estabilización.

2.2.1. Determinación del contenido de humedad de las semillas

El contenido de humedad se evaluó gravimétricamente, distribuyendo uniformemente 1 g de semillas en cápsulas de aluminio, las cuales fueron secadas en una estufa de vacío (Instrumentación Científica S.A., Buenos Aires, Argentina) a 70 °C y 29 mm Hg durante 24 h. El procedimiento se realizó por duplicado. El porcentaje de humedad en base seca se calculó según la ecuación:

$$H^{\circ}(b.s) = \frac{Ph - Ps}{Ps} * 100$$

donde:

Ph: peso antes del secado (g)

Ps: peso después del secado (g)

2.3. Extracción de lípidos

2.3.1. Acondicionamiento de la muestra previo a la extracción

Inmediatamente previo a cada una de las extracciones, las semillas fueron molidas mediante un molinillo (PE-MC9100, Argentina) durante 30 s, unificándose el tamaño de las partículas a través del pasaje de las mismas por un tamiz de 500 μm (ASTM). Las partículas retenidas en el tamiz fueron molidas nuevamente en mortero e incorporadas a la muestra.

2.3.2. Extracción por métodos fríos

El primer método de extracción se basó en el protocolo de Hara and Radin (1978) con algunas modificaciones (**COHar**). La extracción se llevó a cabo a partir de 5,000 g de semilla molida. Se añadieron 30,00 mL de una mezcla de hexano:isopropanol (3:2), se homogeneizó mediante agitación continua durante 1 h y luego se agregaron 12,00 mL de sulfato de sodio anhidro 6,7% m/v. Se centrifugó la suspensión durante 15 min a 3000 rpm (Rolco, CM2036 Duron, Argentina). La fase superior que contenía el hexano y la materia grasa fue recogida en un balón previamente tarado. El solvente fue removido del aceite utilizando un rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) en baño de 40 °C, bajo vacío (150 ± 50 mmHg). El remanente se eliminó bajo corriente de N_2 .

El segundo método se basó en el protocolo de Biondo et al. (2015) (**COBio**). Se homogeneizaron 5,000 de semilla molida durante 2 min con 25,00 mL de hexano y 50,00 mL de etanol. Posteriormente, se incorporaron 25,00 mL de hexano, y luego, mediante agitación continua durante 2 min, se agregaron 20,00 mL de agua. La suspensión se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm y se recuperó la fase orgánica superior en un balón previamente tarado. Finalmente, el solvente fue eliminado en forma análoga al método anterior.

2.3.3. Extracción por el método de Soxhlet (**COSox**)

Se llevó a cabo utilizando *n*-hexano (punto de ebullición 68 – 72 °C) como solvente, con ciclos térmicos a 80 °C, 6 h, siguiendo el método estándar propuesto por la AOCS (1998). La extracción se realizó a partir de 10,000 g de semilla molida. El solvente fue removido como fue descrito previamente.

2.3.4. Almacenamiento de los aceites

Los aceites se almacenaron en tubos individuales de vidrio color caramelo con tapa a rosca a -18 °C, para su posterior análisis.

2.3.5. Rendimiento de extracción

El rendimiento de cada método de extracción fue determinado gravimétricamente y expresado como porcentaje en peso sobre base seca (%).

b.s.). Todas las extracciones fueron realizadas por duplicado.

2.4. Características fisicoquímicas

2.4.1 Composición de ácidos grasos

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos de los aceites se llevaron a cabo por cromatografía gaseosa (CG). Se pesaron 0,250 g de aceite, se trataron con 0,500 mL de la mezcla HCl:Metanol (calidad HPLC) 5% v/v con una pizca de sulfato de sodio anhidro y se calentó durante 10 min a baño de María 100 °C. Luego se agregaron 0,250 mL de agua miliQ y 0,125 mL de hexano (calidad HPLC) y se centrifugaron 15 min a 3000 rpm. El sobrenadante se recuperó, se filtró (nylon, 25 mm, 22 µm, Micron Separation, Inc. EEUU) y se almacenó en viales hasta determinación por CG. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se analizaron en un equipo 7890 A (Agilent Technologies EEUU) equipado con detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna capilar DB-23 (30 m x 0,250 mm, diámetro interno 250 µm). Las temperaturas del inyector y del detector fueron mantenidas a 250 °C y 280 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial 50 °C durante 1 min, calentamiento hasta 175 °C a 25 °C/min; rampa desde 175 °C hasta 230 °C a 4 °C/min e isoterma a 230 °C durante 15 min. Se utilizó un estándar externo (Supelco 37 component FAME MIX, 100

mg Neat). El perfil de ácidos grasos se determinó a partir de las áreas de los picos utilizando el programa ChemStation (Agilent Technologies (2001- 2010), EEUU).

2.4.2. Índices de saponificación (IS) y de Iodo (II)

Para el cálculo del IS e II se siguió con las normas AOCS Ca 3a-94 y Ca 1c-85, respectivamente (AOCS, 1998).

2.4.3. Ácidos grasos libres

La hidrólisis de los triacilglicerolés da como resultado ácidos grasos libres y glicerol. Los primeros pueden cuantificarse por volumetría ácido base según AOCS (1998). Para ello, se disolvieron 0,500 g de aceite en 10,00 mL de etanol (previamente neutralizado con NaOH). Se valoró con NaOH 0,02N utilizando fenolftaleína como indicador, del punto equivalente. El grado de acidez se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de acidez} = \frac{V * PM * N}{m}$$

donde: *V*: es el volumen de NaOH gastado para la valoración; *PM*: es el peso molecular del ácido graso que se desee expresar; *N*: es la normalidad del NaOH y *m*: es la masa de aceite pesada para la determinación.

2.5. Estudio del estado oxidativo de los aceites

2.5.1. Contenido de hidroperóxidos

Se determinó el valor de peróxido (PV) según el método propuesto por Shantha and Decker (1994). Para ello, 0,150 g de

aceite fueron homogeneizados con 9,80 mL de cloroformo:metanol (7:3) en vórtex durante 2 s; luego se añadieron 50 μ L de una solución de NH_4SCN 3,9 M, agitando mediante vórtex por 2 s. Finalmente, se agregaron 50 μ L de solución Fe^{+2} homogeneizando 2 s. Luego de 5 min de incubación en oscuridad, se leyó la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro (Shimadzu, UV-mini 1240, Japón). Para la curva de calibración, se disolvieron 0,5 g de hierro en 50,00 mL de una solución de HCl 10N y 1-2 mL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Se llevó a baño de María 100 °C durante 5 min a fin de eliminar el exceso de peróxido. La solución se dejó enfriar y se llevó a 500,00 mL con agua destilada. Una alícuota de 1,00 mL se diluyó con cloroformo:metanol (7:3) a 100,00 mL. Para realizar la curva de calibración se analizaron soluciones estándar de Fe^{+3} conteniendo entre 1-40 μ g de Fe^{+3} . El valor de peróxido expresado en meq. de peróxido por kg de muestra se calculó según la ecuación:

$$\text{Valor de peróxido} = \frac{(A_s - A_b) * m}{55,84 * m_0 * 2}$$

donde: A_s , absorbancia de la muestra; A_b , absorbancia del blanco; m , pendiente de la curva de calibración; m_0 , masa de aceite en gramos y 55,84 g es el peso atómico del Fe.

2.5.2. Coeficientes de extinción específica: dienos (k_{232}) y trienos (k_{270}) conjugados

Para la determinación de dienos conjugados, se pesaron \approx 0,100 g de aceite y se colocaron en matraz aforado de 10,00 mL, completando a volumen final con ciclohexano calidad espectrofotométrica. La solución resultante se homogeneizó y se midió la absorbancia a 232 nm en cubetas de cuarzo con tapa, utilizando el disolvente puro como referencia. En el caso del análisis de trienos conjugados, se tomó una alícuota de 1,00 mL de la solución preparada para la determinación de dienos conjugados, y se llevó a volumen final de 2,50 mL con ciclohexano. La solución resultante se homogeneizó y se midió la absorbancia a 270 nm. Los coeficientes de extinción k_{232} y k_{270} se calcularon según la siguiente ecuación:

$$K\lambda = \frac{A\lambda}{b * c}$$

donde: K , coeficiente de extinción específica a la longitud de onda correspondiente; A , absorbancia leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda correspondiente; c , concentración de aceite en % m/v y b , el espesor de la cubeta.

2.5.3. Malondialdehído

Se determinó a través del valor de TBA, el cual se define como el incremento en la absorbancia medida a 530 nm en la reacción del equivalente a 1 mg de

muestra en 1,00 mL del ácido 2-tiobarbitúrico (AOCS, 1998). Se pesaron aproximadamente 0,5 mg de aceite llevando a un volumen final de 25,00 mL con 1-butanol. Luego, se tomó 5,00 mL del matraz más 5,00 mL de la solución de TBA, incubando a baño de maría 95 °C durante 2 h. Se leyó la absorbancia a 530 nm en espectrofotómetro (Shimadzu, UV-mini 1240, Japan). El valor de TBA se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Valor de TBA} = \frac{50 * (A - B)}{m}$$

donde: *A*: es la absorbancia de la solución, *B*: es la absorbancia del blanco y *m*: es la masa pesada en mg para la determinación.

2.5.4. Valor total de oxidación (TOTOX)

Para calcular el valor total de oxidación se utilizó la siguiente Ecuación:

$$TOTOX = 2 * PV + TBA$$

donde: *PV* es el valor de peróxido determinado en 2.5.1 y *TBA* el valor de malondialdehído analizado según 2.5.3.

2.6. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para el estudio calorimétrico se prepararon crisoles herméticos con aproximadamente 10 mg de aceite. Las muestras fueron llevadas al equipo TA-2500 (TA Instruments, New Castle, DE, EE. UU.). Los barridos empezaron a temperatura ambiente (25 °C) y se enfrió hasta -100 °C, seguido de un equilibrio de 5 min, y de un calentamiento hasta 25 °C, a una velocidad de 10 °C/min. Los

termogramas se registraron durante el calentamiento con dos repeticiones por tratamiento. Los termogramas obtenidos fueron analizados con el programa TA Universal analysis (TA Instruments, New Castle, DE, EEUU). Se evaluaron los siguientes eventos: temperatura de inicio de pico (*T_i*), temperatura de pico (*T_p*) y entalpía de fusión (ΔH).

2.7. Análisis mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

El estudio espectral se realizó con un equipo Nicolet™ iSTM10 (Thermo Scientific, Madison, EEUU). Los espectros se obtuvieron como un promedio de 36 escaneos sucesivos en el rango de longitud de onda de 4000-400 cm^{-1} en el modo absorbancia. Para el análisis se colocó una gota de aceite, sobre el cristal de diamante ATR y se realizó el análisis espectral mediante el programa Omnic versión 9 (Thermo Scientific, Madison, EE. UU.). Se escanearon 5 gotas por muestra para cada réplica. Los espectros obtenidos fueron normalizados en escala de 0-1 y se corrigió la línea de base. Luego, fueron sometidos a un Análisis de Componentes Principales (PCA), realizado con la aplicación PCA para espectros del programa OriginPro (OriginLab, Northampton, MA, EEUU). La zona analizada para el análisis de componentes principales fue la

comprendida entre 3100 a 2700 cm^{-1} y la de 1900 a 500 cm^{-1} .

2.8. Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados siguiendo un diseño monofactorial en bloques completos aleatorizados (BCA), donde las distintas poblaciones fueron el criterio de bloqueo. En aquellos casos en los cuales se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos métodos de extracción ($p \leq 0,05$), se utilizó a posteriori un test de comparaciones múltiples (test de Tukey, $\alpha = 0,05$). Los datos fueron procesados utilizando el programa InfoStat Versión 2020, Argentina (Di Rienzo et al., 2011). El análisis de PCA de los espectros de FT-IR fue realizado sobre la matriz de covarianza de los datos, donde las intensidades a cada longitud de onda de los espectros fueron consideradas como variables originales, y cada tipo de muestra representó una columna de la matriz original. El agrupamiento para el análisis de PCA se realizó según el método de extracción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del material vegetal

El contenido de humedad inicial de las muestras fue de 4,61-5,31% (b.s.) para las poblaciones evaluadas. En este sentido Chai, Ma, Li, and Du (1998), han encontrado la máxima germinación en semillas de lino, soja, trigo y sésamo

almacenadas a temperatura ambiente con un contenido de agua entre 2 y 10%, dependiendo el nivel exacto de la especie y del cultivar, con lo cual el nivel de humedad encontrado sería adecuado para el almacenamiento.

3.2. Rendimiento de extracción lipídica

En la **Tabla 1** se muestran los resultados obtenidos para el rendimiento de la extracción.

Los métodos más eficientes fueron el de Hara and Radin (1978) con 33,26% (b.s.) y Soxhlet con 32,43% (b.s.), entre los cuales no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$), seguido por el método de Biondo et al. (2015), en el cual se registró un valor significativamente menor (30,68%, b.s.). Los resultados obtenidos mediante Soxhlet, método de referencia para determinar rendimiento según la AOCS, fueron similares a los informados por (Ixtaina et al., 2011; Timilsena et al., 2017) para semillas de chía. Las diferencias encontradas entre los dos métodos en frío pueden relacionarse principalmente con el tiempo de contacto entre el solvente y la semilla molida bajo agitación (1h15 min para Hara and Radin (1978) y 21 min en el caso de Biondo et al. (2015)). En ambos, el proceso de extracción se realiza mediante inmersión, en el cual la semilla molida se encuentra completamente sumergida en el solvente. La agitación permite que la micela (aceite+solvente) concentrada, sea

reemplazada por solvente fresco. En las células, hay una zona en la cual la extracción de lípidos ocurrirá en forma rápida y con muy poco tiempo de contacto entre el solvente y el material a extraer. Sin embargo, hay otra parte del aceite que tendrá que recorrer una mayor distancia para alcanzar la pared celular y poder ser arrastrada por el solvente hasta la corriente de la micela. Es por ello que el tiempo de contacto durante esta operación de extracción (transferencia de masa) es importante y puede explicar el mayor rendimiento obtenido por el método de Hara and Radin (1978) (Bockisch, 2015; Ixtaina, Nolasco, & Tomás, 2010).

3.3. Composición de ácidos grasos

Los resultados obtenidos para la composición de ácidos grasos se muestran en la **Tabla 1**. El contenido de

ácidos grasos saturados varió en un rango de 12,06-12,30%, no encontrándose diferencias significativas entre los aceites estudiados ($p > 0,05$). Sin embargo, se detectó un menor contenido de ácido oleico y linoleico para **COBio** en relación a **COSox** y **COHar** ($p \leq 0,05$). Con respecto al ácido α -linolénico, los aceites **COBio** y **COHar** presentaron un contenido significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que **COSox**. Al Juhaimi, Özcan, Ghafoor, Babiker, and Hussain (2018) informaron diferencias en la composición de ácidos grasos en aceites de almendra, nuez, nuez pecan, maní, avellana y pistacho según el método de extracción usado, siendo mayor el ácido graso linoleico en métodos fríos que en Soxhlet.

Tabla 1. Rendimiento, composición acídica e índices de genuinidad y calidad de aceites de chía obtenidos por métodos de extracción en frío (**COBio** y **COHar**) y por Soxhlet (**COSox**)

Variable	Método			Error estándar
	COSox	COBio	COHar	
Materia grasa (% b.s)	32,43 ^B	30,68 ^A	33,26 ^B	0,37
Ácidos grasos %				
Palmítico	9,38 ^A	9,27 ^A	9,15 ^A	0,13
Estearico	2,84 ^A	3,03 ^A	2,91 ^A	0,11
Oleico	5,67 ^B	5,90 ^A	5,49 ^B	0,09
Linoleico	20,19 ^B	19,50 ^A	19,92 ^B	0,10
α -linolénico	61,90 ^A	63,06 ^B	62,54 ^B	0,16
Sumatorias AG				
Σ SFA	12,22 ^A	12,30 ^A	12,06 ^A	0,18
Σ PUFA	82,10 ^A	82,55 ^A	82,46 ^A	0,23
Relaciones AG				
Σ PUFA/ Σ SFA	6,73 ^A	6,71 ^A	6,86 ^A	0,12
ω -3: ω -6	3,07 ^A	3,24 ^C	3,14 ^B	0,01
Índice de Iodo	201,78 ^A	203,10 ^A	202,80 ^A	0,47

Índice de Saponificación	193,56 ^A	193,63 ^A	193,50 ^A	0,06
Acidez libre (% ac. oleico)	1,02 ^B	0,82 ^A	1,02 ^B	0,05
Valor de peróxido (meq. de O ₂ .kg aceite)	0,49 ^A	1,62 ^B	2,22 ^B	0,26
K ₂₃₂	0,65 ^A	0,68 ^A	0,71 ^A	0,02
K ₂₇₀	0,99 ^A	1,13 ^A	1,08 ^A	0,04
TBA	0,68 ^A	0,71 ^A	0,71 ^A	0,03
TOTOX	1,65 ^A	3,95 ^B	5,14 ^B	0,53

Las valores presentados corresponden a las medias del diseño BCA (n=3). Se indica el error estándar (raíz del cuadrado medio del error). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test de Tukey.

Estas diferencias podrían estar relacionadas con la solubilidad de los ácidos grasos en los distintos solventes de extracción o a una posible degradación oxidativa de ciertos ácidos grasos poliinsaturados debido al uso de elevadas temperaturas, en el caso de Soxhlet (Stewart & Bewley, 1980). Así, los resultados obtenidos sugieren que los métodos en frío serían más apropiados para la extracción de aceite de chía, debido a que los aceites así obtenidos presentan una mayor concentración de ácido α -linolénico, principal ácido graso en este aceite vegetal y particularmente susceptible a la oxidación durante el proceso de envejecimiento de las semillas de chía. Por otra parte, la relación ω -3: ω -6 presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$), siendo **COSox** < **COHar** < **COBio** (Tabla 1).

3.4. IS e II

Los resultados obtenidos para el índice de saponificación variaron entre 174,92 y 193,65 ($p > 0,05$), valores similares a los encontrados por Fernandes et al. (2019); Ixtaina et al. (2011); Timilsena et al. (2017). Por otro lado, el índice de Iodo tampoco mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) para los aceites estudiados encontrándose los valores en el rango de 201,78 y 203,10 (Tabla 1). Estos valores de índices de genuinidad, indicarían que ninguno de los métodos estudiados

parece alterar la naturaleza de los aceites de chía.

3.5. Ácidos grasos libres

Los resultados obtenidos fueron de 1,02% de ácido oleico para ambos aceites, **COSox** y **COHar**, mientras que para **COBio** el porcentaje de acidez fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) (Tabla 1). Dichos valores fueron similares a los encontrados por Timilsena et al. (2017), Ixtaina, Nolasco, and Tomás (2012) y Fernandes et al. (2019). Así, los aceites obtenidos mediante los métodos de Soxhlet y Hara and Radin (1978) se asocian a un mayor deterioro por hidrólisis de los triacilgliceroles presentes en el aceite de chía.

3.6. Evaluación del estado oxidativo

3.6.1 Valor de peróxido (PV)

El PV identifica la oxidación de grasas ya que los hidroperóxidos son los primeros compuestos que se forman cuando los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan. En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos para este parámetro, siendo el PV de **COSox** significativamente menor ($p \leq 0,05$) que el correspondiente a los métodos en frío. El menor PV fue encontrado en **COSox** respecto a **COBio** y **COHar** con valores de 0,49 1,62 y 2,22 meq O_2 kg^{-1} de aceite, respectivamente ($p \leq 0,05$). El menor valor encontrado para **COSox** podría estar relacionado con el hecho que la extracción se llevó a cabo con un único disolvente apolar (hexano),

lo que podría disminuir la recuperación de ciertos compuestos polares de interés analítico, como los peróxidos o algunos componentes aldehídicos o cetónicos (Navas Sánchez, 2005). En este sentido, la extracción mediante el método de Soxhlet utilizando hexano no sería apropiada para estudiar los mecanismos de envejecimiento relacionados con el deterioro de los lípidos, ya que se estarían subestimando los productos primarios de oxidación. Por otra parte, cabe destacar que todos los valores fueron bajos, similares a los obtenidos por Ixtaina et al. (2012) pero aproximadamente 50% menores a los informados por Timilsena et al. (2017) para aceite de chía.

3.6.2 Dienos y trienos conjugados

Los resultados de los coeficientes k_{232} y k_{270} se muestran en la **Tabla 1**. El k_{232} no presentó diferencias significativas entre muestras ($p > 0,05$), siendo los valores obtenidos de 0,65 0,68 y 0,71 mL/g.cm para **COSox**, **COBio** y **COHar** respectivamente. Al igual que PV, los valores obtenidos fueron menores a los informados por Fernandes et al. (2019); Timilsena et al. (2017) en aceites de chía. El k_{270} tampoco mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) con valores de 0,99 1,08 y 1,13 mL/g.cm para **COSox** **COHar** y **COBio**, respectivamente. Contrariamente a k_{232} , el k_{270} presentó valores más altos a los de Timilsena et al. (2017) y Fernandes et al. (2019)

3.6.3 Malondialdehido (MDA)

El valor de TBA está relacionado con los compuestos secundarios de oxidación. Los valores para los distintos aceites estuvieron comprendidos entre 0,68 y 0,72 (**Tabla 1**), no habiéndose encontrado diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los mismos. El MDA es un compuesto hidrosoluble que durante la imbibición es capaz de atravesar las membranas celulares que se encuentren deterioradas. Stewart and Bewley (1980) detectaron bajos valores de MDA en semillas almacenadas bajo condiciones de humedad reducida, con cierto grado de envejecimiento, sugiriendo la necesidad de realizar un pretratamiento de imbibición a fin de lograr un análisis más preciso sobre los compuestos secundarios de oxidación.

3.6.4 Valor TOTOX

Este valor se relaciona con el estado total de oxidación de los aceites. El valor TOTOX fue significativamente menor para **COSox** ($p \leq 0,05$), lo que se relaciona con el mayor PV detectado para **COHar** y **COBio**, ya que los valores de TBA fueron similares para los aceites extraídos por los diversos métodos ver **Tabla 1**.

3.7 Calorimetría diferencial de barrido

Los resultados de los parámetros termodinámicos se muestran en la **Tabla 2** y los termogramas en la **Figura 1**. Para la temperatura de inicio de pico de fusión (T_i) el rango de valores obtenidos fue

entre $-50,11$ y $-49,20$ °C, mientras que para la temperatura de pico (T_p) el mismo varió entre $-40,52$ y $-39,61$ °C, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). Por otro lado, la entalpía de fusión (ΔH) de **COBio**

fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) que la correspondiente a **COHar**, coincidiendo con la tendencia encontrada en la composición de AG determinada por CG.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos en aceites de chía (*Salvia hispánica* L.) obtenidos por diferentes métodos de extracción.

Método	Ti	Tp	ΔH
COBio	$-49,21^A \pm 1,00$	$-39,59^A \pm 0,73$	$54,32^A \pm 3,05$
COHar	$-49,44^A \pm 0,48$	$-40,52^A \pm 1,07$	$58,56^B \pm 3,01$
COSox	$-50,11^A \pm 0,99$	$-40,51^A \pm 0,72$	$56,44^{AB} \pm 1,18$

Ti: temperatura de inicio de fusión (°C), Tp: temperatura de pico de fusión (°C) y ΔH : entalpía de fusión (J/g). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

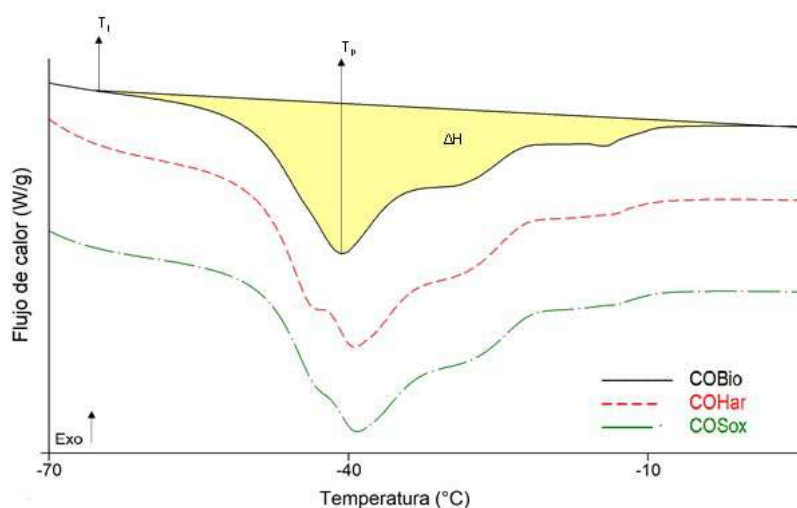


Figura 1. Termogramas representativos para aceites de chía obtenidos por diferentes métodos de extracción. Ti: temperatura de inicio de fusión (°C), Tp: temperatura de pico de fusión (°C) y ΔH : entalpía de fusión (J/g)

3.8 Análisis quimiométrico y de PCA de espectros obtenidos mediante FT-IR (ATR)

Los espectros FT-IR representativos de los aceites de chía obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción evaluados se presentan en la **Figura 2**.

En todos los casos, los espectros de FT-IR mostraron rasgos moleculares característicos comunes de los aceites. La

asignación de picos utilizada en este trabajo se basa en estudios de FT-IR anteriores sobre aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados (Cakmak-Arslan, 2022; Cebi, Yilmaz, & Sagdic, 2017; Guillén & Cabo, 1998; Timilsena et al., 2017; Vongsivut, Miller, McNaughton, Heraud, & Barrow, 2014). Con el objetivo de estimar el grado de insaturación de las muestras de aceite obtenido por los

distintos métodos, se calcularon las siguientes áreas (con los espectros normalizados y en unidades de absorbancia): $A(3009\text{ cm}^{-1})$, $A(2851\text{ cm}^{-1})$, $A(1746\text{ cm}^{-1})$ y $A(720\text{ cm}^{-1})$ y las relaciones de áreas $A(3009\text{ cm}^{-1})/2924\text{ cm}^{-1}$, $A(3009\text{ cm}^{-1})/A(2854\text{ cm}^{-1})$, $A(3009\text{ cm}^{-1})/A(1744\text{ cm}^{-1})$, $A(3009\text{ cm}^{-1})/A(1168\text{ cm}^{-1})$, $A(3009\text{ cm}^{-1})/A(1099\text{ cm}^{-1})$, $A(2854\text{ cm}^{-1})/A(720\text{ cm}^{-1})$, $A(2854\text{ cm}^{-1})/A(1099\text{ cm}^{-1})$ (El-Bahy, 2005; Guillén & Cabo, 1998) (**Tabla 3**).

3.8.1 Asignación de picos encontrados, áreas calculadas y sus respectivas relaciones.

Cabe señalar que los espectros de FT-IR de los aceites estudiados en este trabajo no mostraron una banda de estiramiento de OH a $\sim 3470\text{ cm}^{-1}$, lo que indica la ausencia de humedad en los aceites. Esto confirma una correcta separación de las fases orgánica y acuosa en los métodos fríos. Se asignaron once picos en total. Los espectros en la región de alto número de onda presentaron un triplete de fuertes bandas en el rango de $3009\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, asignados al estiramiento de CH de los esqueletos de metilo y metileno de los lípidos (**Figura 2**). En particular, el pico distintivo en $\sim 3009\text{ cm}^{-1}$, fue atribuido al estiramiento C-H de cis-olefínicos -HC=CH- y es usado comúnmente para determinar el grado de insaturación en lípidos y aceites. Por lo tanto, se utilizó específicamente para representar ácidos

grasos insaturados. Para los aceites que contienen un mayor número de enlaces cis-olefínicos -HC=CH- (es decir, mayor grado de insaturación), este pico suele encontrarse en un número de onda mayor. Según el perfil de ácidos grasos obtenido por la técnica de CG (**Tabla 1**), el alto grado de insaturación observado en los aceites de chía obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción se debe a una proporción significativamente alta ($\sim 62\%$) de ácido α -linolénico (C18:3), que contiene 3 dobles enlaces C=C en su estructura. Con respecto al efecto del método de extracción, el área del pico a 3009 cm^{-1} presentó valores significativamente mayores ($p \leq 0,05$) para los métodos de Biondo y Soxhlet con respecto a Hara (0,13, 0,13 y 0,10, respectivamente). El área del pico a 2851 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento asimétrico del grupo metilo, presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los aceites analizados siendo para **COHar** menor que para **COSox** y **COBio** con valores de 0,24, 0,29 y 0,30 respectivamente. Los espectros de aceite de chía en la región de número de onda bajo consistieron en un pico prominente a 1744 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo carbonilo C=O de los grupos funcionales éster de lípidos y ácidos grasos. Este pico proporciona una medida de los lípidos totales en los aceites analizados; su integral presentó diferencias significativas

($p \leq 0,05$) siendo **COBio** y **COSox** mayores que **COHar** con valores de 0,90, 0,90 y 0,86 respectivamente. Las bandas superpuestas en el rango de 1461-1374 cm^{-1} se atribuyeron a la combinación de modos de deformación de los grupos metilo y metileno. Otros picos fuertes presentes a 1161 y 1099 cm^{-1} fueron atribuidos a la presencia de diacil glicerol ésteres en los aceites. Específicamente, la banda en 1161 cm^{-1} representa el estiramiento asimétrico combinado de los enlaces (C-C(=O)-O) y (OC-C), mientras que la banda en 1099 cm^{-1} (**Figura 2**) se asocia con el estiramiento simétrico (C-O-C) de triacilglicerol y ésteres de colesterol. La banda más intensa en el extremo inferior de los espectros, centrada en 720 cm^{-1} se atribuyó a la combinación de la vibración oscilante y la deformación fuera del plano del metileno en olefinas disustituidas en *cis*. A diferencia de las áreas del pico 3009 cm^{-1} y 1744 cm^{-1} para el aceite obtenido por el método de Hara el área del pico 720 cm^{-1} fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) con respecto a Biondo y Soxhlet con valores 0,36, 0,33 y 0,33, respectivamente.

En la **Tabla 3** se muestran las distintas relaciones de áreas calculadas a partir de los datos de FT-IR. En seis de las siete relaciones estudiadas se encontraron valores significativamente menores para **COHar** ($p \leq 0,05$) en relación a **COSox** y **COBio**, quienes no presentaron

diferencias entre ellos ($p > 0,05$) (**Tabla 3**), en concordancia con los resultados obtenidos por DSC (**Tabla 2**), donde **COBio** tiene mayor entalpía de fusión atribuida a la mayor proporción de α -linolénico.

3.8.2 PCA para los diferentes métodos de extracción.

En la **Figura 3**, se muestran los resultados obtenidos para el análisis de componentes principales y sus respectivos "loadings", para los tres métodos de extracción evaluados.

Los resultados de PCA se obtuvieron utilizando la entrada espectral de absorbancia en los rangos de 3100 a 2700 cm^{-1} y de 1900 a 500 cm^{-1} , como se mencionó anteriormente, cubriendo los rasgos espectrales característicos de los lípidos. La tabla de valores propios "eigenvalues" mostró que dos componentes principales explicaron el 92,8% de la varianza total, y los restantes componentes contribuyeron cada uno con <4%, por lo que en la **Figura 3-A**, se presenta un gráfico de dos dimensiones (PC1 vs. PC2).

Las muestras de **COSox** se separaron de los aceites extraídos con métodos fríos, dispersándose a lo largo del eje **PC2**.

En cambio, las muestras **COBio** y **COHar** presentaron un comportamiento dual; algunas se superpusieron con **COSox** a lo largo del eje del **PC2**, y otras, la mayoría, cruzan juntas a lo largo del eje del **PC1**

por los cuadrantes negativos. El gráfico de cargas "loading" para **PC1 (Figura 3-B.)** (valores del vector de carga trazados contra los números de longitud de onda analizados) muestra que la alineación a lo largo del eje horizontal (80,6%) se correlacionó positivamente con los picos en 3010, 2923, 2851 cm^{-1} , también con el pico a 1741 y con los picos de 1660, 1235 y 1161 cm^{-1} , esto significa que la máxima varianza se encuentra en dichas longitudes de onda. Por otra parte, el PC2 (12,2%) se correlacionó positivamente solo con los picos en 3010, 2923 y 2851 cm^{-1} , contribuyendo a lo descrito en el PC1 (**Figura 3-C.**).

4. CONCLUSIONES

En general, los resultados obtenidos muestran concordancia entre los

resultados obtenidos por las distintas metodologías. A través de la evaluación de las diversas características fisicoquímicas de los aceites obtenidos, los métodos en frío serían más apropiados para llevar a cabo la extracción de lípidos durante el estudio de los procesos asociados al deterioro de semillas durante su almacenamiento. Si bien mediante el método de Hara and Radin (1978), se obtiene un mayor rendimiento de extracción, el aceite obtenido por Biondo et al. (2015) presentó, en general, una mejor calidad, al detectarse menor contenido de ácidos grasos libres, mayor contenido de α -linolénico y menor entalpía de fusión.

5. FINANCIAMIENTO

Proyectos UNLP X-901 y PICT 2018-02352.

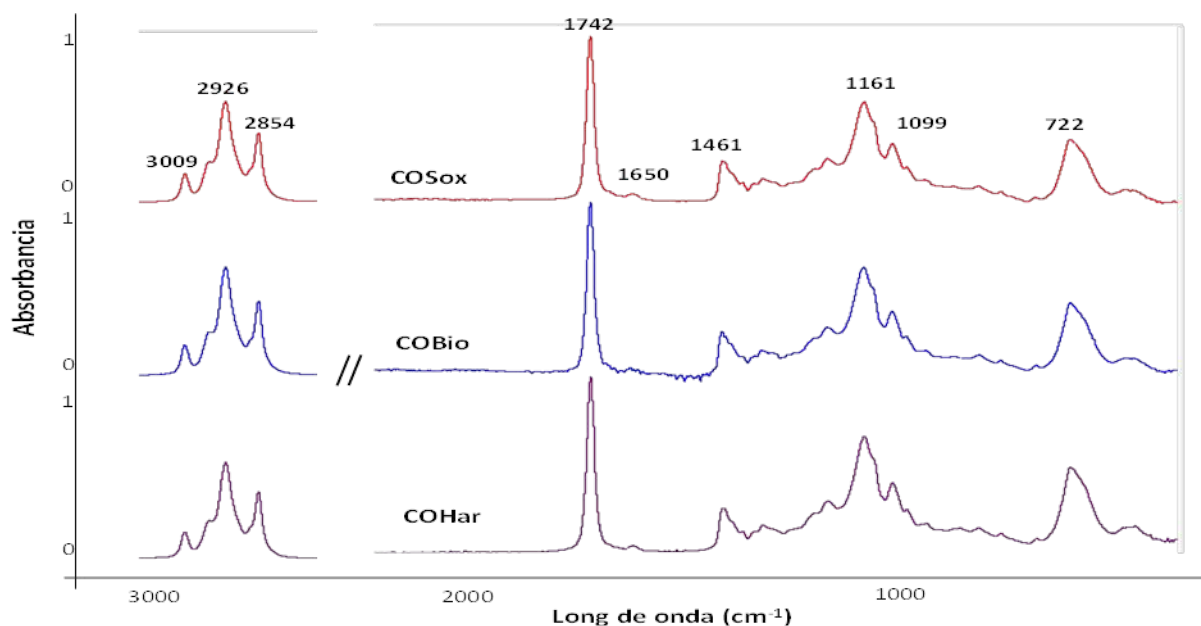


Figura 2. Espectros representativos de FT-IR de los aceites de chíá obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción evaluados COSox, COBio y COHar.

Tabla 3. Relaciones de áreas calculadas a partir del análisis de los espectros de aceites de chía (*Salvia hispánica* L.) obtenidos mediante métodos de extracción en frío (**COBio** y **COHar**) y por Soxhlet (**COSox**).

	COBio	COSox	COHar
3009/1099	1,19 ^B ± 0,04	1,21 ^B ± 0,04	0,93 ^A ± 0,05
3009/1168	0,37 ^B ± 0,03	0,37 ^B ± 0,01	0,30 ^A ± 0,01
3009/1742	0,14 ^B ± 0,01	0,14 ^B ± 0,00	0,12 ^A ± 0,00
3009/2854	0,43 ^A ± 0,01	0,43 ^A ± 0,00	0,43 ^A ± 0,04
3009/2924	0,33 ^B ± 0,01	0,33 ^B ± 0,01	0,31 ^A ± 0,01
2854/720	0,88 ^B ± 0,01	0,89 ^B ± 0,02	0,67 ^A ± 0,04
2854/1099	2,80 ^B ± 0,06	2,80 ^B ± 0,07	2,18 ^A ± 0,13

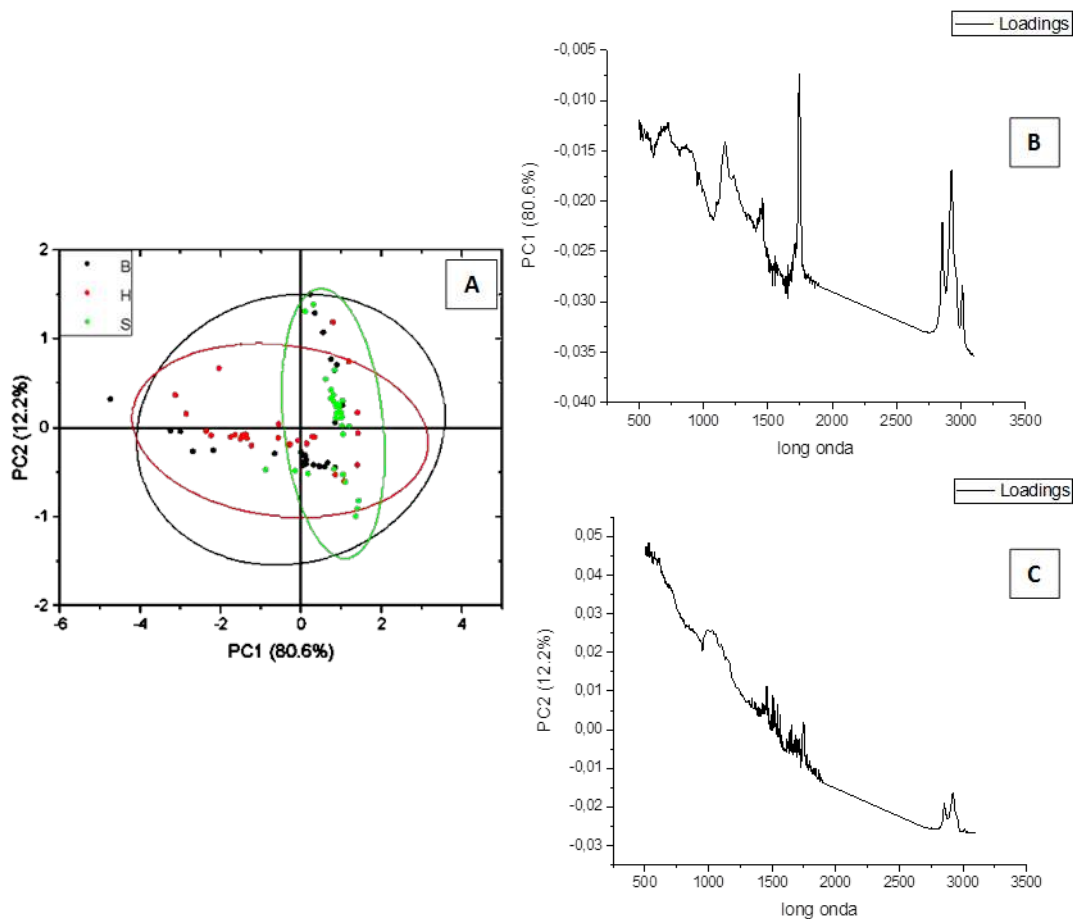


Figura 3. A: Análisis de las componentes principales. B: "loadings" PC1 y C: "loadings" PC2. Calculados para los aceites de chía obtenidos a partir de tres métodos de extracción COSox, COBio y COHar.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Al Juhaimi, F., Özcan, M. M., Ghafoor, K., Babiker, E. E., & Hussain, S. (2018). Comparison of cold-pressing and soxhlet extraction systems for bioactive compounds, antioxidant properties, polyphenols, fatty acids and tocopherols in eight nut oils. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3163-3173.
- AOCS. (1998). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS* (A. Press Ed.). Champaign.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). *Chia: rediscovering a forgotten crop of the Aztecs*: University of Arizona Press.
- Biondo, P. B., dos Santos, V. J., Montanher, P. F., de OS Junior, O., Matsushita, M., Almeida, V. C., & Visentainer, J. V. (2015). A new method for lipid extraction using low-toxicity solvents developed for canola (*Brassica napus* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merrill) seeds. *Analytical Methods*, 7(23), 9773-9778.
- Bockisch, M. (2015). *Fats and oils handbook (Nahrungsfette und Öle)*: Elsevier.
- Cakmak-Arslan, G. (2022). Monitoring of Hazelnut oil quality during thermal processing in comparison with extra virgin olive oil by using ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 266, 120461.
- Castellión, M. L. (2008). *Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación involucrados en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd.* Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
- Cebi, N., Yilmaz, M. T., & Sagdic, O. (2017). A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. *Food Chemistry*, 229, 517-526.
- Chai, J., Ma, R., Li, L., & Du, Y. (1998). Optimum moisture contents of seeds stored at ambient temperatures-Chai, J., Ma, R., Li, L. & Du, Y.
- Cruz-Tirado, J., Oliveira, M., de Jesus Filho, M., Godoy, H. T., Amigo, J. M., & Barbin, D. F. (2021). Shelf life estimation and kinetic degradation modeling of chia seeds (*Salvia hispanica*) using principal component analysis based on NIR-hyperspectral imaging. *Food Control*, 123, 107777.
- Derek Bewley, J. (1986). Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. *Physiology of seed deterioration*, 11, 27-45.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2011). Infostat: programa de cómputo. Versión 24-03-2011. In: Universidad Nacional de Córdoba Córdoba, Argentina.
- El-Bahy, G. (2005). FTIR and Raman spectroscopic study of Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) seeds. *Journal of Applied Spectroscopy*, 72(1), 111-116.
- Ferguson, J., TeKrony, D., & Egli, D. (1990). Changes during early soybean seed and axes deterioration: I. Seed quality and mitochondrial respiration. *Crop Science*, 30(1), 175-179.
- Fernandes, S. S., Tonato, D., Mazutti, M. A., de Abreu, B. R., da Costa Cabrera, D., D'Oca, C. D. R. M., . . . de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). Yield and quality of chia oil extracted via different methods. *Journal of Food Engineering*, 262, 200-208.

- Guillén, M. D., & Cabo, N. (1998). Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier transform infrared spectra. Role of some bands of the fingerprint region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1788-1793.
- Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical biochemistry*, 90(1), 420-426.
- Hildebrand, D., Jamboonsri, W., & Phillips, T. (2013). Early flowering mutant chia and uses thereof. In: Google Patents.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., . . . Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166-174.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006>
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2010). Characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) white and dark seeds and oils. In M. C. Tomás (Ed.), *Advances in Fats and Oils Research* (pp. 135-147). India Research Singpost.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077-1090.
- McDonald, M. (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and technology*, 27(1), 177-237.
- Moreira, R., Chenlo, F., Prieto, D. M., & Torres, M. D. (2012). Water adsorption isotherms of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 1077-1082.
- Navas Sánchez, J. A. (2005). *Optimización y control de la calidad y estabilidad de aceites y productos de fritura*: Universitat de Barcelona.
- Orona-Tamayo, D., Valverde, M., & Paredes-Lopez, O. (2017). Chia—The new golden seed for the 21st century: Nutraceutical properties and technological uses. In *Sustainable protein sources* (pp. 265-281): Elsevier.
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Smith, M. T., & Berjak, P. (2017). Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In *Seed development and germination* (pp. 701-746): Routledge.
- Stewart, R. R., & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65(2), 245-248.
- Timilsena, Y. P., Vongsvivut, J., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2017). Physicochemical and thermal characteristics of Australian chia seed oil. *Food Chemistry*, 228, 394-402.
- Vongsvivut, J., Miller, M. R., McNaughton, D., Heraud, P., & Barrow, C. J. (2014). Rapid discrimination and determination of polyunsaturated fatty acid composition in marine oils by FTIR spectroscopy and multivariate data analysis. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8), 2410-2422.
- Walters, C. (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research*, 8(2), 223-244.
- Walters, C., & Pence, V. C. (2021). The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. *Plants, People, Planet*, 3(1), 83-91.

Análisis de discriminabilidad multiestado en sistemas ICC basado en respuestas
SSVEP evocadas por fuentes luminosas parpadeantes de frecuencia única



“Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



C.24. Ciencias e ingeniería de materiales

Análisis de discriminabilidad multiestado en sistemas ICC basado en respuestas SSVEP evocadas por fuentes luminosas parpadeantes de frecuencia única

Autor: Padilla, Gerardo Luis¹; gerardoluispadilla96@gmail.com

Profesor Tutor: Farfán, Fernando Daniel; ffarfan@herrera.unt.edu.ar

Universidad Nacional de Tucumán (UNT)

Resumen

Las interfaces cerebro-computadora (ICCs) basadas en potenciales evocados visuales de estado estacionario (SSVEPs) generalmente utilizan estímulos parpadeantes con diferentes frecuencias para generar múltiples comandos de control. En los últimos años, la implementación de este paradigma ha aumentado su popularidad, debido principalmente a sus altas tasas de transferencia de información (ITR), bajo nivel de capacitación requerido, fácil implementación y baja dependencia de sus respuestas con los diferentes estados emocionales del usuario. Una variante interesante de este paradigma es la obtención de múltiples estados tras el empleo de una fuente parpadeante de frecuencia única, la cual es posible, utilizando técnicas de mapeo electroencefalográfico. Así estos sistemas son capaces de detectar la dirección de la mirada respecto de la fuente parpadeante. Este trabajo propone determinar de manera objetiva el grado de discriminabilidad existente entre los diversos estados con el fin de identificar cuáles podrían ser más fácilmente diferenciables e implementados con una menor cantidad de electrodos de registro.

Palabras clave: Interfaz Cerebro-Computadora, SSVEP, Frecuencia única

¹ Estudiante de doctorado en Ciencias Exactas e Ingeniería de la Universidad Nacional de Tucumán, becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).



Introducción

Una Interfaz Cerebro Computadora (ICC) es un sistema de comunicación que permite transmitir la intención del usuario hacia el mundo exterior sin utilizar canales normales de comunicación como los nervios y músculos. Siendo de enorme utilidad para aquellas personas que poseen habilidades motoras nulas o reducidas, ya que permiten convertir la actividad del cerebro en señales de control para dispositivos externos como: deletreadores, neuroprótesis, sistemas domóticos, sillas de ruedas, entre otros [1]. Existen muchos paradigmas bajo los cuales se puede implementar una ICC, entre los más conocidos se pueden mencionar, aquellos basados en: potencial relacionado a eventos P300 (ERP), potenciales corticales lentos (SCP), ritmos sensoriomotores (SMR) y los potenciales evocados visuales de estado estacionario (SSVEP), siendo este último el paradigma más explorado en estos últimos años con relación al resto. Entre las ventajas más destacables de usar SSVEP frente a otras técnicas están su alta tasa de transferencia de información o ITR (de hasta 70 bits/min), bajo requerimiento de capacitación por parte del usuario, baja complejidad de equipos para su implementación y poca dependencia del estado cognitivo del sujeto [2]. Las BCIs

basadas en SSVEP permiten a los usuarios comunicarse con el mundo exterior prestando atención selectivamente a un determinado estímulo visual repetitivo. Este estímulo puede ser presentado de diferentes formas (destellos luminosos con LEDs, gráficos simples, inversión de patrones, etc.) y el estímulo en sí mismo puede tener diferentes características como ser su frecuencia de estimulación, fase, longitud de onda (color), intensidad del estímulo, entre otros. Diversos estudios han experimentado con la variación de estos parámetros para determinar su influencia en la calidad del resultado obtenido. Pruebas como la influencia de la fase del estímulo en la zona de altas frecuencias (40-60 Hz) para disminuir la molestia del usuario ante el parpadeo [3], o la influencia del color del estímulo con el que se obtendrá la mayor ITR y al mismo tiempo resulte el más cómodo y seguro para el sujeto [4], son ejemplos de cómo han ido evolucionando las ICC basadas en SSVEP con el paso del tiempo para la obtención de implementaciones y resultados cada vez más prometedores. Cuando se busca, a través de estas técnicas, obtener más de una respuesta o estado en la salida del sistema, por ejemplo, para determinar el movimiento de un cursor en una pantalla hacia 4 direcciones distintas (4 estados), lo más

frecuente es que se utilicen 4 frecuencias de estimulación diferentes para cada estado, buscando que éstos sean lo suficientemente diferenciables como para que no haya confusión entre ellos (o que dicha probabilidad de confusión sea la menor posible). Sin embargo, algunos trabajos también han abordado la posibilidad de obtener este mayor número de estados, pero con una única frecuencia de estimulación [5, 6].

Objetivos

Este trabajo propone determinar de manera objetiva el nivel de diferenciación que se puede lograr a través de esta técnica y concluir si los resultados revelan la suficiente evidencia como para considerarse una alternativa viable para la obtención de un mayor número de comandos de control, empleando una fuente de estimulación visual de frecuencia única y la menor cantidad de electrodos de registro posible.

Materiales y métodos

A. Adquisición de los datos.

Se utilizaron como datos a analizar, registros de EEG de libre disponibilidad online obtenidos durante la etapa de entrenamiento llevada a cabo en [5]. Los

registros tenidos en cuenta corresponden a doce personas sanas (7 mujeres y 5 hombres, rango de edad: 19– 32 años). Todos tenían visión normal o corregida a normal y estaban libres de trastornos neurológicos y oftalmológicos. A cada sujeto se lo sometió a dos sesiones de estimulación, por lo que se obtuvieron un total de 24 registros para analizar.

B. Protocolo Experimental.

El protocolo consistió en presentar a los sujetos un estímulo visual ubicado en el centro de un monitor. Dicho estímulo estaba compuesto por un cuadrado parpadeante (12 x 12 cm) rodeado por 4 cuadrados pequeños no parpadeantes (0,7 x 0,7 cm) fuera de los cuatro bordes del cuadrado central (norte-N, este-E, oeste-W, sur-S). El cuadrado parpadeante, cuya frecuencia de estimulación fue de 15 Hz, era el encargado de producir los SSVEPs, mientras que los cuatro cuadrados pequeños actuaban como objetivos hacia donde los usuarios debían dirigir la mirada, de modo que el sujeto percibiera el estímulo luminoso central de forma periférica. La fuente de estimulación visual era de color blanco mientras que los 4 cuadrados objetivos de color rojo. El estímulo se presentó en un monitor de computadora LCD (24 pulgadas, HP EliteDisplay E241i, resolución de 1280x800

píxeles) ubicado a una distancia de 50 cm del sujeto aproximadamente. En la Fig. 1. (b) se observa una representación de la forma de la señal empleada como estimulación. El cuadrado parpadeante permanece en estado de ON durante 14.11 s, durante ese tiempo los pequeños objetivos a los lados cambian a color rojo indicando la dirección en que debe observar el sujeto, el orden de las direcciones se presenta de manera aleatoria. Luego viene un periodo de descanso (estado de OFF) de 1.53 s, que le permite al sujeto parpadear, antes de pasar a la siguiente estimulación. Se presentaron en total 50 secuencias y la duración total de cada sesión fue aproximadamente de 13.4 min.

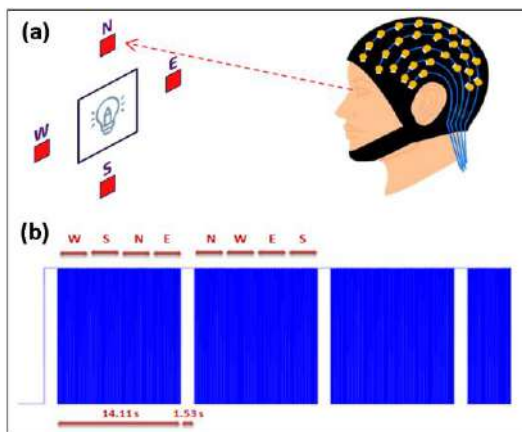


Fig. 1. (a) Esquema de protocolo experimental. (b) Porción de señal de estimulación visual (trenes de pulsos de 15 Hz).

C. Procesamiento de datos.

Los registros de EEG se obtuvieron empleando 32 canales (sistema internacional 10-20), con el equipo de adquisición ActiveTwo AD-box de BioSemi

y dichos registros se procesaron mediante el lenguaje de programación Matlab en su versión R2020a. Todos los experimentos se llevaron a cabo en una sala de oficina típica sin ningún blindaje electromagnético. Para el registro de datos se utilizó una frecuencia de muestreo de 1024 Hz (frecuencia predeterminada del equipo de adquisición). Cabe aclarar que es posible reducir dicha frecuencia para disminuir la cantidad de datos y con ello su demanda de procesamiento, pero en este caso se optó por no modificar este parámetro ya que no representaba un problema a la hora de procesar los datos. Los datos de EEG fueron preprocesados por medio de un filtro pasa banda (1-80 Hz) y posteriormente fue aplicado un filtro pasa banda Butterworth de 12.5-18 Hz durante la etapa de procesamiento. Se descartaron los primeros 500 ms después del inicio de cada estimulación, lo que resultó en una duración de prueba efectiva de 3 s por estímulo. Se realizó un diagrama espectral de potencia (PSD) a través del método del periodograma, en donde para determinar la amplitud de las respuestas correspondientes al estímulo de 15 Hz se consideraron aquellas componentes comprendidas entre 14 y 16 Hz. Para el cálculo de la densidad espectral de potencia (PSD) se dividió cada evento (N, S, E y W) en 3 intervalos de 1 seg, se

calculó un periodograma para cada intervalo utilizando una ventana rectangular y se realizó un promediado de los mismos. Finalmente se promediaron todas las componentes obtenidas de las 50 secuencias para los 4 estados (N, S, E y W) y se repitió el mismo procedimiento para cada uno de los 32 canales con el fin de realizar un mapeo de la actividad cerebral. Luego, con el objetivo de determinar el nivel de discriminabilidad entre estados, se utilizó la distancia de Bhattacharyya, que es una medida de la similitud de dos distribuciones de probabilidad o, en otras palabras, el nivel de superposición de dos conjuntos de muestras. Ésta es una técnica utilizada habitualmente en problemas de clasificación [7]. Evidentemente como para cada sujeto se definieron 4 estados, lo que se hizo fue dicha comparación de a pares, obteniendo 6 resultados en total (N vs S, N vs E, N vs W, S vs E, S vs W y E vs W). El motivo por el cual se realiza dicha comparación es porque se pretende identificar aquellos pares de eventos que presenten una mejor diferenciación con respecto al resto, ya que la variabilidad de situaciones discriminables para cada sujeto es demasiado grande. Estos cálculos se hicieron para cada uno de los 12 sujetos y finalmente se realizó un promediado de las comparaciones (sometiendo los datos previamente a un

proceso de normalización ya que los valores absolutos difieren considerablemente entre sujetos).

Resultados y discusión

Se determinó el nivel de actividad cortical correspondiente a SSVEP de 15 Hz para cada sujeto y se lo presentó en un mapa de colores, considerando el sistema internacional 10-20, como se muestra en la Fig. 2.

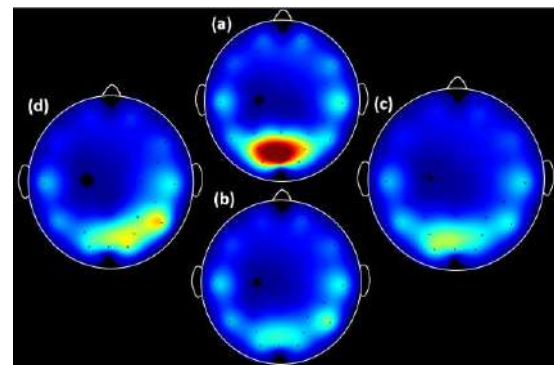


Fig. 2. Mapeo de la actividad cortical de uno de los sujetos de prueba. SSVEPs registrados cuando el sujeto dirige su mirada: (a) hacia arriba (Sit. N), (b) abajo (Sit. S), (c) derecha (Sit. E) (d) e izquierda (Sit. W) de la fuente de luz parpadeante.

Se muestra en la Fig. 3. un mapeo del nivel de diferenciación entre cada estado comparados de a pares (6 en total), realizando una normalización de los resultados de cada sujeto y promediando dichos valores.

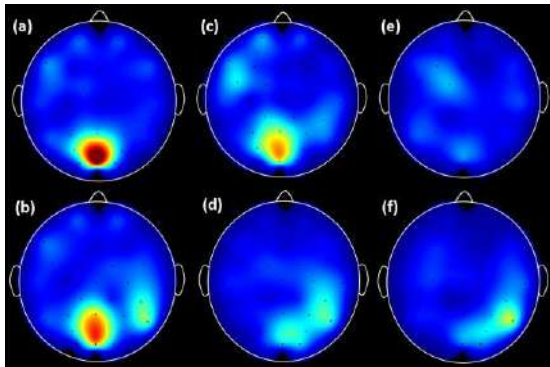


Fig. 3. Promedio de 12 sujetos del nivel de discriminabilidad entre 2 estados. (a) N vs S, (b) N vs E, (c) N vs W, (d) S vs E, (e) S vs W y (f) E vs W.

En este trabajo se evocaron SSVEP empleando una fuente de estimulación de una sola frecuencia (15 Hz) pero evaluando la posibilidad de obtener 4 estados diferentes gracias al cambio en la direccionalidad de la mirada del sujeto en las 4 direcciones cardinales N, S, E y W. Tanto en [5] como en [6] se desarrollaron trabajos similares con objetivos relacionados, y en ambos casos se obtuvieron valores de energía muy prometedores, con altas tasas de transferencia de información (ITR) que permitieron realizar una buena clasificación, con niveles de precisión suficientemente elevados como para ser empleados en la obtención una mayor variedad de comandos. Dichos trabajos resultan útiles para destacar la relevancia de los resultados expuestos en el presente artículo y realizar nuevas conclusiones. La principal ventaja de emplear esta técnica es que con solo una frecuencia de estimulación se pueden

conseguir múltiples estados diferentes, lo que permite ejecutar una mayor cantidad de comandos para el control de dispositivos. Además, el estímulo no se está recibiendo directamente, sino que el sujeto lo percibe de manera periférica, disminuyendo considerablemente la fatiga visual debida a los pulsos luminosos de baja frecuencia, lo cual favorece a la obtención de registros más limpios a la par de una comodidad y seguridad mayor del usuario. Por lo general, cuando se implementan este tipo de ICC, se suelen emplear arreglos de 32, 64 o más canales de registro que resultan molestos por la gran cantidad de electrodos que se terminan conectando al paciente para la adquisición las señales electroencefalográficas. En muchas ocasiones esto puede provocar disgusto y ser una verdadera molestia para el paciente, ya que con frecuencia se trata de personas postradas o que mantienen posiciones estáticas prolongadas y su comodidad pasa a recibir una valoración superior desde su punto de vista. A través de este método se podría obtener una alternativa más conveniente y amigable para el usuario, ya que permite localizar aquellas zonas del cráneo donde se observa mayor discriminabilidad con respecto a otras, de tal manera que es posible eliminar múltiples canales



innecesarios o que no aportan información verdaderamente relevante y conservar solo aquellos que nos permitan diferenciar un estado del otro, pasando a necesitar una cantidad de conexiones de alrededor de 8 o 10 canales (dependiendo del sujeto y otras condiciones).

Los resultados permitieron apreciar que sí existen diferencias, en algunos casos más notables que en otros, cuando se implementa esta variante. Como era de esperarse, los resultados varían mucho entre algunos sujetos y otros. Sin embargo, se puede afirmar, en vista de los resultados obtenidos de cada uno de los participantes, que hay una característica que se repite frecuentemente, al menos en la mayoría de los sujetos, y es que el nivel de diferenciación entre el estado N y S suele ser muy elevado, así como también (aunque con resultados más variables) el nivel de diferenciación entre el estado N y los estados E y W.

Al analizar la Fig. 3., en donde se emplea la técnica de la distancia de Bhattacharyya, se puede observar que cada comparación presenta sus propias diferencias cuando se comparan de a pares cada uno de los estados (salvo en el caso S vs W), lo que nos permitiría corroborar que sí sería posible llegar a discriminar 2 o más estados diferentes con la implementación de una única frecuencia de estimulación luminosa.

Conclusiones

El Desarrollo del presente trabajo permitió concluir que sí es posible la obtención de múltiples estados de respuesta, con un nivel de diferenciación aceptable, de diferentes sujetos con la implementación de una fuente de estimulación visual de frecuencia única al variar la direccionalidad de la mirada. Los estados entre los cuales se obtuvo un mayor nivel de discriminabilidad fue en la comparación N vs S (cuando se analiza el promedio de todos los registros). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de emplear la comparación entre otros estados para la obtención de respuestas diferentes, teniendo presente que la clasificación entre esos estados podría no ser tan efectiva como en el caso de mayor discriminabilidad que corresponde a la comparación entre los estados N y S.

Como posibles líneas de desarrollo futuro sería buena idea implementar este método con frecuencias de estimulación superiores, ya que someter al usuario a estímulos de 15 Hz implica un potencial riesgo de provocar eventos epilépticos (aún en sujetos sanos). Además, se propone modificar ligeramente el protocolo experimental, haciendo que tanto los tiempos de exposición como de descanso



sean más prolongados, permitiendo obtener una respuesta cerebral más clara de cada evento y adicionalmente ser capaces de establecer un nivel de actividad basal bien definido para cada sujeto. Si bien este trabajo no ofrece una forma de medir cuantitativamente el nivel de discriminabilidad entre estados con una sola fuente de estimulación, sus resultados permitirían abordar este desafío en futuros trabajos de investigación.

Bibliografía

[1] Zhu, D., Bieger, J., Molina, G. N. G., & Aarts, R. M. (2010b). A Survey of Stimulation Methods Used in SSVEP-Based BCIs. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2010, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2010/702357>

[2] Zhang, Y., Xie, S., Simchi-Levi, D., & Zhang, Z. (2021b). Data Analytics in Steady-State Visual Evoked Potential-Based Brain-Computer Interface: A Review. *IEEE Sensors Journal*, 21(2), 1124-1138. <https://doi.org/10.1109/jsen.2020.3017491>

[3] Tsoneva, T., Garcia-Molina, G., & Desain, P. (2021b). SSVEP phase synchronies and propagation during repetitive visual stimulation at high frequencies. *Scientific Reports*, 11(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83795-9>

[4] Tello, R., Muller, S., Bastos, T., & Ferreira, A. (2014). Evaluation of different stimuli color for an SSVEP-based BCI. *En XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica-CBEB* (pp. 25-28).

[5] Chen, J., Zhang, D., Engel, A., Gong, Q., & Maye, A. (2017). Application of a single-flicker online SSVEP BCI for spatial navigation. *PLOS ONE*, 12(5), e0178385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178385>

[6] Sharma, K., & Kar, S. (2019). Extracting multiple commands from a single SSVEP flicker using eye-accommodation. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 39(3), 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.bbe.2019.08.002>

[7] Chatterjee, R. M., Maitra, T., Islam, S. H., Hassan, M. M., Alamri, A., & Fortino, G. (2019). A novel machine learning based feature selection for motor imagery EEG signal classification in Internet of medical things environment. *Future Generation Computer Systems*, 98, 419-434. <https://doi.org/10.1016/j.future.2019.01.048>



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

Financiamiento

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), proyecto PIUNT E614 de la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional de Tucumán (SCAIT) y por fondos institucionales del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO).

Aplicación de dosificación experimental IBRACON IPT en hormigones en base a 3
bancos de agregado laterítico de Beni - Riberalta



C.24. Ciencias e Ingeniería de materiales

Aplicación de dosificación experimental IBRACON IPT en hormigones en base a 3 bancos de agregado laterítico de Beni - Riberalta

Autor: Mendez Torrez, Romina; rominamendezt.cu@gmail.com

Tutor: Camacho Peña, Boris; christianboriscamacho.p@fcyt.umss.edu.bo

Universidad Mayor de San Simón (UMSS)

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo aplicar el método de dosificación experimental IBRACON IPT en hormigones, en base a 3 bancos de agregado laterítico provenientes de Riberalta (Beni) a nivel de laboratorio mediante la caracterización química y mecánica. Se inició con la caracterización del material granular laterítico como grava y la arena residual como fino, presentando un tamaño máximo de 1" y tamaño máximo nominal de 3/4", la arena presentó un módulo de fineza de 2.25, los resultados de peso específico arrojaron valores que se encuentran dentro del promedio de agregados, van de 1.80 a 3.31 gr/cm³, características similares a las de un agregado convencional con la diferencia de que presentan un mayor porcentaje de absorción que varía entre 6%- 13%.

De la caracterización química, se pudo evidenciar un porcentaje de 40,46%- 38.93% de óxido de hierro (Fe₂O₃), 28.22% -28.48% sílice (SiO₂) y 10.96% - 14.08% de óxido de aluminio (Al₂O₃), para el banco 1 y 2 respectivamente. Se realizó el análisis de las propiedades mecánicas del hormigón preparado con grava laterítica a través del vaciado de 27 probetas las cuales se ensayaron a compresión a la edad de 7, 14 y 28 días, tomando en cuenta como variables independientes los trazos en relación cemento: agregados variando este en 1: 5 ±1.5, se realizó la combinación de agregados por porcentajes hasta determinar el menor porcentaje de vacíos, como resultado se obtuvieron 45% arena – 55% grava para los bancos 1- 3 y 45% arena – 55% grava, 70% arena – 30 % grava para el banco número 2. El banco que más destacó fue el 2do con una combinación de 45/55 de agregados, llegando a una resistencia máxima de 40.34 MPa, seguido del banco 3 con 29.34 MPa, el banco 2 combinación 70/30 con 28.65 MPa y por último el 1er banco con 15.94 MPa.

Palabras clave: Laterítico, IPT, compresión



INTRODUCCIÓN

Hormigones o concretos, dos palabras cuyo significado y aplicación tienen gran importancia dentro del área de la construcción en el mundo, se conoce que la pasta o mezcla está principalmente conformada por elementos base como el cemento portland, agregados, agua y aire, caracterizado por su variabilidad, trabajabilidad, durabilidad y resistencia a fuerzas de compresión, hoy por hoy se ha convertido en el material más utilizado en el mundo. Se han realizado cuantiosas investigaciones cuyos resultados mostraron hallazgos cada vez más interesantes dentro del mejoramiento de las propiedades del hormigón.

Los suelos tropicales tienen un comportamiento peculiar en relación a otros suelos, se hace necesario investigar la influencia de la cementación creada por la meteorización (Queiroz de Carvalho, Martinez, & Flores, 2005).

El uso de materiales alternativos en la construcción civil solo es posible cuando presentan estudios científicos y ventajas económicas que avalen su uso. (Rodríguez Pantoja Junior & de Souza Picanço, 2020)

La búsqueda de alternativas que apunten a satisfacer la demanda comercial de un sector de la economía en constante expansión, incluso en tiempos de crisis económica, y que, al mismo tiempo, no

intensifique la degradación del medio ambiente, la inclusión de elementos alternativos al hormigón es muy prometedora, para la exploración de agregados alternativos de sus diversos suelos. (Gonçalves Duarte Mendonça, y otros, 2021)

El trabajo al que sirve el presente proyecto de investigación busca expandir el conocimiento acerca del uso de materiales lateríticos formados en suelos orientales bolivianos, estos suelos presentan características físicas, químicas y mineralógicas muy particulares que influyen en el comportamiento de estos agregados con el concreto, tomando en cuenta ya las variables analizadas en este proyecto, pretende enfocarse en la resistencia aplicada a estructuras tomando en cuenta el tiempo de curado, la porosidad, el contenido de humedad (%), la relación agua cemento (a/c) y la modificación del tamaño de grano mediante la inserción de arena laterítica.

La resistencia a compresión es totalmente dependiente de las variables antes mencionadas y los materiales a utilizar, es necesario conocer todas las variables que intervienen en el diseño de mezclas. “El cálculo de la media la correlación de la resistencia a la compresión con la relación agua/cemento para un determinado tipo y clase de cemento, siempre que el objetivo

de un el objetivo de un estudio de dosificación es obtener una resistencia determinada, sin dejar de lado la economía y la sostenibilidad que deben guiar siempre un estudio de dosificación” (Tutikian & Helene, 2011).

El objetivo de la industria de la construcción a nivel nacional siempre será buscar alternativas para reducir los costos y promover prácticas eco sostenibles, valorando siempre los materiales encontrados regionalmente a nivel Bolivia.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo aplicar el método de dosificación experimental IBRACON IPT en hormigones, en base a 3 bancos de agregado laterítico provenientes de Riberalta (Beni) a nivel de laboratorio mediante la caracterización química y mecánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suelos tropicales lateríticos

Según Queiroz de Carvalho (1979), el término laterita apareció en la literatura por primera vez en 1807. Atribuido al ingeniero británico, Francis Buchanan, mientras trabajaba en la región, este agregado fue inicialmente denominado como arcilla endurecida, el proceso de formación de este material laterítico se da a través de la lixiviación de suelos bien drenados bajo climas tropicales y sub tropicales. Nogami

y Villibor en 1996 propuso que los suelos tropicales lateríticos son aquellos que presentan comportamientos y peculiaridades bajo el rendimiento geológicos y/o pedológicos típicos de las regiones tropicales húmedas, como agregado tiene de característica principal la capacidad de endurecerse al ser expuestos a ciclos de secado y humedecimiento.

Suelos lateríticos en Bolivia

Los suelos lateríticos en Bolivia se forman en las regiones del oriente y noreste del país, debido a las diversas condiciones favorables que aportaron distintas eras geológicas y a las condiciones climáticas intensas de estas regiones (temperaturas elevadas, alta pluviosidad etc.), Las zonas con suelos lateríticos en Bolivia abarcan las provincias Chiquitos, Sandóval, Velasco, Ñuflo de Chávez en Santa Cruz, provincias Iténez, Yacuma, Vaca Diez en Beni y parte de la provincia Federico Román en Pando.



Figura 1. Extracción de grava laterítica Beni – Riberalta (fuente: autor)

Arena residual

Como material fino, para investigación se decidió utilizar arena residual, esta es muy común encontrarla por acopios en las ciudades del oriente, la muestra a usar tiene como procedencia la ciudad de Riberalta.



Figura 2. Extracción de arena residual de acopio en la ciudad de Riberalta (fuente: autor)

Dosificación de hormigones

Obtener hormigones de calidad dentro la industria de la construcción va ligada con la dosificación de diseño, esta depende de:

- Control, manejo y almacenamiento de materiales.
- Caracterización de agregados.
- Preparación y pesaje de material.
- Condiciones de mezclado según la ASTM C-94.

El análisis previo de los materiales influye en la determinación óptima de cantidades, el cual deberá ir de acuerdo con los requerimientos de diseño, sea así de manera teórico, empírico o empírico directo.

Método experimental de dosificación IBRACON IPT

El método de dosificación experimental aplicado en el proyecto, se caracteriza por combinar leyes teóricas combinadas con estudios experimentales realizados previamente en laboratorio, “una dosificación experimental tendrá por fin establecer un trazo de concreto para que este tenga una resistencia y una trabajabilidad previstas, este último expresado por la consistencia” (Helene & Terzian, 1992).

Leyes teóricas con aplicación en hormigones

- **Ley de Abrams (1918):** la resistencia a una edad determinada (f_{c_j}), es inversamente proporcional a la relación agua/cemento (a/c). (Tutikian & Helene, 2011)

$$f_{c_j} = \frac{k_1}{k_2^{a/c}} \quad (1)$$

- **Ley de Lyse (1932):** la consistencia del concreto fresco depende preponderantemente de la cantidad de agua por metro cúbico de concreto. (Tutikian & Helene, 2011)

$$m = k_3 + k_4 * \frac{a}{c} \quad (2)$$

- **Ley de Prizkulnik & Kirilos (1972):** Este indica que el consumo de cemento por m^3 de hormigón varía en proporción inversa a la relación en masa seca de áridos/cemento (m). (Tutikian & Helene, 2011)

$$C = \frac{1000}{k_5 + k_6 * (m)} \quad (3)$$

Donde:

m= combinación de agregados gruesos y finos.

C= consumo de cemento por metro cubico.

k1, k2, k3, k4, k5, k6= constantes de materiales específicos.

El método IBRACON explica que la a mayor compacidad entre agregados, se obtendrá un menor consumo de agua, por lo que a menor relación a/c se presentaran mayores resistencias y viceversa. Para llevar a cabo dicho proceso se deben tomar en cuenta los siguientes comportamientos en la mezcla:

- **Contenido de mortero seco**

$$\alpha = \frac{1+a}{1+m} \quad (4)$$

- **Relación agua/material**

$$H = \frac{a/c}{(1+m)} \quad (5)$$

- **Consumo de cemento por m3**

$$C = \frac{\gamma}{1+a+\rho+\frac{a}{c}} \quad (6)$$

γ =densidad del concreto (kg/m3)

a= relación agregado fino seco.

ρ = relación agregado grueso seco.

Donde se conoce que la combinación de agregados gruesos y finos será igual a la ecuación (7):

$$m = a + \rho \quad (7)$$

Trazo de diseño (c:m)

Manteniendo constante el contenido de mortero seco en relación a agua/materiales secos, calcular analíticamente las proporciones para, por lo menos, mas dos trazos, uno más rico tipo (1: m-1 o 1: m-0,5) y uno más pobre tipo (1: m+1 o 1: m+0,5). (Tutikian & Helene, 2011)

La principal característica de determinar el trazo de diseño para la dosificación experimental es que se la podrá aplicar en mezclas que contengan materiales iguales o similares a los aplicados inicialmente, como ser, material granular grueso y fino, tipo de cemento a usar, aditivos, etc. A través de una correlación trabajando con el diagrama de dosificación IPT.

Diagrama de dosificación IPT

Introducido por Prizskulnik & Kirilos, en 1974, muestra gráficamente el comportamiento de la mezcla del hormigón en diferentes aspectos, se muestran 3 cuadrantes donde:

- **I c:** Se muestra la curva ajustada en base a la relación a/c y $f'c$, a diferentes edades, correspondiendo a la (ec.1), ley de Abrams.
- **II c:** Se relacionan los datos a/c proporción de agregados (m), según la (ec.2), ley de Lyse.
- **III c:** Correlaciona los resultados en base a la (ec.3), ley de Prizskulnik & Kirilos.

El resultado que se busca obtener a través de las 3 leyes teóricas (ec.1, 2 y 3) se muestra a continuación en la Figura 3.

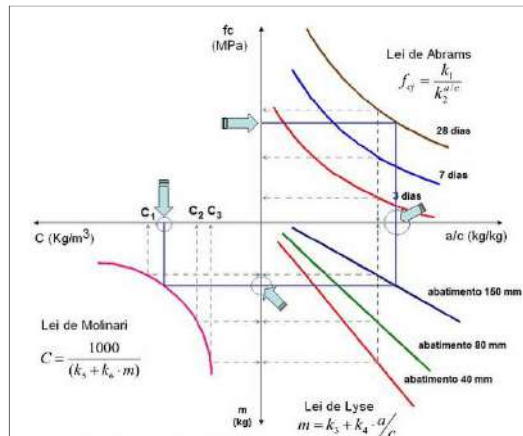


Figura 3. Diagrama de dosificación IBRACON IPT (Helene & Terzian, 1992).

Comportamiento mecánico ensayos de hormigón (E.D)

Determinar el efecto que proporcionan los materiales lateríticos en el comportamiento mecánico del hormigón es elemental, pues a través de este se puede determinar el tipo de aplicación directa según su capacidad de resistencia para el tipo de carga a soportar.

Resistencia a compresión ($f'c$)

Este método de prueba cubre la determinación de resistencia a compresión de especímenes cilíndricos de concreto tales como moldeados cilindros y núcleos perforados. (American Society for Testing and Materials, ASTM C39: Standard Test Method for Compressive Strength of Cylindrical Concrete Specimens, 2018).

Según (Borges Pompeu Neto, 1976), la Resistencia del concreto es influenciada principalmente por los siguientes factores:

- Factor agua/cemento
- Proporción cemento/agregados (Trazo)
- Gradación, textura, forma, Resistencia y dureza de las partículas del agregado.
- Tamaño máximo del agregado.

Los resultados a compresión dependerán también de las dimensiones de la probeta y principalmente de la ejecución de vaciado de esta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química

La Tabla 1 presenta los resultados obtenidos acerca de la composición química del agregado laterítico de 2 bancos diferentes, donde se pudo evidenciar un alto porcentaje de óxido de hierro (Fe_2O_3) con un 40,46% - 38.93%, seguido de sílice (SiO_2) con 28.22% - 28.48% y oxido de aluminio (Al_2O_3) con 10.96% - 14.08% para el banco 1 y 2 respectivamente.

Por concentración de compuestos de hierro, aluminio y silicio que son más resistentes a la carga, formando un complejo de óxidos e hidróxidos de hierro, aluminio y silicio como elementos predominantes. En estas condiciones de intensa meteorización se forman las concreciones lateríticas presentes en estos suelos. (Filho, 2005)

Tabla 1

Composición química Banco 1 y 2

Muestra	Banco 1	Banco 2
% SiO ₂	28,2200	28,480
% PPC	10,7100	11,860
% Al ₂ O ₃	10,9600	14,080
% CaO	2,4100	1,210
% MgO	0,4322	1,730
% SO ₃	0,0570	0,011
% Fe ₂ O ₃	40,4600	38,930
% Na ₂ O	1,7500	1,110
% K ₂ O	0,1670	0,118

Fuente: autor

Los resultados se obtuvieron trabajando en conjunto con los Laboratorios de Química – UMSS, se ve que estos varían por banco, ya que cada zona presenta diferente condición climática, los porcentajes de sílice nos indican que estos suelos fueron formados por procesos de laterización.

Ensayos experimentales ejecutados en laboratorio

Para llevar a cabo el proceso de investigación, se dividió esta en 3 fases las cuales son:

Fase I: Caracterización de agregados finos y gruesos

El material granular fue preparado inicialmente, se lavó y secó a una temperatura de 100 °C, la arena residual únicamente se secó, para pasar a la caracterización física de los mismos.

Debido a su proceso de formación, las concreciones lateríticas presentan una gran cantidad de material pulverulento (Gonçalves Duarte Mendonça, y otros, 2021). Si realizamos la comparación entre aguas de lavado se nota claramente que esta no cambia de color por la gran cantidad de finos que contiene.

Granulometría agregados gruesos

Este método de ensayo se utiliza principalmente para determinar la clasificación de los materiales propuestos para su uso como agregados o ser utilizados como agregados. Los resultados determinarán el cumplimiento de la distribución de tamaño de partícula, este proporcionará los datos necesarios para el control de la producción de diversos productos agregados y mezclas que contienen los agregados. (American Society for Testing and Materials, ASTM C136: Standard Test Method for Sieve Analysis of Fine and Coarse Aggregates, 2018)

Tabla 2

Composición granulométrica Banco 1

Tamiz	Abertura (mm)	BANCO 1	
		%Retenido tamiz	%Que pasa
2"	50.00	0.00	100.00
1 1/2"	37.50	0.00	100.00
1"	25.00	0.00	100.00
3/4"	19.00	0.00	100.00
1/2"	12.50	24.63	75.37
3/8"	9.50	18.48	56.89
N°4	4.75	43.75	13.14
PLATO	----	13.14	0.00

Modulo de fineza:

6.30

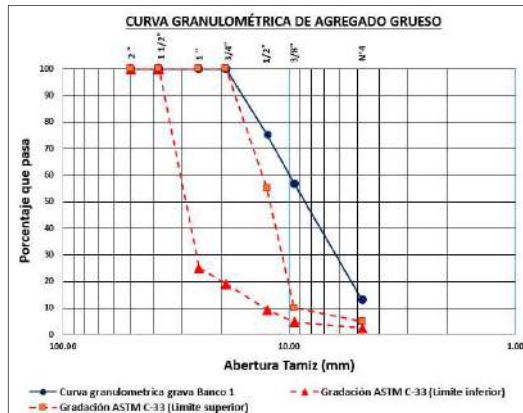


Figura 4. Curva granulométrica grava $\frac{3}{4}$ " (Banco 1)

Tabla 3

Composición granulométrica Banco 2

PROCEDENCIA		BANCO 2	
Tamiz	Abertura (mm)	%Retenido tamiz	%Que pasa
2"	50.00	0.00	100.00
1 1/2"	37.50	0.00	100.00
1"	25.00	0.00	100.00
3/4"	19.00	0.00	100.00
1/2"	12.50	6.26	93.74
3/8"	9.50	18.67	75.07
N°4	4.75	70.72	4.35
PLATO	----	4.35	0.00
Modulo de fineza:		6.21	



Figura 5. Curva granulométrica grava $\frac{3}{4}$ " (Banco 2)

Los áridos adquiridos para esta investigación, presentan las distribuciones granulométricas representadas en las Figuras 4, 5 y 6. Todas con un tamaño máximo de 1" y tamaño máximo nominal de $\frac{3}{4}$ ". Por material retenido en los tamices, se obtuvieron las Tablas 2, 3 y 4 donde se muestran los resultados de composición granulométrica para los 3 bancos estudiados.

Tabla 4

Composición granulométrica Banco 3

PROCEDENCIA		BANCO 3	
Tamiz	Abertura (mm)	%Retenido tamiz	%Que pasa
2"	50.00	0.00	100.00
1 1/2"	37.50	0.00	100.00
1"	25.00	0.00	100.00
3/4"	19.00	0.00	100.00
1/2"	12.50	19.20	80.80
3/8"	9.50	14.22	66.58
N°4	4.75	54.77	11.81
PLATO	----	11.81	0.00
Modulo de fineza:		6.22	



Figura 6. Curva granulométrica grava $\frac{3}{4}$ " (Banco 3)

Si bien las curvas granulométricas se encuentran fuera de los límites superior e inferior propuestos por la ASTM C-33, esto no afectará a la investigación puesto que, al aplicar un método de dosificación del tipo experimental, como el método IBRACON – IPT, el material granular podrá ser utilizado sin problemas ya que se tomará en cuenta una combinación de agregados, explicado en la fase II.

Granulometría arena residual

La composición granular se muestra en la Tabla 5, seguida de la curva granulométrica en la Figura 7, donde se obtuvo un módulo de fineza de 2,25.

Tabla 5

Composición granulométrica arena residual

Tamiz	Abertura (mm)	%Retenido tamiz	%Que pasa
3/8"	9.50	0.00	100.00
N°4	4.75	0.13	99.87
N°8	2.36	1.94	97.93
N°16	1.18	10.63	87.30
N°30	0.60	28.94	58.36
N°50	0.30	35.23	23.13
N°100	0.15	14.97	8.16
N°200	0.08	6.55	1.60
PLATO	----	1.60	0.00

Modulo de fineza: 2.25

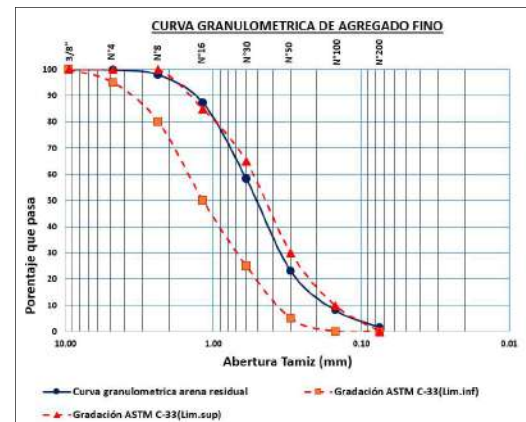


Figura 7. Curva granulométrica arena residual

Peso específico (γ) y porcentaje de absorción

Este método de ensayo cubre la determinación de la densidad media de una cantidad de partículas de áridos gruesos (sin incluir el volumen de huecos entre las partículas), la densidad relativa (gravedad específica) y la absorción del agregado grueso. (American Society for Testing and Materials, ASTM C127: Standard Test Method for Density, Relative Density (Specific Gravity), and Absorption of Coarse Aggregate, 2017)

Los resultados que se obtuvieron de ejecutar el ensayo de peso específico (Tabla 6), nos arrojan valores que se encuentran dentro del promedio de agregados convencionales que van de 1.80 a 3.31 gr/cm³, se obtuvo valores para el porcentaje de absorción entre los 6% y 13%, esto es normal al tratarse de arcillas

expandidas donde normalmente la absorción suele ser de hasta el 15%.

Tabla 6

Pesos específicos - % de absorción agregado grueso laterítico y arena residual

Numero de banco	γ seco (gr/cm ³)	γ aparente (gr/cm ³)	% absorción
Banco 1	2,005	2,691	12,728
Banco 2	2,602	3,096	6,132
Banco 3	2,133	2,837	11,635
Arena	2,558	2,676	1,717

Los valores obtenidos de peso específico se usarán también para obtener la combinación de agregados optima a aplicar en la dosificación (Fase II).

La densidad relativa (gravedad específica) también se utiliza en el cálculo de los huecos en los áridos en el método de ensayo C 29/ C 29M. (American Society for Testing and Materials, ASTM C128: Standard Test Method for Density, Relative Density (Specific Gravity), and Absorption of Fine Aggregate, 2017)

Peso unitario suelto (P.U.S) y compactado (P.U.C)

Este método de ensayo cubre la determinación de la densidad aparente ("peso unitario") de los áridos compactados o sueltos y los vacíos calculados entre las partículas de los áridos finos, gruesos, o agregados mixtos basados en la misma

determinación, aplicable a los agregados que no excedan de 5 pulg. [125 mm] de tamaño máximo nominal. (American Society for Testing and Materials, ASTM C29: Standard Test Method for Bulk Density ("Unit Weight") and Voids in Aggregate, 2017)

Tabla 7

Pesos unitarios sueltos y compactados agregado grueso laterítico y arena residual

Numero de banco	P.U.S (gr/cm ³)	P.U.C (gr/cm ³)
Banco 1	1.143	1.236
Banco 2	1.378	1.516
Banco 3	1.145	1.264
Arena	1.559	1.721

A partir de los cálculos realizados según las ecuaciones indicadas por la ASTM C29, se obtuvieron como resultado los valores indicados en la Tabla 7, donde los valores usuales de peso unitario suelto se encuentran entre 1.5 - 1.6 para gravas, 1.4 - 1.5 para arenas y los valores usuales para peso unitario compactado son 1.6 - 1.9 para gravas, 1.5 - 1.7 para arenas, partiendo de estos, podemos evidenciar que los resultados obtenidos para la grava laterítica de los 3 bancos estudiados y la arena residual se encuentran dentro de los parámetros considerados para el diseño de un bien hormigón aplicado a obras civiles.

Resistencia a la degradación del agregado grueso por abrasión e impacto en la máquina de los ángeles

En esta sección se dio como prioridad determinar el porcentaje de desgaste de la grava laterítica, tomando en cuenta la distribución granulométrica, donde se conoce que el tamaño máximo nominal para los 3 bancos es de 3/4", a partir de este dato se adoptó el tipo de gradación (B y C), se utilizaron 11 y 8 esferas respectivamente como carga. Los resultados se indican en la Tabla 8.

Tabla 8

Resultados resistencia a la degradación del agregado grueso laterítico

Número de banco	Gradación tipo	%Desgaste
Banco 1	B	45.95
	C	36.01
Banco 2	B	31.20
	C	23.42
Banco 3	B	45.55
	C	36.52

Para un tamaño máximo nominal de 19,0 mm (3/4 pulgadas) de agregado grueso nominal de 19.0 mm (3/4 pulg.) con pérdidas porcentuales en el rango de 10 a 45 %. (American Society for Testing and

Materials, ASTM C131: Method for Resistance to Degradation of Small-Size Coarse Aggregate by Abrasion and Impact in the Los Angeles Machine, 2020)

Tomando en cuenta el dato anteriormente mencionado se pudo evidenciar que los 3 bancos presentan pérdidas considerables, dentro del rango especificado por la ASTM C131, en especial el banco 3 con gradación tipo B con un valor de desgaste de 45.55% y banco 1 con gradación tipo B de 45.95%. Estos valores difieren en cantidad con los valores de los agregados convencionales ya que estamos tratando con un material arcilloso con un cierto grado de compactación.

Fase II: Combinación óptima de agregados finos y gruesos

Determinar la relación de agregados óptima, entre gruesos y finos, fue esencial para llevar a cabo la investigación, esta se realizó a través del método cubano Viterbo O'Reylli donde se buscó obtener el menor porcentaje de vacíos. Para determinar el menor porcentaje de vacíos con los agregados trabajados se definieron 11 mezclas en diferentes proporciones en porcentaje, donde el primer paso a realizar fue determinar la densidad o peso específico de la mezcla de agregados (8):

$$Dm = \frac{\gamma_{arena} * \%A + \gamma_{grava} * \%G}{100} \quad (8)$$

Donde:

D_m : Peso específico corriente de la mezcla de agregados.

γ_a : Peso específico corriente o seco de la arena

γ_g : Peso específico corriente o seco de la grava

%A: Porcentaje de la arena en la mezcla

%G: Porcentaje de la grava en la mezcla

El segundo paso fue determinar el % de vacíos en relación al peso unitario de la mezcla (9):

$$\%vacios = \frac{D_m - P.U.C_m}{D_m} * 100 \quad (9)$$

Donde:

P.U.C m= Peso unitario compactado de la mezcla de agregados.



Figura 8. Material usado para la ejecución de combinación 45%grava-55%arena – Banco 1

El procedimiento propuesto por el cubano Vitervo O'Reilly recomienda la combinación grava/arena que proporcione el menor contenido de vacíos, el contenido del cemento y del agua, se determinan

mediante factores que dependen de la relación agua-cemento y de la consistencia deseada en la mezcla. Recomendado cuando tenemos agregados de forma y tamaño irregular. (Yoc Juárez, 2007)

Los resultados producto de las diferentes combinaciones realizadas se muestran en la Tabla 9 y 10.

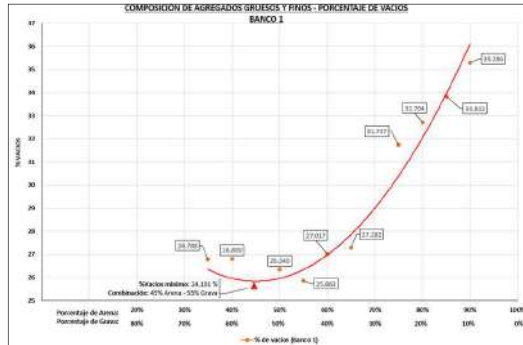
Tabla 9

Combinación de agregados - % vacíos (Banco 1 y 3)

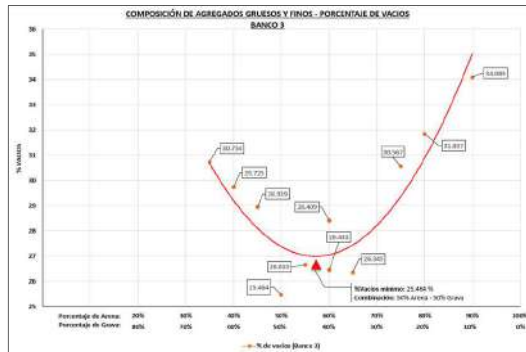
N° ENSAYO	PROCEDENCIA		BANCO 1	BANCO 3
	PROPORCIÓN DE AGREGADOS		% DE VACÍOS 45% - 55%	% DE VACÍOS 45% - 55%
	ARENA	GRAVA		
1	35%	65%	26.788	30.734
2	40%	60%	26.800	29.725
3	45%	55%	24.101	28.939
4	50%	50%	26.340	25.464
5	55%	45%	26.863	26.655
6	60%	40%	27.017	26.433
7	65%	35%	27.282	26.345
8	75%	25%	31.737	28.409
9	80%	20%	32.704	30.567
10	85%	15%	33.832	31.857
11	90%	10%	35.286	34.089

Los resultados mostrados en la tabla 9 pertenecen a los bancos 1 y 3 donde se obtuvo un porcentaje de vacíos mínimo de 24,101% con la combinación 45% arena y 55% grava para el banco 1 y un porcentaje de vacíos mínimo de 25,646% con 50% arena y 50% grava para el banco 3, se optó por una combinación 45% arena - 55% grava para la mezcla (m) de ambos

bancos, las curvas ajustadas para los porcentajes de vacíos se muestran en las figuras 9 y 10.



*Figura 9. %Vacíos (banco 1)
combinación 45% arena - 55% grava*



*Figura 2. %Vacíos (banco 3)
combinación 45% arena - 55% grava*

Los resultados mostrados en la tabla 10 pertenecen al banco 2, para este banco en especial se decidió realizar dos veces el ensayo de combinación por que presenta características más óptimas en comparación con los bancos 1 y 3, se obtuvo un porcentaje de vacíos mínimo de 25,472% con la combinación 50% arena y

50% grava en la primera opción y un porcentaje de vacíos mínimo de 23,163% con 65% arena y 35% grava, al presentar resultados diferentes se optó por una combinación 45% arena - 55% grava y 70% arena – 30% grava para las opciones de mezcla (m).

Tabla 10

Combinación de agregados - % vacíos (Banco 2)

N° ENSAYO	PROCEDECENCIA		BANCO 2	BANCO 2
	ARENA	GRAVA	% DE VACIOS 45% - 55%	% DE VACIOS 70% - 30%
1	35%	65%	27.882	26.871
2	40%	60%	26.492	25.004
3	45%	55%	26.383	24.033
4	50%	50%	25.472	24.916
5	55%	45%	25.632	26.415
6	60%	40%	25.483	24.185
7	65%	35%	25.478	23.163
8	75%	25%	29.900	29.900
9	80%	20%	30.817	30.817
10	85%	15%	31.903	31.903
11	90%	10%	34.683	34.683

Las curvas ajustadas en base a los porcentajes de vacíos para el banco 2 se muestran a continuación en las figuras 11 y 12.

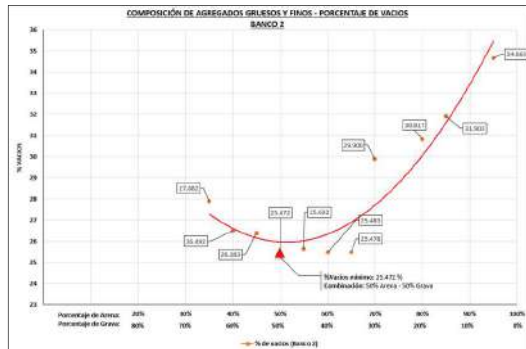


Figura 11. %Vacíos (banco 2)
combinación 45% arena - 55% grava

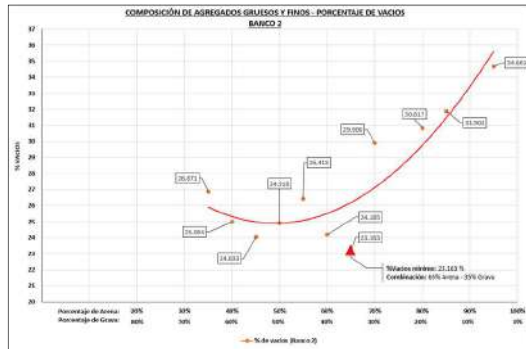


Figura 12. %Vacíos (banco 2)
combinación 70% arena - 30% grava

Fase III: Cálculo de contenido óptimo de mortero seco por el método IBRACON – IPT

Trazos de dosificación

La tercera fase de investigación indica que para realizar la gráfica de dosificación IPT se necesita variar los trazos, mínimamente en 3 puntos, para este trabajo se asumieron los siguientes trazos (Tabla 11):

Tabla 11

Trazos usados para la dosif. experimental

Trazos utilizados	
Trazo rico	1: 3,5
Trazo medio	1: 5,0
Trazo pobre	1: 6,5

Tomando en cuenta el concepto detallado en el punto 4.5.2 es que se trabajara en laboratorio variado el trazo en $1: m \pm 1,5$.

La falta de mortero en la mezcla provoca porosidad en el hormigón o fallos de hormigonado. El exceso da mejor apariencia al concreto, pero aumenta el costo por metro cubico, así como el riesgo de agrietamiento por origen térmica por contracción de secado. (Helene & Terzian, 1992)

Contenido de mortero seco

La variación en el contenido de mortero seco hasta llegar al contenido ideal es elemental para esta investigación.

Rotura a compresión de probetas con hormigón laterítico

Para realizar el estudio de las propiedades mecánicas del hormigón laterítico, se ha optado por probetas cilíndricas con dimensiones de 10 cm x 20 cm, la muestra empleada para esta investigación por banco consta de 27 cuerpos cilíndricos, los cuales fueron desencontrados después de 24 horas del vaciado, seguido se sumergieron en piscinas con agua, donde

permanecieron inmersos hasta las fechas de ruptura, en intervalos de 7, 14 y 28 días después de la fabricación.

Para la elaboración de este hormigón se tomó como rango de asentamiento 8 ± 2 cm.



Figura 13. Composición interna de agregados en los cilindros ensayados

Diagramas IPT

En base a las leyes teóricas con aplicación en hormigones explicadas en el punto 4.5.1, se obtuvieron los diagramas de dosificación de hormigones lateríticos para los bancos 1, 2 y 3 (Figura 14, 15, 16 y 17). Con los datos de las resistencias a compresión a los 7, 14 y 28 días, las relaciones agua/cemento, la combinación de agregados y la cantidad de cemento por metro cúbico empleado, esta última se obtuvo tomando como dato base las densidades de las mezclas obtenidas in situ al momento de realizar el vaciado de los cilindros.

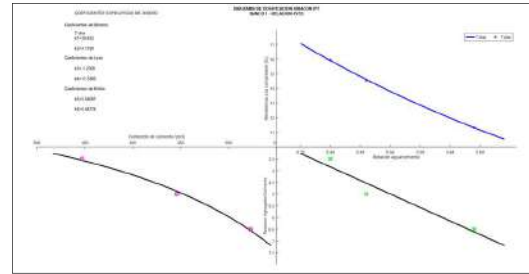


Figura 14. Diagrama de dosificación IPT – Banco 1 (combinación arena/grava - 45/55)

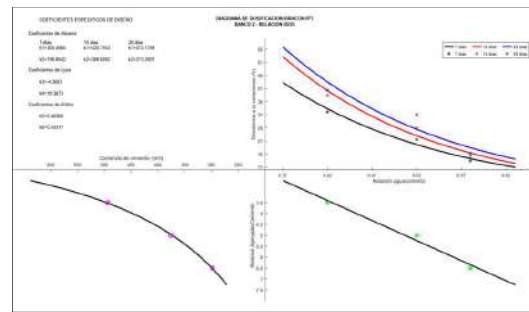


Figura 15. Diagrama de dosificación IPT – Banco 2 (combinación arena/grava - 45/55)

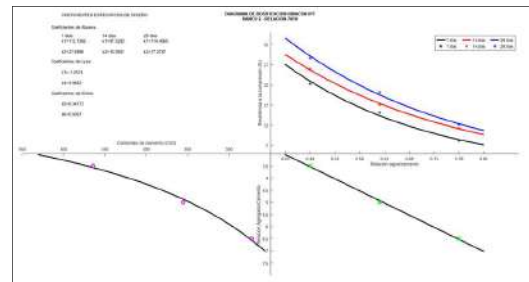


Figura 16. Diagrama de dosificación IPT – Banco 2 (combinación arena/grava - 70/30)

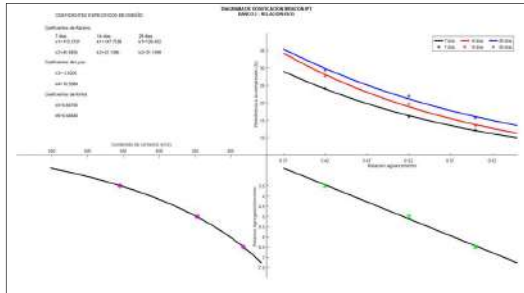


Figura 17. Diagrama de dosificación IPT – Banco 3 (combinación arena/grava- 45/55)

Comparación de resultados obtenidos en los diferentes bancos

Se detallan a continuación los resultados a compresión obtenidos a los 7, 14 y 28 días para los 3 bancos estudiados (Tabla 13), así también se puede observar la línea de tendencia según el trazo utilizado (Figura 18, 19 y 20), donde el trazo 1:3.5 presenta el punto más alto y el trazo 1:6.5 el punto más bajo de la resistencia.

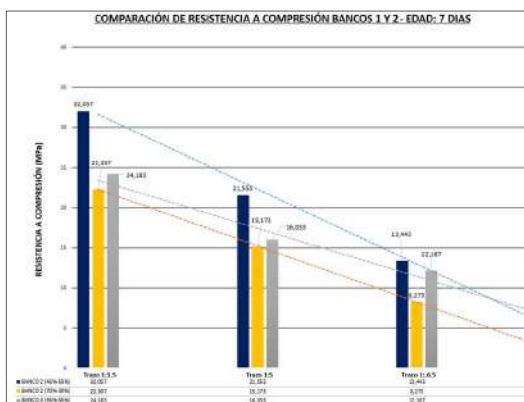


Figura 18. Comparación de Resistencias a compresión banco 2 y 3 a los 7 días de edad

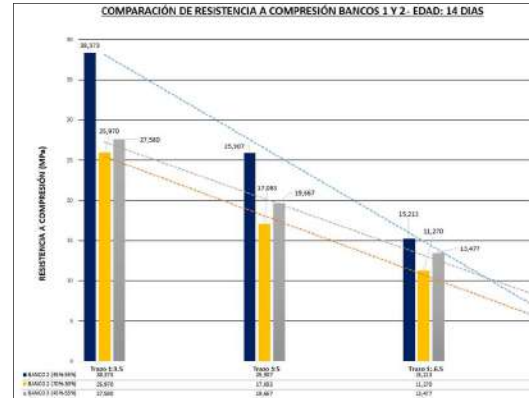


Figura 19. Comparación de Resistencias a compresión banco 2 y 3 a los 14 días de edad

El banco que más destaque fue el 2do con una combinación de 45/55 de agregados, llegando a una resistencia máxima de 40.34 MPa, seguido del banco 3 con 29.34 MPa, el banco 2 combinación 70/30 con 28.65 MPa y por último el 1er banco con 15.94 MPa, estos presentaron un consumo de cemento por metro cubico igual a (Tabla 12):

Tabla 12

Relaciones agua/cemento y cantidad de cemento calculados para los bancos 2 y 3.

NÚMERO DE BANCO	RELACION a/c	CANTIDAD DE CEMENTO/m3
B2 (45/55)	0,42	493,75
	0,52	376,27
	0,58	298,17
B2 (70/30)	0,48	464,45
	0,62	355,45
	0,78	273,05

	0,42	454,64
B3 (45/55)	0,52	346,76
	0,60	282,58

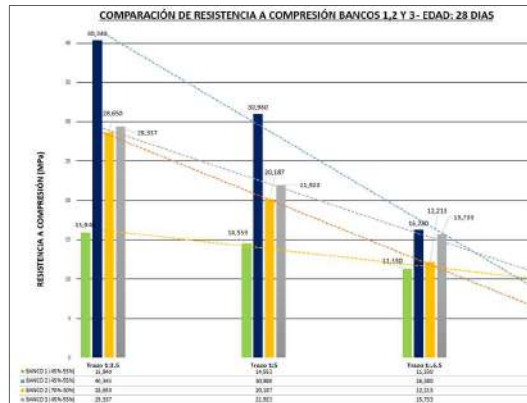


Figura 20. Comparación de Resistencias a compresión banco 1, 2 y 3 a los 28 días de edad

Tabla 13

Resistencias a compresión obtenidas a los 28 días de edad (B1, B2 y B3)

NÚMERO DE BANCO	EDAD (días)	TRAZO	PROMEDIO RESISTENCIA (Mpa)
1 (45/55)	28	1:3.5	15,94
2 (45/55)			40,34
2 (70/30)			28,65
3 (45/55)			29,34
1 (45/55)	28	1:5	14,55
2 (45/55)			30,98
2 (70/30)			20,19
3 (45/55)			21,92
1 (45/55)	28	1:6.5	11,33
2 (45/55)			16,28
2 (70/30)			12,21
3 (45/55)			15,73

CONCLUSIONES

- Este estudio ha demostrado que aplicar el método de dosificación experimental IBRACON IPT en hormigones

trabajados con agregados lateríticos provenientes de 3 diferentes bancos de Riberalta (Beni), dio como resultado un proceso práctico, eficaz, con un proceso de elaboración de muestras sencilla y adecuado a las condiciones de diseño que se tenían planteadas inicialmente, lo que resultó como óptimo, este le otorga importancia práctica para su aplicación en proyectos.

- Se logró demostrar que, al variar los trazos de dosificación, las resistencias a compresión presentan cambios considerables, mientras el trazo sea pobre las resistencias serán superiores y viceversa.

- Uno de los hallazgos más importantes encontrados en este estudio es el control que se tuvo con los datos de a/c, combinación de agregados a través de la determinación de la cantidad de mortero seco (α), permitiéndonos tener control sobre los cuerpos de prueba, donde se obtuvieron probetas con una mínima cantidad de cangrejas y sin presencia de fisuras.

- En perspectiva con los materiales convencionales, el material laterítico presentó similares condiciones en la caracterización del agregado, aunque se vio que presenta un mayor porcentaje de absorción (6%-13%), este no fue inconveniente alguno para su aplicación



mediante una dosificación experimental aplicada en laboratorio.

- Este proyecto se llevó a cabo para diseñar y evaluar las propiedades mecánicas del hormigón laterítico utilizando gravas lateríticas de diferentes procedencias, donde se obtuvieron resultados a compresión superiores a los 21 MPa (resistencia mínima para hormigones), en dos bancos, con 40.343 MPa y 28.65 MPa para el banco 2 y 29.337 MPa para el banco 3, debido a la influencia de la combinación granulométrica, superando las expectativas al tratarse de un material arcilloso.

- El estudio actual sólo ha examinado resultados a compresión, se debe investigar más acerca de otras propiedades mecánicas como flexión, tracción, modulo elástico, velocidad de onda en el hormigón laterítico, etc. Actualmente se vienen trabajando en los mismos, se tocarán estos detalles en futuros documentos a realizar.

- Estos resultados están limitados para el uso en hormigones con material laterítico.

- Estos resultados podrían no ser aplicables para los hormigones con agregados pétreos, más sin embargo se puede aplicar el método IBRACON como dosificación con los materiales granulares existentes en los 9 departamentos de

Bolivia, sin presentar problema con el tipo de cemento a usar, ya que este método se ajusta a las condiciones de diseño que se le presenta por regiones.

- Los métodos utilizados permitirán que el material oriental laterítico pueda aplicarse a trabajos de construcción viales o estructurales, ya que se demostró que cumple con los criterios mínimos requeridos para hormigones estructurales según normas ASTM.

- Esta investigación servirá como base para futuros estudios de investigación en Bolivia, buscando siempre ampliar el conocimiento, sin olvidar el correcto aprovechamiento de materiales producidos por los suelos bolivianos a un costo reducido y evitando la contaminación innecesaria por el transporte de materiales interdepartamentales.

BIBLIOGRAFÍA

American Society for Testing and Materials.
(2017). ASTM C127: Standard Test Method for Density, Relative Density (Specific Gravity), and Absorption of Coarse Aggregate. USA.

American Society for Testing and Materials.
(2017). ASTM C128: Standard Test Method for Density, Relative



- Density (Specific Gravity), and Absorption of Fine Aggregate. USA. American Society for Testing and Materials. (2017). ASTM C29: Standard Test Method for Bulk Density ("Unit Weight") and Voids in Aggregate. USA.
- American Society for Testing and Materials. (2018). ASTM C136: Standard Test Method for Sieve Analysis of Fine and Coarse Aggregates. USA.
- American Society for Testing and Materials. (2018). ASTM C39: Standard Test Method for Compressive Strength of Cylindrical Concrete Specimens. USA.
- American Society for Testing and Materials. (2020). ASTM C131: Method for Resistance to Degradation of Small-Size Coarse Aggregate by Abrasion and Impact in the Los Angeles Machine. USA.
- Borges Pompeu Neto, B. (1976). Um estudo sobre as propriedades de resistencia mecanica de .joncreto laterltico. Estado da Paratba - Brasil: Universidade federal da Paralba centro de ciencias e tecnologia - CCT.
- Campos Martins, E. A. (1990). Estudo comparativo entre concretos de cimento portland pozolânico fabricados com agregados graúdos convencionais e não convencionais. Campina Grande - PB: Universidade Federal da Paraiba, centro de Ciencias e Tecnologia.
- Caviedes, J. L. (s.f.). En Tecnología del concreto (págs. 337 - 349).
- Filho, M. B. (2005). Estudo de agregados lateríticos para utilizacao em concretos estruturais. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande Centro de Ciencias e Tecnología.
- Gonçalves Duarte Mendonça, A. M., Costa de Souza, L. M., Coutinho Lira, Y., Ferreira de Sousa Neto, V., Bezerra Luz, T. E., Gonçalves Luz Nunes, C., . . . Lacerda Diniz, M. I. (2021). Uso de agregado lateritico na produção do concreto: avaliação da resistência. Brazilian Journal of Development, 1-11.
- Helene, P., & Terzian, P. (1992). Manual de dosagem e controle do concreto. Sao Paulo: PINI. ISBN: 85-7266-007-0.



Queiroz de Carvalho, J., Martinez, G., & Flores, J. (2005). Chemical and mineralogical properties of residual tropical soils and their relationships with selected geotechnical properties. En Advanced experimental unsaturated soil mechanics (pág. 425). Trento-Italia: Prensa CRC.

Rodrigues Pantoja Junior, A., & de Souza Picanço, M. (2020). Concreto produzido com agregado graúdo laterítico em santarém, Pará. REEC-Revista electronica de engenharia civil, 1-18.

Tutikian, B., & Helene, P. (2011). Dosagem dos concretos de cimento Portland. En Concreto: Ciencia e Tecnología (pág. Capítulo 12). Sao Paulo : IBRACON .

Yoc Juárez, E. (2007). Evaluación de concretos elaborados de acuerdo a los Métodos de diseño “Vitervo O’Reilly y práctica estándar de selección de Proporciones de concreto de masa normal y pesada (aci 211.1)”. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

AGRADECIMIENTOS

Desde lo personal agradecer a Dios por la gracia brindada día a día con mi persona. Al Ing. Durval Párraga Morales por introducirme en el tema de los materiales lateríticos, al Laboratorio de resistencia de materiales – UMSS y especiales agradecimientos al Ing. Boris Camacho Peña por el apoyo incondicional para llevar a cabo esta investigación y a todas las personas que contribuyeron directa e indirectamente en este estudio.

Material renovable electroactivo para la captura y el control de CO₂ a bajas concentraciones



C.24. Ciencias e ingeniería de materiales

Material renovable electroactivo para la captura y el control de CO₂ a bajas concentraciones

Autor: Araoz, María Emilse; mariaemilsearaoz@gmail.com

Profesor/a guía: Avila, Adolfo M.; aavila@herrera.unt.edu.ar

Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

Con el desarrollo de una economía circular, la agroindustria requiere de procesos de separación para la captura del CO₂ liberado en una variedad de efluentes gaseosos (gases de combustión, biogás). Una alternativa de interés es reciclar el CO₂ capturado y dosificarlo en el ambiente interior de invernaderos para mejorar el crecimiento de cultivos. Un proceso de adsorción y desorción puede servir a este propósito siendo necesario el desarrollo de agentes y procesos de separación de manera conjunta.

En el presente trabajo se desarrolló un material híbrido electroactivo de geometría tubular para la captura de CO₂. Este material se fabrica a partir de residuos agrícolas de cosecha y se rellena internamente con zeolita 13X. Se demostró que los tubos conducen la corriente eléctrica (140 – 380 S/m), siendo así electrotérmicos por efecto Joule al aplicar voltaje entre sus extremos. Se realizaron ciclos de adsorción y desorción a temperatura constante entre 25 y 150°C, alimentando con mezclas gaseosas de composiciones 1.0, 4.0 y 14.0% de CO₂/N₂ para determinar la capacidad de adsorción de CO₂. Se estudió el comportamiento del material en ciclos consecutivos de adsorción y desorción por calentamiento directo, alimentando con la mezcla gaseosa de 1.0% de CO₂.

El calentamiento del tubo electroactivo durante la desorción permitió disminuir el tiempo de desorción y obtener una corriente enriquecida en CO₂. La concentración de la fase enriquecida en CO₂ puede variar al manipular los tiempos de adsorción y los caudales de purga. Finalmente, se comprobó una adecuada dinámica en el comportamiento del material durante los ciclos consecutivos, demostrando robustez y confiabilidad para su aplicación en operaciones cíclicas para la captura de CO₂.

Palabras clave: material híbrido electroactivo, captura de CO₂, ciclos de adsorción



- Introducción

El nuevo modelo de economía circular requiere el desarrollo de procesos de separación que permitan la captura de especies gaseosas con impacto en el medio ambiente y que puedan ser recicladas o reutilizadas en otros procesos. En este contexto, el CO₂ representa un inconveniente a nivel industrial al encontrarse presente, por ejemplo, en gases de postcombustión que se emiten a la atmósfera y contribuyen al calentamiento global o como contaminante del biogás producido en biodigestores, evitando su máximo aprovechamiento energético. Una alternativa de interés se enfoca en reutilizar el CO₂ mediante la dosificación en invernaderos para mejorar el rendimiento de los cultivos.

Existe una variedad de fuentes de emisión de CO₂ con diferentes composiciones. Los gases que provienen de la quema de combustibles fósiles poseen concentraciones alrededor del 15% de CO₂ (base seca), mientras que aquellos que provienen de ciclos combinados tienen concentraciones ~4.5%¹ (base seca). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de materiales y procesos que permitan la captura de CO₂ teniendo en cuenta esta variabilidad en composiciones.

- Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Desarrollar un material híbrido de geometría tubular electroactivo para poder ser utilizado en la captura de CO₂ a bajas concentraciones.
2. Evaluar la propiedad del material de conducir la corriente eléctrica y su capacidad electrotérmica por efecto Joule.
3. Evaluar el material en su capacidad de adsorción de CO₂ a diferentes concentraciones y temperaturas.
4. Evaluar el material en ciclos consecutivos de adsorción y desorción por calentamiento directo.

- Materiales y métodos

Se desarrolló un material híbrido de geometría tubular a partir de residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar. Para ello, los residuos de biomasa atravesaron un proceso térmico a alta temperatura, siguiendo el método de preparación descrito en Araoz et al. (2021)². El material carbonoso obtenido finalmente se relleno con zeolita 13X para formar el material híbrido.

Para estudiar el calentamiento por efecto

Joule se utilizó una termocupla tipo K colocada en el interior del tubo. Se utilizó un dispositivo de adquisición de datos para registrar la temperatura a lo largo del tiempo. Los extremos del material fueron conectados a una fuente continua HY300 Mastech para manipular el voltaje aplicado (Figura 1).

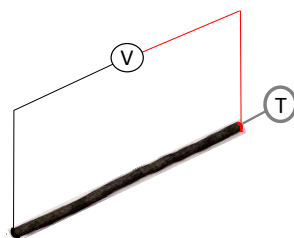


Figura 1. Esquema del tubo de biocarbón relleno con zeolita 13X conectado a la fuente continua con la termocupla en su interior.

La Figura 2 muestra el módulo de medición donde se llevaron a cabo los ciclos de adsorción y desorción. El mismo consta de dos cilindros de gas, uno con N₂ puro y otro con una mezcla al 14% de CO₂ en N₂, sus correspondientes controladores de flujo, la columna principal, un sensor de CO₂ para monitorear la composición a la salida de la columna a lo largo del tiempo y un caudalímetro de burbuja para medir el caudal.

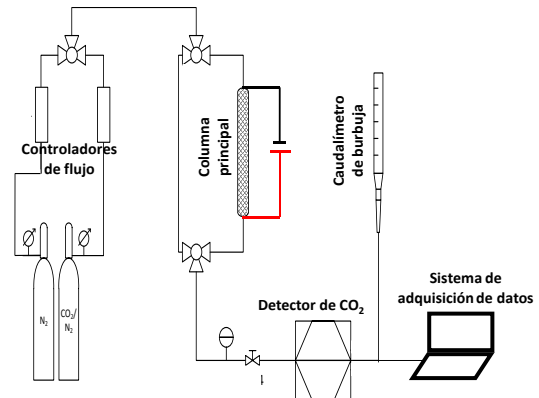


Figura 2. Módulo de medición para la evaluación del material desarrollado.

- Ciclos de adsorción y desorción de CO₂ a temperatura constante

Para estudiar la capacidad de adsorción del material se llevaron a cabo ciclos de adsorción y desorción a temperatura constante en un rango de 25 a 150°C y a concentraciones de 1.0, 4.0 y 14.0% de CO₂ en N₂. Las concentraciones de CO₂ del 1.0 y 4.0% se lograron diluyendo el gas proveniente del cilindro de mezcla con N₂ puro. La temperatura del material durante los diferentes ciclos se controló mediante la manipulación del voltaje aplicado entre sus extremos.

El ciclo comienza con la estabilización del sistema con N₂. Cuando la señal del sensor es constante, se hace circular la mezcla de CO₂/N₂ durante 15 minutos. Durante este tiempo, el material adsorbe CO₂ aproximándose a su equilibrio. La concentración de CO₂ a la salida de la columna aumenta rápidamente hasta

alcanzar el valor de concentración de alimentación. En este momento el material se encuentra en equilibrio y finaliza este proceso. Comienza luego la desorción, purgando el CO₂ adsorbido con N₂ puro. La señal del sensor disminuye retornando al valor inicial de estabilización con N₂, dando por finalizado el ciclo.

- Cálculo de la capacidad de adsorción de CO₂

El cálculo de la capacidad de adsorción se realiza mediante un balance de CO₂ en el proceso de desorción (Ecuación 1)³.

$$\int_{t_0}^{t_{\infty}} (F_{CO_2 out}) dt = q_{CO_2}^* \cdot \rho_b \cdot V_b + C_{CO_2} \cdot (V_b \cdot \varepsilon_b + V) \quad (1)$$

Siendo:

$F_{CO_2 out}$: flujo de CO₂ que sale de la columna (mol/s).

$q_{CO_2}^*$: capacidad de adsorción de CO₂ del material (mol/kg).

ρ_b : densidad del lecho (kg/m³).

V_b : volumen del lecho (m³).

C_{CO_2} : concentración de CO₂ en la fase gaseosa (mol/m³).

ε_b : porosidad del lecho (-).

V : volumen de la columna (m³).

- Ciclos de adsorción y desorción por calentamiento directo de CO₂

Se llevaron a cabo ciclos de adsorción y desorción por calentamiento directo de

CO₂ con concentración al 1.0%. Se estabilizó el sistema con N₂ puro y se realizó el proceso de adsorción como se describió anteriormente. Durante el proceso de desorción se cerró la alimentación de la columna, se aplicó una diferencia de potencial de 7.0 V entre los extremos del material hasta que el mismo alcanzó los 185°C. Se cortó el voltaje aplicado y se hizo circular N₂ nuevamente a diferentes caudales (10, 30 y 50 mL/min) para finalizar el ciclo.

- Ciclos consecutivos de adsorción y desorción de CO₂ por calentamiento directo

Se realizaron ciclos consecutivos de adsorción y desorción de CO₂ por calentamiento con gas al 1.0% de CO₂ en N₂. Se llevaron a cabo experimentos purgando con N₂ y con mezcla CO₂/N₂, y variando el tiempo de adsorción para estudiar la dinámica del comportamiento cíclico del material.

- Resultados y discusión

Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos al estudiar la capacidad electrotérmica por efecto Joule. En la Figura 3 se grafica la variación de la temperatura del material tubular en función del potencial aplicado y en la Figura 4 se observa la temperatura alcanzada por el

tubo en función del tiempo y a diferentes voltajes aplicados entre sus extremos.

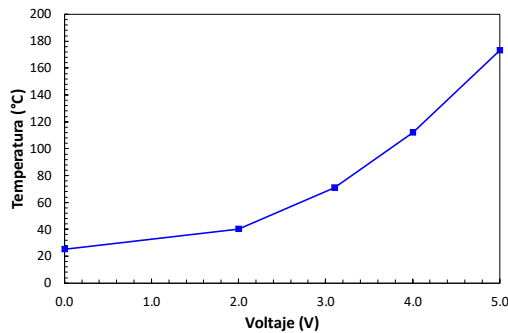


Figura 3. Temperatura alcanzada por el material tubular a diferentes voltajes aplicados.

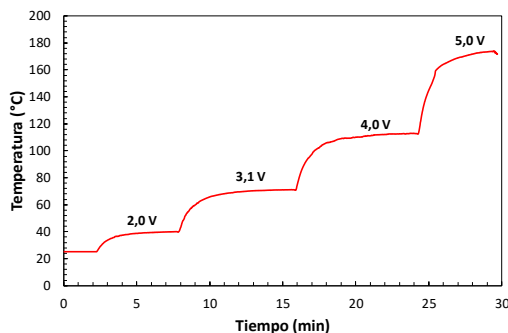


Figura 4. Temperatura del material tubular a lo largo del tiempo a diferentes voltajes aplicados.

Como puede observarse, a medida que aumenta el voltaje aplicado, el tubo relleno con zeolita incrementa su temperatura al calentarse mediante el efecto Joule. Además, es posible mantener y regular la temperatura a lo largo del tiempo mediante la manipulación del voltaje aplicado.

En la Figura 5 se observa la dinámica de la composición a la salida de la columna a lo largo del tiempo para el proceso de

desorción de la mezcla al 4.0% de CO₂ en N₂ a diferentes temperaturas. A medida que aumenta la temperatura, la capacidad de adsorción disminuye, por lo que el sistema llega al punto inicial de referencia mucho más rápido que a temperatura ambiente.

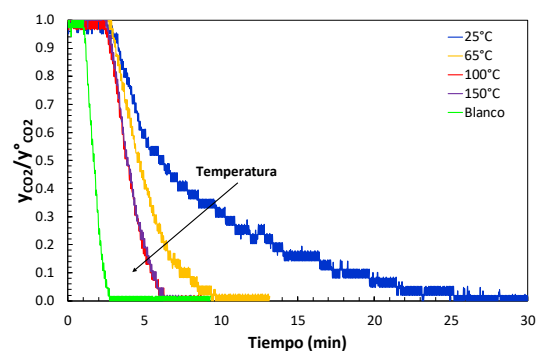


Figura 5. Desorción de CO₂ a diferentes temperaturas. Alimentación: mezcla 4.0% de CO₂ en N₂ (y_{CO_2} : composición a la salida de la columna; $y^{o}_{CO_2}$: composición de alimentación = 0.04).

A partir de resultados similares obtenidos para las mezclas al 1.0 y al 14.0% de CO₂ en N₂ se calcularon las capacidades de adsorción de CO₂ a diferentes temperaturas. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. Se verificó entonces que la capacidad de adsorción de CO₂ es mayor a menores temperaturas y a mayores concentraciones del gas de alimentación.

Tabla 1. Capacidad de adsorción de CO₂ para las mezclas 14.0, 4.0 y 1.0% de CO₂ en N₂

	14.0%	4.0%	1.0%
T (°C)	q*CO ₂ (mol/kg)	q*CO ₂ (mol/kg)	q*CO ₂ (mol/kg)
25	0.702	0.230	0.054
65	0.572	0.087	0.032
100	0.439	0.057	0.018
150	0.353	0.053	0.014

En la Figura 6 se muestra el proceso de desorción de CO₂ con calentamiento directo de la mezcla al 1.0% de CO₂ en N₂ a diferentes caudales de desorción: 10, 30 y 50 mL/min.

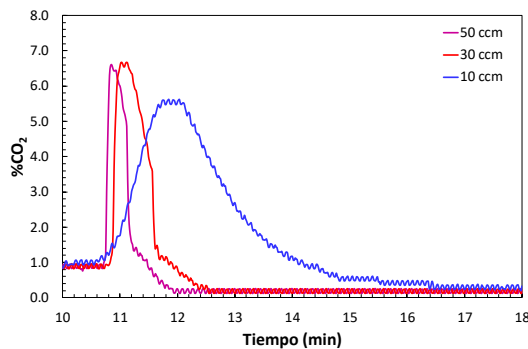


Figura 6. Desorción de CO₂ con calentamiento directo a diferentes caudales de desorción. Alimentación: 1.0% de CO₂ en N₂

Los picos que se observan en la concentración de CO₂ demuestran que el calentamiento directo del material permite

obtener una fase enriquecida en CO₂. El tiempo de desorción depende del caudal de purga, siendo mucho menor a mayores caudales. Por otro lado, al comparar el tiempo de desorción en este proceso con calentamiento directo respecto al realizado a temperatura ambiente (Figura 5), se puede observar una reducción significativa. El tiempo de desorción disminuye desde ~25 min a temperatura ambiente hasta ~2 min a alta temperatura con un caudal de purga de 50 mL/min.

Finalmente, en las Figuras 7 y 8 pueden observarse ciclos consecutivos de adsorción y desorción con calentamiento directo de CO₂ para la mezcla 1.0% de CO₂ en N₂. En la Figura 7 se realizó la purga con N₂ puro a un caudal de 50 mL/min. En la Figura 8 la columna se purgó con mezcla a un caudal de 110 mL/min.

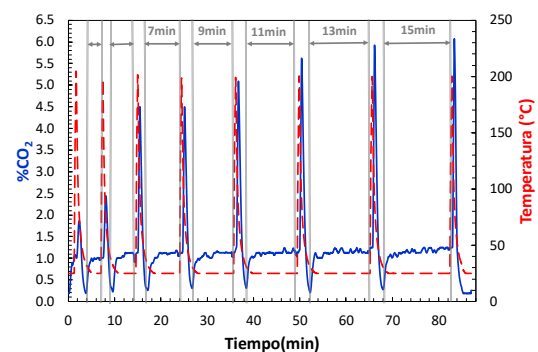


Figura 7. Ciclos consecutivos de adsorción y desorción con calentamiento directo. Alimentación: 1.0% CO₂/N₂, 110 mL/min. Purga: N₂ puro, 50 mL/min.

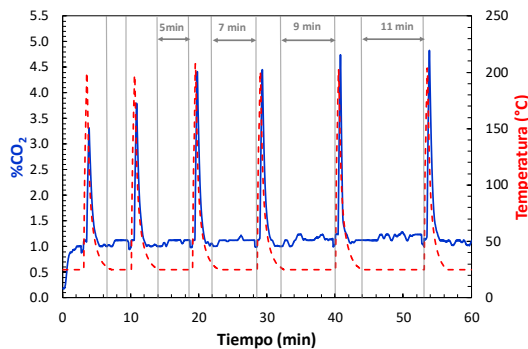


Figura 8. Ciclos consecutivos de adsorción y desorción con calentamiento directo. Alimentación: 1.0% CO₂/N₂, 110 mL/min. Purga: 1.0% CO₂/N₂, 110 mL/min.

Se demostró entonces que el material es capaz de resistir varios ciclos consecutivos de adsorción y desorción de CO₂ por calentamiento directo. Es posible obtener una corriente enriquecida en CO₂ como consecuencia del calentamiento directo del tubo. La concentración de CO₂ de la fase enriquecida varía en función al tiempo en el que se lleva a cabo el proceso de adsorción, siendo entonces una variable a tener en cuenta a la hora de optimizar este tipo de ciclos.

En base a lo observado como ser, el rápido calentamiento del material desarrollado, la posibilidad de controlar su temperatura mediante el voltaje aplicado, su capacidad de adsorción de CO₂, la rápida liberación de CO₂ por calentamiento directo y su comportamiento en procesos cíclicos, demuestran que este material híbrido electroactivo es altamente recomendable

para su utilización en el control de la concentración de CO₂ en el ambiente de invernaderos.

- Conclusiones

Se desarrolló un material híbrido a partir de residuos de cosecha de caña de azúcar y zeolita 13X. Se comprobó que el tubo tiene propiedades eléctricas que permiten su calentamiento por efecto Joule. Es posible además mantener una temperatura constante a lo largo del tiempo y controlarla mediante la manipulación del voltaje aplicado entre los extremos del tubo. Se calcularon las capacidades de adsorción de CO₂ a diferentes temperaturas y composiciones, alcanzando un valor de 0.77 mol/kg para la mezcla del 14.0% de CO₂ en N₂ y a temperatura ambiente. Es posible regenerar el material de manera rápida y obtener una corriente enriquecida de CO₂ mediante el proceso de desorción por calentamiento directo. Es posible controlar la concentración de CO₂ manipulando los caudales de desorción y los tiempos de adsorción. Finalmente, se observó una excelente dinámica de la composición y de la temperatura a lo largo del tiempo en los ciclos consecutivos de adsorción y desorción por calentamiento directo. Por lo tanto, el material demostró ser robusto y versátil para ser utilizado en



operaciones cíclicas para la captura de CO_2 que tengan como objetivo el control de la concentración de CO_2 en los ambientes de invernaderos.

- Bibliografía

1. Siegelman, R. L., Milner, P. J., Kim, E. J., Weston, S. C., & Long, J. R. (2019). Challenges and opportunities for adsorption-based CO_2 capture from natural gas combined cycle emissions. *Energy & environmental science*, 12(7), 2161-2173.

2. Araoz, M. E., Marcial, A. F., Trejo Gonzalez, J. A., & Avila, A. M. (2021). Renewable and Electroactive Biomass-Derived Tubes for CO_2 Capture in Agroindustrial Processes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(23), 7759-7768.

3. Wilkins, N. S., & Rajendran, A. (2019). Measurement of competitive CO_2 and N_2 adsorption on Zeolite 13X for post-combustion CO_2 capture. *Adsorption*, 25(2), 115-133.

Nanoarquitetura a base de WO₃/BiVO₄ para produção de hidrogênio verde

C.24. Ciência e Engenharia de Materiais

Nanoarquitetura a base de $WO_3/BiVO_4$ para produção de hidrogênio verde

Autor: Gaudencio, João P. R. S.; joaopedro.gaudencio@gmail.com

Professor/a: Mascaro, Lucia H.; Imascaro@ufscar.br

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Resumo

A democratização de fontes energéticas sustentáveis é uma questão de sobrevivência. Uma alternativa promissora é o uso do sol na decomposição fotocatalítica da H_2O para produção de H_2 verde, conhecida como *water splitting*. Atualmente, essa tarefa enfrenta um desafio, a baixa eficiência de conversão de energia solar em H_2 (STH). Á vista disso, esse trabalho tem como objetivo produzir heterojunções nanoarquitetadas a base de *nanorods* de WO_3 e $BiVO_4$ (WO_3 -nr/ $BiVO_4$) capazes de reduzir a recombinação de cargas, potencializando a STH. Para isso, os eletrodos foram preparados em 6 etapas: (i) deposição *spray* da *seed layer* de WO_3 , (ii) síntese de WO_3 -nr a partir de reação hidrotermal; (iii) eletrodeposição pulsada de Bi sobre WO_3 -nr; (iv) conversão de Bi a $BiVO_4$; (v) dissolução do excesso de V_2O_5 ; (vi) fotoeletrodeposição (FED) de catalisadores de evolução de O_2 (CEO) a base de fosfatos metálicos de Ni, Co e Fe sobre WO_3 -nr/ $BiVO_4$. A produção de H_2 foi avaliada a partir de medidas fotoeletroquímicas em tampão fosfato pH 7 + 0,5 mol L^{-1} Na_2SO_4 sob radiação solar simulada. A configuração WO_3 -nr/ $BiVO_4$ exibiu fotocorrente (j_{pc}) de $1,40 \pm 0,12$ mA cm^{-2} (1,23 V vs RHE), 35% maior que os filmes *flat* ($1,04 \pm 0,15$ mA cm^{-2}), efeito típico do aumento da área ativa e da absorção de luz promovido pela formação de nanoestruturas, comprovada por microscopia. Após a FED dos CEO's, a j_{pc} aumentou 28, 47 e 61% para o FePi, NiPi e CoPi, respectivamente. Portanto, as técnicas de baixo custo usadas permitiram otimizar a separação de cargas, mostrando-se promissoras na produção eficaz e escalável de H_2 verde.

Palavras-chave: nanoarquitetura, fotoeletrodecomposição, hidrogênio.

Introdução

A conversão de energia solar em energia útil, de forma direta, pode ser obtida de duas formas, pela conversão de

luz em eletricidade com células fotovoltaicas ou pela conversão de luz em energia química útil como a decomposição da água em H_2 e O_2 (Kamat, 2007; Razikov



et al., 2011; McKone, Lewis & Gray, 2014). Essa conversão em combustível solar, tal como H_2 , é amplamente conhecida como *water splitting* e tem ganhado destaque nos últimos anos devido a obtenção de novos materiais semicondutores. Isso porque o sistema de fotólise da água apresenta-se como um dos mais interessantes processos renováveis e sustentáveis de conversão energética, visto que após a combustão de O_2 e H_2 , o produto de reação é H_2O . Assim as moléculas de H_2O decompostas no início são reformadas no final do processo.

Nesse sentido, a busca por novos semicondutores constituídos de elementos abundantes, bem como o interesse em designers de dispositivos com filmes semicondutores ultrafinos e recobrimentos antirreflexivos se torna interessante (Walter et al., 2010; Nozik, 1978; Brillet et al., 2010). Além disso, células fotoeletroquímicas desenhadas para a decomposição da água necessitam de materiais semicondutores que apresentem alta taxa de transferência de carga na interface semiconductor/eletrólito, elevada estabilidade por longos períodos e que possam absorver eficientemente uma ampla faixa do espectro visível de emissão solar (responsável por 43% da radiação solar incidente) (Walter et al., 2010; Luo et al., 2010). Portanto, como mencionado por

McKone et al. (2014), a pesquisa fundamental a respeito desses dispositivos ainda tem muitos desafios até a produção de protótipos confiáveis.

O $BiVO_4$ destaca-se por apresentar características de *band gap* de 2,4 eV (Z. Li, Luo, Zhang, Feng & Zou, 2013) com absorção de luz no espectro visível de radiação solar e níveis de energia das bandas de valência e de condução muito interessantes para uso como fotoanodo. Ainda assim, a eficiência de conversão de fótons incidentes em corrente é baixa devido à ocorrência de recombinação das cargas fotogeradas. Portanto, a utilização desse semiconductor tem se difundido graças as suas características intrínsecas, as quais o torna alvo de estudo de maximização de eficiência para produção de dispositivos a valores economicamente interessantes.

O $BiVO_4$ é um semiconductor do tipo-n de coloração amarela e apresenta três formas cristalinas, sheelita monoclinica, sheelita tetragonal e zirconita tetragonal, em que a primeira apresenta maior atividade fotoquímica e um *band gap* de 2,4 eV (Li et al., 2013). Seu uso como fotocalisador para decomposição da água se deve ao nível de energia da banda de valência desse material ser próxima ao potencial para formação de O_2 . Além disso, o limite da banda de condução e potencial

de banda plana observados para o BiVO_4 são mais negativos do que outros semicondutores com *band gap* menor que 2,6 eV e se localizam abaixo do nível termodinâmico para H_2 . Isso faz com que a oxidação da água com BiVO_4 necessite de apenas uma pequena polarização do semicondutor. Ainda, uma das principais vantagens associadas ao uso desse material como fotoanodo é a possibilidade de trabalhar em meios neutros, o que diminui a fotocorrosão do fotoeletrodo (Seabold & K.-S. Choi, 2012; Silva et al., 2012). Entretanto, o BiVO_4 puro apresenta baixa eficiência da conversão de fótons incidentes em corrente (IPCE) sem aplicação de sobrepotenciais elevados para manter a reação de decomposição da água, inviabilizando sua aplicação em sistemas fotoeletroquímicos. A principal razão do baixo IPCE está relacionada com a elevada recombinação de pares elétron-buracos, a fotocorrosão e a baixa condutividade elétrica do óxido (S. K. Choi, W. Choi & H. Park, 2013; Jeong, Jeon, J. S. Jang, W. Choi & H. Park, 2013). Por essas e razões, atualmente as principais abordagens envolvendo BiVO_4 consistem em sua dopagem com diferentes elementos, formação de heterojunções, deposição superficial de catalisadores de evolução de O_2 , bem como emprego da nanotexturização.

A recombinação de pares elétron-buracos pode ocorrer na interface semicondutor/eletrólito ou no interior do semicondutor (recombinação em *bulk*). De qualquer forma, esse processo faz com que as cargas fotogeradas se recombinem, cancelando o fluxo da carga. Logo, minimizar esse efeito é de longe um dos maiores problemas na síntese de materiais fotoeletroquímicos. Entretanto, a recombinação na interface e em *bulk* são processos distintos e podem ser tratados separadamente. A recombinação em *bulk* pode ser minimizada aumentando a qualidade do material depositado, portanto, diminuindo contornos de grãos e defeitos cristalinos (Chartier, Ba, Ebothe, Vante & Cong, 1982). Isso também pode ocasionar a diminuição do efeito catalítico do material, uma vez que muitas vezes os centros catalíticos são justamente os defeitos na superfície do material sintetizado (Gerischer, 1969). Já a recombinação na interface semicondutor/eletrólito pode ser minimizada reduzindo a passivação da superfície do material, melhorando a cinética de transferência de cargas ou introduzindo catalisadores superficiais. De todas as formas o processo de transferência eletrônica entre o semicondutor e o reagente em solução será mais rápido, diminuindo a



probabilidade de recombinação das cargas fotogeradas (Zhou et al., 2012)

Nesse sentido, a formação de heterojunções consiste em alternativa para aumentar o IPCE dos materiais empregados como fotoanodos. Para isso, depositam-se dois semicondutores com *band gap* e níveis de energia de banda de condução e de valência distintos (por exemplo, $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$) (Jeong et al., 2013)). Isso ocasiona a formação de uma barreira de Schottky entre os semicondutores devido à descontinuidade dos limites de banda entre ambos (Langer & Heinrich, 1985). Essa descontinuidade força uma espécie de alinhamento das bandas entre eles. Por conseguinte, durante o transporte de cargas esse alinhamento gera uma cascata de transferência de carga entre as bandas dos semicondutores, maximizando o transporte de cargas até seus coletores e minimizando a recombinação elétron-buraco (Tersoff, 1984).

Por outro lado, o emprego de catalisadores superficiais de desprendimento de O_2 sobre o semicondutor aumenta a velocidade de transferência dos elétrons do eletrólito (água) para o semicondutor, minimizando a recombinação de elétrons-buracos na interface semicondutor/eletrólito. Isso ocorre porque mesmo se a diferença de energia entre a banda de valência e o

potencial de desprendimento de O_2 for suficiente, a transferência de múltiplas cargas na interface é limitada. Com o uso de catalisadores de desprendimento de O_2 essa barreira cinética pode ser superada o que aumenta a eficiência fotoeletroquímica do semicondutor (S. K. Choi et al., 2013; Jeong et al., 2013). Mesmo assim, catalisadores de desprendimento de oxigênio, precisam ser baratos e abundantes, uma vez que é requerido o recobrimento de grandes áreas para produção de quantidades úteis de combustível solar (H_2) em uma escala de tempo aceitável.

O efeito da deposição de catalisadores de desprendimento de O_2 a base de fosfatos metálicos são reconhecidamente eficientes e elevam significativamente o desempenho dos fotoanodos de BiVO_4 . Em um de seus trabalhos Abdi, Firet e Krol (2013) reportaram alcançar um aumento de aproximadamente 35% na fotocorrente (1,7 e 2,3 mA cm^{-2} na ausência e presença do catalisador, respectivamente) a partir da deposição de uma camada de fosfato de cobalto (CoPi). O mesmo efeito (aumento da fotocorrente) é observado em todos os trabalhos que utilizam a deposição de catalisadores de desprendimento de O_2 sobre fotoanodos a base de BiVO_4 (Berglund, Rettie, Hoang & Mullins, 2012;

S. K. Choi et al., 2013; Seabold & K.-S. Choi, 2012; Zhou et al., 2012). A estrutura desse catalisador tem sido postulada como oxo-complexo de Co(III)/Co(IV) hidratado com atuação direta dos centros metálicos no mecanismo de transferência de carga do semicondutor para moléculas de água. Isso se deve a presença de múltiplos estados de oxidação do Co no oxo-complexo, o que faz com que seja produzido O_2 e prótons na reação (Roger & Symes, 2016).

Além disso, são dignos de notas ainda os dispositivos *water splitting* que utilizam estratégias baseadas na

nanotexturização, isto é, na formação de nanoestruturas capazes de maximizar a área fotoativa e elevar a absorção de luz incidente (J.-H. Kim, D. H. Kim, Yoon, Dai & J.-H. Lee, 2019). Dentre os inúmeros trabalhos reportados na literatura destacam-se os desenvolvidos por Pihosh et al. (2015); Yang e Wu (2017), M. G. Lee et al. (2016) e J.-H. Kim et al. (2019), os quais alcançaram a deposição de matrizes a base de nano dendritos e nano bastões. A Tabela 1 sumariza os principais resultados obtidos em cada trabalho citado evidenciando as expressivas densidades de corrente apresentadas.

Tabela 1. Estratégias de texturização

Autores	Eletrodo	Performance	Eletrólito	Nanoestrutura
Pihosh et al. (2015)	$WO_3/BiVO_4/CoPi$	6,72	Tampão fosfato (K_3PO_4) – pH 7,0	Bastões
Yang e Wu (2017)	$Co-Pi/BiVO_4/ZnO$	3,50	0,3 M Na_2SO_4 – pH 7,5	Dendritos
M. G. Lee et al. (2016)	$WO_3/BiVO_4$	4,55	(0,1 M K_3PO_4 + 0,2 M Na_2SO_3) – pH 7,2	Bastões
J.-H. Kim et al. (2019)	$WO_3/BiVO_4$	3,87	(0,5 M K_3PO_4 + 1,0 M Na_2SO_3) – pH 7,3	Bastões

Fonte: Adaptado de Pihosh et al. (2015); Yang e Wu (2017); M. G. Lee et al. (2016); J.-H. Kim et al. (2019)

Como demonstrado anteriormente, avanços significativos têm-se concretizado no uso de fotoanodos a base $BiVO_4$ para

aplicação em sistemas fotoeletroquímicos de decomposição da água. Entretanto, há ainda muito que ser feito para alcançar um

dispositivo com eficiência satisfatória e muitos outros materiais podem e devem ser testados para alcançar esse objetivo. Por isso, o objetivo geral deste projeto é produzir um fotoanodo com heterojunção nano estruturada de $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$ e posterior deposição de catalisador de desprendimento de oxigênio, CoPi para aplicação em *water splitting*.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal estudar a produção, a partir de técnicas de deposição de baixo custo (*spray*, eletrodeposição, tratamento térmico, entre outros), de heterojunções nanoarquitetadas a base de *nanorods* (nano bastões) de WO_3 e BiVO_4 ($\text{WO}_3\text{-nr}/\text{BiVO}_4$) recobertas por catalisadores oxi-hidróxidos fosfatos metálicos abundantes (ferro, níquel e cobalto) capazes de reduzir a recombinação de cargas (*bulk* e interfacial), potencializando assim a eficiência de conversão de energia solar em hidrogênio

Materiais e Métodos

A produção do filme de WO_3 nanoarquitetado com bastões, fundamentou-se na metodologia proposta por J.-H. Kim et al. (2019) com alterações:

1. A *seed layer* de WO_3 foi depositada sobre substrato de vidro recoberto com

óxido de estanho dopado com flúor (FTO – do inglês *fluorine-doped tin oxide coated glass*, resistividade $\approx 8 \Omega \text{ cm}^{-2}$, 3 mm de espessura com uma camada de FTO com $\approx 545 \text{ nm}$ de espessura, TEC 8®). A deposição foi efetuada empregando a técnica de deposição por *spray* usando um aerógrafo (BC 61-03, Forusi®) com vazão de ar de 10 L min^{-1} e vazão de solução de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. O tempo de *spray* foi de 1 segundo enquanto o FTO era mantido a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução precursora empregada foi $(\text{NH}_4)_{10}\text{H}_2(\text{W}_2\text{O}_7)_6$ $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido em uma mistura de etilenoglicol: H_2O 1:1 (V:V). Um intervalo de tempo de 1 m foi mantido entre cada deposição por *spray* e após 40 repetições o substrato era tratado termicamente a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ por 180 minutos.

2. A síntese hidrotermal foi realizada introduzindo o substrato com a *seed layer* depositada em um reator hidrotermal com a face contendo o filme de WO_3 voltada para baixo. Logo após, inseriu-se a solução precursora composta por 0,0693g de $(\text{NH}_4)_{10}\text{H}_2(\text{W}_2\text{O}_7)_6$ dissolvido em 28,5 mL de H_2O deionizada, 3 mL de HCl (concentrado – 37%) e 1 mL de H_2O_2 (concentrado – 30%). Vale ressaltar ainda que, embora a solução inserida não tenha alcançado nem metade do frasco (visto que o reator hidrotermal possuía um volume de 100 mL) é fundamental que o FTO/ WO_3 -seed

permaneça completamente “mergulhado” no líquido. O reator foi fechado e inserido em uma estufa ou forno a 180°C por 24h. Decorrido o tempo de síntese o reator foi resfriado e os eletrodos foram submetidos a um tratamento térmico a 550°C por 120 min

3. A camada de Bi metálico foi eletrodepositada sobre o filme de WO₃ previamente produzido empregando um eletrólito recém preparado e composto por Bi(NO₃)₃ 0,02 mol L⁻¹ + NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹ dissolvidos em poli(etilenoglicol) 300. A eletrodeposição de Bi foi realizada em temperatura ambiente, sob agitação magnética e consistiu na repetição de 50 ciclos de: aplicação de -1,85 V vs. Ag/AgCl/KCl saturado (Ag/AgCl), seguido por um período de relaxamento de 10 s a cada pulso, no qual manteve-se o sistema em Eca (potencial de circuito aberto). Vale ressaltar também que cada pulso de eletrodeposição foi limitado a alcançar uma carga de 0,002 mC cm⁻². Esse processo foi feito em uma célula de 3 eletrodos, em que FTO/WO₃, folha de platina e Ag/AgCl foram os eletrodos de trabalho, contra e referência, respectivamente.

4. O filme de Bi foi convertido a BiVO₄ gotejando 50 µL de uma solução de NH₄VO₃ 0,2 mol L⁻¹ e tratando termicamente por 60 min a 500°C, com

uma taxa de aquecimento e resfriamento de 2 °C min⁻¹.

5. O excesso de V₂O₃ foi dissolvido a partir da imersão do filme em uma solução alcalina de NaOH 1,0 mol L⁻¹ durante 5 min e mantida sob agitação, ao final da qual os eletrodos foram cuidadosamente enxaguados com água.

6. A FED dos CEO's a base de oxihidróxidos fosfatos de cobalto, níquel e ferro sobre o filme WO₃-nr/BiVO₄ foi feita usando uma célula de três eletrodos similar a utilizada para a eletrodeposição de Bi. Contudo, aqui, o eletrodo de trabalho foi a heterojunção. A FED foi realizada em uma solução de Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹ pH 7 (ajustado com H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹) contendo 0,5 mmol L⁻¹ de Mx(NO₃)_y (M = Ni, Co ou Fe). O potencial de deposição foi definido a partir de experimentos de voltametria cíclica. Semelhantemente a deposição de Bi metálico, os pulsos de eletrodeposição foram limitados a uma carga de 2,0 mC cm⁻² pulso⁻¹, havendo um tempo de relaxamento de 10 s a cada pulso, no qual manteve-se o sistema em Eca. Visando a aplicação dos fotoanodos na decomposição da água, o número de ciclos de FED, bem como as condições de iluminação empregadas seguiram o procedimento otimizado reportado por Coelho, Gaudêncio e Mascaro (2022) e estão sumarizadas na Tabela 2

Tabela 2. Parâmetros de FED dos CEO's

Cocatalisador	Número de ciclos	Condição de Iluminação
FePi	50	Sob Iluminação
NiPi	25	Sob Iluminação
CoPi	5	Sob Iluminação

Fonte: Adaptado de Coelho et al. (2022)

A heterojunção *flat*, por sua vez, seguiu o procedimento descrito por Coelho et al. (2020), enquanto as caracterizações fotoeletroquímicas foram desenvolvidas em uma célula de três eletrodos, em que os fotoanodos, a folha de platina e Ag/AgCl foram os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. Foi usado também um potenciostato/galvanostato PGSTAT302N – Methrom Autolab BV (Utrecht, Holanda). A fonte de luz foi um simulador solar LCS-100 (com lâmpada de Xenônio de 100 W e filtro AM 1,5G, a irradiância estabelecida foi de 100 mW cm⁻² – modelo 94011A-ES, Newport®, Irvine, USA). O eletrólito foi uma solução de Na₂HPO₄ 0,1 mol L⁻¹ + Na₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ pH 7. Todas as medidas foram realizadas e temperatura ambiente. Além do mais, a área geométrica do fotoanodo exposta ao eletrólito foi de aproximadamente 1,0 cm². Por fim, o potencial do eletrodo Ag/AgCl foi convertido a ERH a partir da equação de Nernst (Equação 1):

$$E_{ERH} = E_{Ag/AgCl} + E^{\circ}_{Ag/AgCl} + (0,059 \times \text{pH})$$

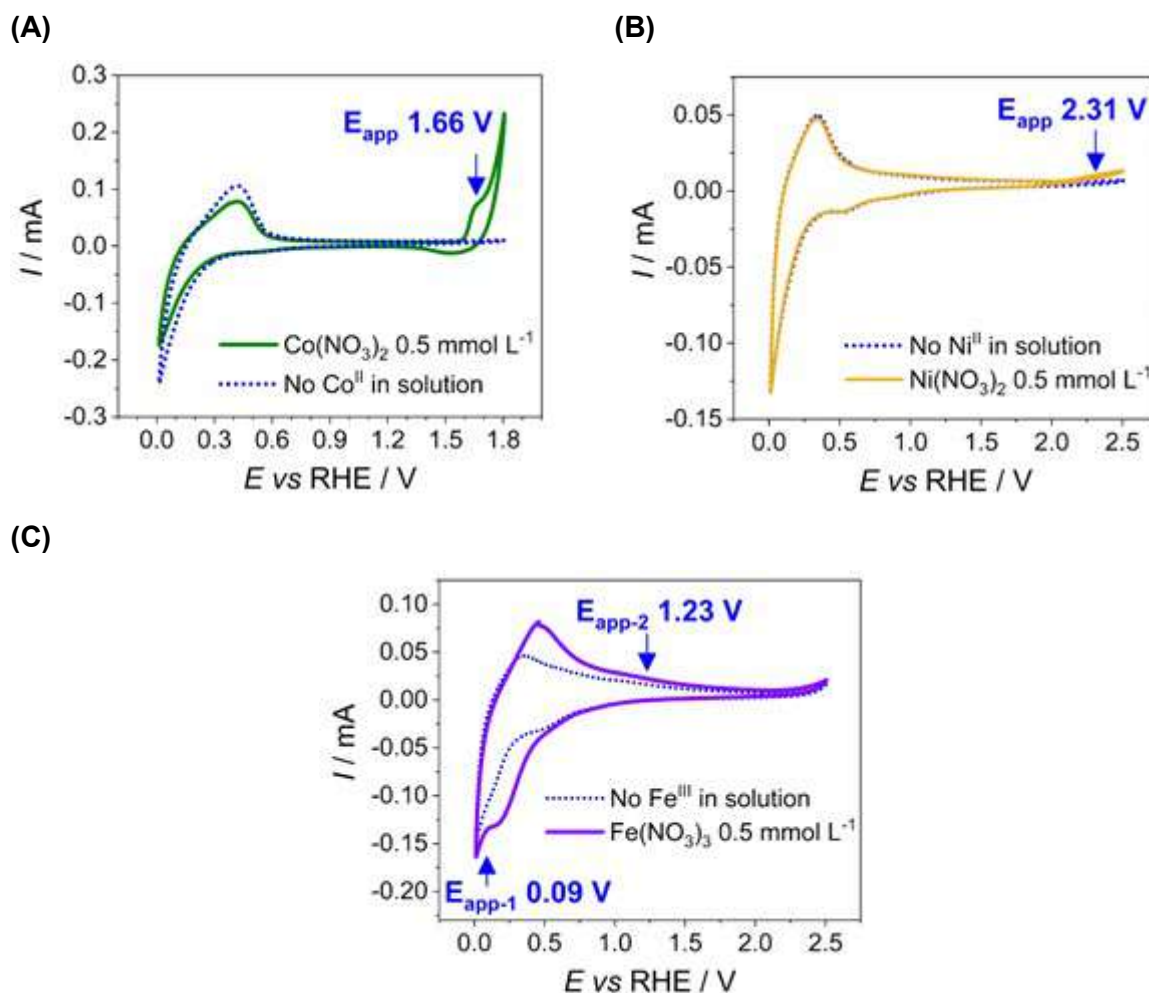
(Equação 1)

em que E_{ERH} é o potencial vs. ERH, $E^{\circ}_{Ag/AgCl}$ é 0,197 V a 25°C, $E_{Ag/AgCl}$ é o potencial vs Ag/AgCl medido e pH é 7.

Resultados e discussões

A fim compreender o comportamento da deposição dos catalisadores propostos sobre a heteroestrutura WO₃/BiVO₄, primeiro, analisou-se os perfis voltamétricos de cada um dos CEO's. A Figura 1 apresenta o comportamento da heterojunção antes e depois da adição dos íons metálicos Co^{II}, Ni^{II}, ou Fe^{III} ao eletrólito para determinar o potencial de deposição a ser utilizado para a FED. Como evidencia a Figura 1A, na presença de Co^{II} em solução, um processo oxidativo é observado iniciando em aproximadamente 1,56V vs. ERH, o qual alcança o máximo em 1,66 vs. ERH. Além do mais, notou-se também que a oxidação da água está associada a oxidação do Co^{II}, o que é observado apenas na presença do íon metálico em uma solução contendo íons fosfatos. Isso se deve ao efeito catalítico do CoPi para essa reação (Kanan & Nocera, 2008).

Figura 1. Voltametria cíclica a 50 mV s^{-1} para $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$ em Na_2HPO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo: (A) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, (B) $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, e (C) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.



Fonte: Adaptado de Coelho et al. (2022)]

Semelhantemente, o perfil voltamétrico do Ni^{II} é apresentado na Figura 1B, na qual é possível observar um processo oxidativo em aproximadamente $2,31 \text{ V}$ vs. ERH. Dessa forma, em potenciais próximos a $1,66$ e $2,31 \text{ V}$ vs. ERH, há a oxidação das espécies metálicas Co^{II} a Co^{III} e Ni^{II} a Ni^{III} , bem como a formação *in situ* dos catalisadores CoPi e NiPi , respectivamente (Coelho et al., 2022).

A denominação MPi ($\text{M} = \text{metal}$) se deve ao composto não estequiométrico produzido *in situ* a partir do uso dessa metodologia. Como foi demonstrado por Kanan e Nocera (2008) a eletrodeposição de Co^{II} resulta em um composto amorfo contendo uma mistura de óxido ou hidróxido de Co e o ânion fosfato. Nesse sentido, acredita-se que a FED *in situ* do Ni^{II} ocorre de maneira similar, visto que o produto de solubilidade

do $\text{Ni}_3(\text{PO}_4)_2$ é cerca de $4,7 \times 10^{-32}$ e $\text{Ni}(\text{OH})_2$ é $4,7 \times 10^{-16}$. Logo, a deposição simultânea de óxido de Ni e fosfato é plausível, como demonstrado pela FED de CoPi (Coelho et al., 2022). Portanto, tal como reportado por Coelho, os potenciais de 1,66 e 2,31 V vs. RHE foram definidos para a eletrodeposição de CoPi e NiPi, respectivamente.

Curiosamente, o perfil voltamétrico da heterojunção $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$ na solução contendo Fe^{III} indica a presença de um único processo redox relativo ao par $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ (Fig. 1C), o qual é observado pelo pico presente na varredura de potencial negativo próximo de 0,20 V vs. ERH. Vale ressaltar que nesse mesmo intervalo de potencial nota-se também a oxidação do par $\text{V}^{\text{IV}}/\text{V}^{\text{V}}$ (Mascaro et al., 2014). Assim, para promover a FED do FePi se fez necessário a aplicação de dois pulsos consecutivos, o primeiro em 0,09V vs. ERH e o segundo em 1,23 V vs. ERH, uma vez que o precursor de ferro consistia em íons Fe^{III} . A hipótese para a deposição do CEO a base de Fe, fundamenta-se na redução do Fe^{III} sobre a superfície do fotoanodo e posterior oxidação *in situ* provocando a precipitação do FePi no sítio de reação (Coelho et al., 2022). Os produtos de solubilidade do $\text{Fe}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, e $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ são $4,8 \times 10^{-17}$, $2,7 \times 10^{-39}$, e $9,9 \times 10^{-16}$, respectivamente,

consequentemente, a formação de uma mistura de oxi-hidróxidos de Fe e fosfatos é razoável (Haynes, W. M., Lide, D. R., & Bruno, T. J., 2014). Como sugerido por Coelho et al. (2022), o pH da solução empregada para FED foi mantida em cerca de 7, ou seja, a concentração de hidroxilas era de aproximadamente $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto a concentração de fosfato de hidrogênio era maior que $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

A partir dos perfis voltamétricos da heteroestrutura em eletrólito contendo os precursores metálicos, definiu-se a eletrodeposição dos catalisadores CoPi e NiPi como ciclos de duas etapas: (i) manutenção do Eca por 10 s; (ii) aplicação do potencial de deposição (1,66 V vs. ERH para o CoPi e 2,31 V vs. ERH para o NiPi) durante o tempo necessário para se alcançar uma carga de $2,0 \text{ mC cm}^{-2}$. A etapa de Eca foi pensada para garantir ao sistema um tempo de relaxamento de modo que a concentração do íon metálico fosse reestabelecida na superfície do fotoanodo (Coelho et al., 2022). Os ciclos de FED foram repetidos até se alcançar a carga necessária de catalisador sobre a heterojunção. Para a FED do FePi, o ciclo foi modificado, sendo realizado com três etapas: (i) manutenção do Eca por 10 s; (ii) aplicação de 0,09 V vs. ERH durante 10 s, e (iii) aplicação de 1,23 V vs. ERH pelo

tempo necessário para alcançar $2,0 \text{ mC cm}^{-2}$.

Conforme as imagens de microscopia, ilustradas na Figura 2, observa-se a formação de um filme nano estruturado de WO_3 a partir de uma morfologia composta por nanobastões bem-dispostos e razoavelmente homogêneos. Características essas essenciais para o desenvolvimento de dispositivos eficientes, uma vez que possibilita a maximização da área ativa do fotoanodos (J.-H. Kim et al., 2019). Embora os nanobastões parecem crescer em direções arbitrárias, é possível identificar uniformidade estrutural, de modo a estimar a altura (δ) média (Fig. 2A) em torno de $1,9 \mu\text{m}$. De fato, pelo que se pode inferir a partir da superfície do filme (Fig. 2B) os *nanorods* não são cilíndricos, possuindo seção transversal irregular que se assemelha a retângulos - pilares. Ainda assim, estima-se que o diâmetro característico (θ) médio seja de $0,2 \mu\text{m}$. Além do mais, é possível observar também a presença de uma camada compacta de WO_3 , cuja espessura varia entre 150 e 300 nm. Vale ressaltar que a nano estrutura formou-se mediante uma *seed layer*, conseqüentemente é plausível que esta tenha se mantido ou até mesmo tenha aumentado a espessura durante a síntese hidrotermal.

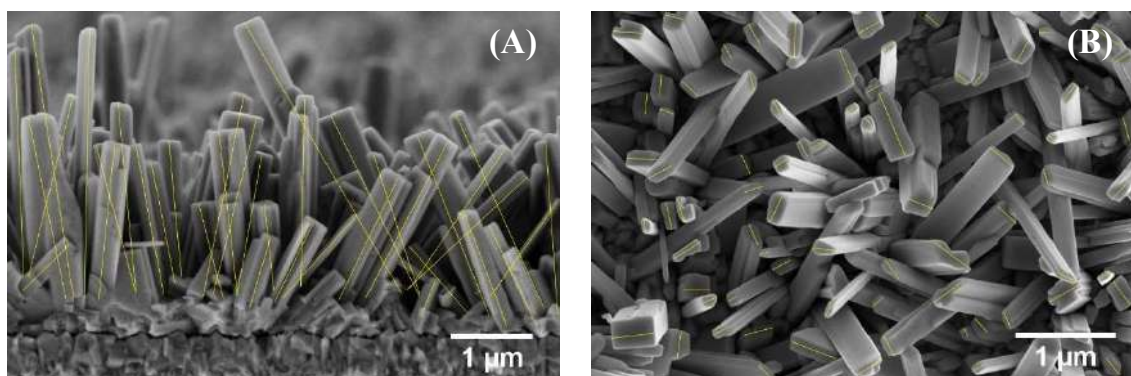
De forma geral, embora aqui tenha-se empregado a técnica de *spray* para deposição da *seed layer*, enquanto J.-H. Kim et al. (2019) utilizaram deposição física de vapor por feixe de elétrons (do inglês *Electron-beam physical vapor deposition – EB-PVD*), os resultados obtidos foram razoavelmente similares aos apresentados por eles (J.-H. Kim et al., 2019), revelando-se altamente satisfatórios. Ao que tudo indica, as maiores diferenças encontram-se nas dimensões da nanoestrutura. O presente trabalho exhibe bastões com diâmetro 71% menor e 58% mais baixos que aqueles mencionados por J.-H. Kim et al. ($\delta \approx 3,0 \mu\text{m}$ $\theta \approx 0,34 \mu\text{m}$) (2019). Tais disparidades podem ser atribuídas tanto a produção da *seed* como aos equipamentos utilizados. No entanto, todas as demais características morfológicas (distribuição / disposição, inclinação, orientação, uniformidade / homogeneidade) e macroscópicas (coloração amarelada com aspecto opaco) são altamente semelhantes. Logo a metodologia reportada por J.-H. Kim et al. (2019) demonstrou-se promissora e efetiva na produção uniforme de nano bastões

A deposição de BiVO_4 e conseqüente a formação da heterojunção com WO_3 mantendo a nanoestrutura é apresentada na Figura 3, a partir da qual é possível observar que, embora as

partículas de BiVO_4 encontram-se particularmente no topo dos nanobastões, há uma dispersão razoável delas recobrando, ainda que parcialmente, toda a nanoestrutura. Esse efeito é ainda mais claro analisando-se as Figuras 3B e 3E, em que se visualiza seguramente a existência de BiVO_4 em grande parte do filme de WO_3 . O que certamente, é imprescindível para a

formação da heterojunção, uma vez que a camada de um dos semicondutores deve ser depositada exatamente acima do outro. Desse modo, a configuração inibi a formação de caminhos alternativos para passagem de cargas fotogerada e ainda possibilita a separação espacial efetiva dessas (Moniz, Shevlin, Martin, Guo & Tang, 2015).

Figura 2 – MEV dos filmes WO_3 -nr: **(A)** Vista transversal – destaque na direção e altura dos nano bastões. **(B)** Vista superficial – destaque no formato e diâmetro dos nano bastões.



Fonte: Próprio Autor

Interessantemente, estima-se que a altura média dos *nanorods* recobertos por BiVO_4 seja de $1,4 \mu\text{m}$, cerca de 500 nm menor que os *nanorods* puro. Isso, muito provavelmente, se deve ao fato de estarmos analisando filmes distintos em regiões distintas, que embora tenham sido produzidos a partir de uma metodologia reprodutível possuem dimensões nanoestruturais diferentes. Vale ressaltar também que não se percebeu, em nenhum dos tratamentos, seja de deposição de Bi

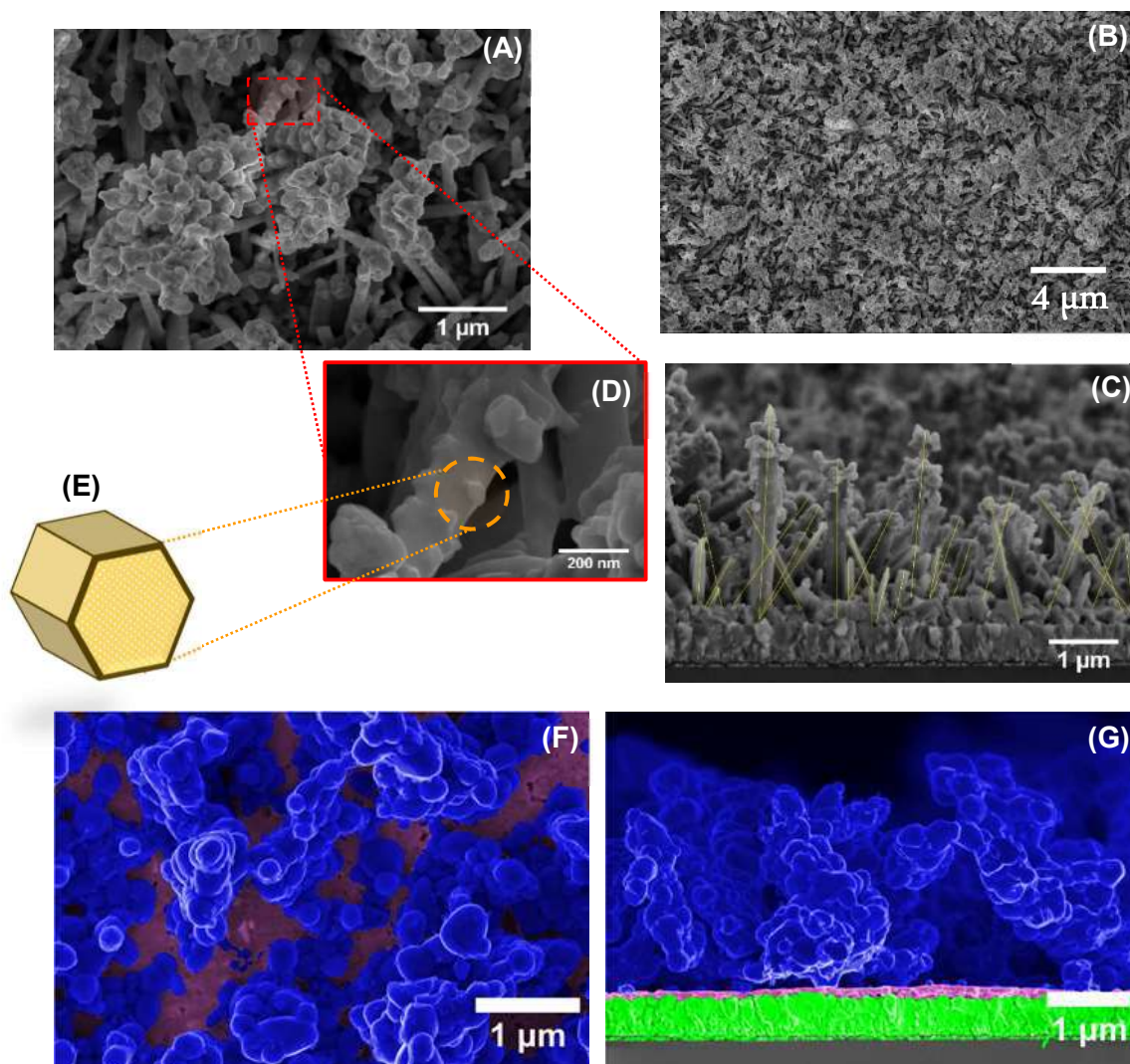
metálico, ou de conversão para BiVO_4 , efeito capaz de reduzir a camada de WO_3 .

Em contrapartida, estima-se que o diâmetro característico médio dos nanobastões da heteroestrutura seja de $0,7 \mu\text{m}$, três vezes maior em relação ao filme de WO_3 . Efeito esse que já era esperado, uma vez que as partículas tendem a se depositar preferencialmente nas regiões de maior acesso (topo). Destaca-se ainda o fato de as partículas de BiVO_4 apresentarem um tamanho médio entre 80 nm e 200 nm (Fig. 3A e 3B) com morfologia

semelhante a demonstrado por Gromboni, Araújo, Downey, Marken e Mascaro (2016). Entretanto, analisando-se detalhadamente as partículas depositadas (Fig. 3C) pode-

se constatar também a presença de estruturas semelhantes aos monocristais de BiVO_4 obtidos por X. Wang, Liao, H. Yu e J. Yu (2018) (Fig. 3D).

Figura 3 – MEV dos filmes WO_3 -nr recobertos com BiVO_4 depositado por eletrodeposição pulsada: (A) vista superficial aproximada e (B) ampliada, (C) vista transversal. (D) Detalhe mostrando semelhança entre a estrutura de BiVO_4 sobre um nano bastão de WO_3 com a (E) um monocristal de BiVO_4 – *chart*. MEV da (F) superfície e (G) transversal dos filmes $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$ flat



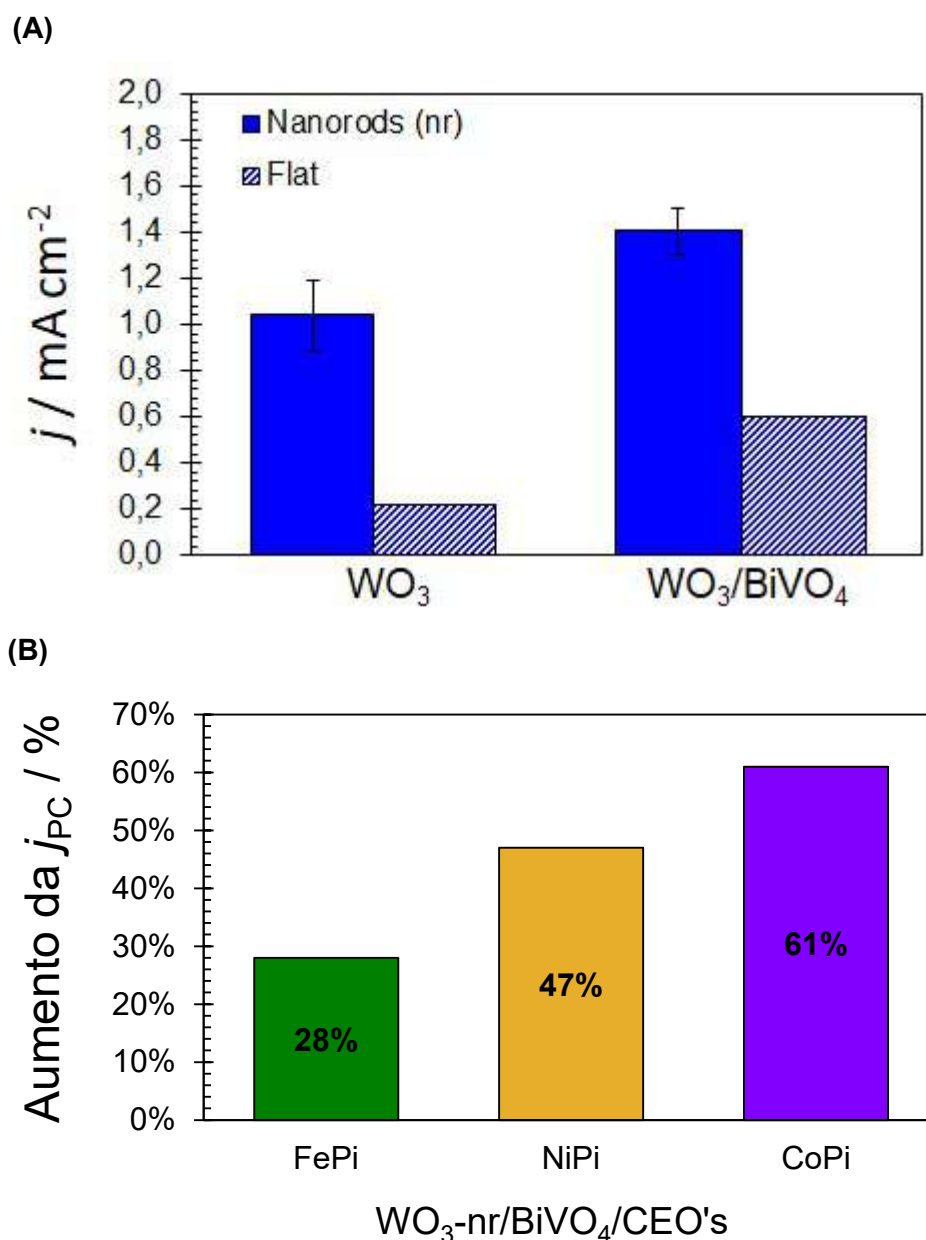
Fonte: Próprio Autor

Como visto anteriormente, a deposição a eletrodeposição pulsada de Bi permitiu a formação de estruturas homogêneas (Fig. 3B), recobrando satisfatoriamente a nanoarquitetura de WO_3 . Muito provavelmente, isso se deve ao tempo de relaxamento adicionado ao procedimento mitigando os possíveis efeitos limitantes do transporte de massa. Nesse caso, em que se utilizou um filme nanotexturizado e um solvente altamente viscoso (PEG-300), o procedimento faseado foi imprescindível para permitir a difusão das espécies Bi^{3+} , que é lenta, até a superfície do fotoanodo (Gromboni et al., 2016), proporcionando assim, tempo suficiente para o reestabelecimento da camada de difusão em toda a extensão do substrato. Conforme exibido nas micrografias, transversal e superficial (Fig. 3E e 3F), as heteroestruturas *flat*, como era esperado, exibiram a formação de um filme fino, compacto e homogêneo de WO_3 . A camada de BiVO_4 , por sua vez, assumiu estrutura colunar tal como reportado por Coelho et al. (2020). Segundo os autores, isso ocorre, pois, a eletrodeposição de Bi metálico forma partículas piramidais que, durante o tratamento térmico na presença de NH_4VO_4 , conduzem a formação de uma morfologia colunar (Coelho et al., 2020).

A Figura 4 resume os resultados de performance fotoeletroquímica das

diferentes configurações de dispositivos produzidos. A partir da comparação de performance dos filmes de WO_3 puro (Fig. 4A) é possível observar que a densidade de corrente alcançada pelo fotoanodo nanoarquitetado foi de cerca de $0,6 \text{ mA cm}^{-2}$, quase o triplo (273%) da fotoatividade obtida com filmes *flat* ($0,22 \text{ mA cm}^{-2}$). Semelhantemente, analisando o desempenho das heterojunções (Fig. 4A) nota-se que a configuração nanoestruturada exibiu j_{PC} média de $1,40 \pm 0,12 \text{ mA cm}^{-2}$, 35 % superior àquela apresentada pela heteroestrutura *flat* ($1,04 \pm 0,15 \text{ mA cm}^{-2}$). Dessa maneira, tanto os fotoanodos a base de $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$ quanto os filmes de WO_3 puro tiveram sua performance expressivamente elevada após a modificação com nano bastões. Isso se deve, muito provavelmente, ao aumento da área superficial e a maximização da absorção de luz incidente em virtude o efeito antirreflexivo da nano arquitetura (J.-H. Kim et al., 2019). Observa-se também uma melhora (de cerca de 30%) na reprodutibilidade dos dispositivos contendo nano bastões, evidenciado pela redução do desvio padrão das respostas de fotocorrente em relação as heterojunções *flat*. Acredita-se que isso esteja intimamente ligado a homogeneização da camada de WO_3 -nr resultante da longa exposição hidrotermal.

Figura 4. (A) Comparação do desempenho (j_{pc}) das heteroestruturas *flat* e nanoestruturadas. (B) Aumento do desempenho (j_{pc}) das heteroestruturas nanoestruturadas recobertas pelos cocatalisadores (FePi, NiPi e CoPi) em relação aos filmes não modificados com fosfatos metálicos.



Fonte: Próprio Autor

Além disso, analisando-se ainda os filmes puros de WO₃-nr (0,6 mA cm⁻²) com as heteroestruturas WO₃-nr/BiVO₄ (1,4 mA

cm⁻²), percebe-se um aumento expressivo da j_{pc} (acima de 200%), corroborando com a ideia da formação de uma heterojunção

do tipo-II (*staggered gap*), o que também é indicado pelas micrografias da Figura 3. A obtenção dessa heteroestrutura é capaz de minimizar a formação de caminhos alternativos para a passagem de cargas fotogeradas, permitindo a efetiva separação espacial destas quando da transferência de uma camada para a outra, mitigando assim a recombinação de carga *bulk* (Moniz et al., 2015). O efeito da deposição de catalisadores a base de oxi-hidróxido fosfato de metais abundantes (Ni, Fe, Co) sobre a heteroestrutura WO_3 -nr/ $BiVO_4$ na fotodecomposição da água é apresentado na Figura 4B. A configuração WO_3 -nr/ $BiVO_4$ /CEO's revelou um aumento de 28, 47 e 61%, para as modificações com FePi (1,8 mA cm⁻²), NiPi (2,0 mA cm⁻²) e CoPi (2,3 mA cm⁻²), respectivamente (em relação a heterojunção sem catalisadores). Esse aumento significativo se deve a alta taxa de transferência de buracos fotogerados para a água, minimizando a recombinação do par elétron-buraco na interface semiconductor-eletrólito (D. Li, Shi & C. Li, 2018). Assim, o uso de todos os catalisadores aqui propostos e estudados permitiram a superação da barreira cinética gerada pela limitação da transferência de carga do eletrólito para o semiconductor. Fato apoiado pelo grande aumento da fotocorrente na faixa de baixo potencial (-0,1 a 0,4 V vs Ag/AgCl).

Conclusão

A heteroestrutura WO_3 -nr/ $BiVO_4$ obtida a partir de técnicas de *spray*, eletrodeposição, tratamentos térmicos e hidrotermais, apresentou um aumento de mais de 2,3 vezes na densidade de corrente quando comparado com o filme de WO_3 -nr puro (0,6 mA cm⁻²). Além disso, a fotoeletrodeposição (FED) dos catalisadores de evolução de oxigênio a base de oxi-hidróxidos fosfatos de Fe, Ni e Co promoveu uma elevação da j_{PC} na ordem de 1,28, 1,47 e 1,61 vezes se comparado a heterojunção não modificada (WO_3 -nr/ $BiVO_4$), sendo o maior valor de j_{PC} alcançado pelo fotoanodo contendo CoPi (2,3 mA cm⁻²). As micrografias evidenciaram morfologia colunar do $BiVO_4$ para os filmes *flat*, e a formação de nano bastões bem distribuídos para os fotoanodos nano arquitetados. Estratégia essa que permitiu elevar a absorção de luz visível e aumentar a área superficial, potencializando a fotoatividade do dispositivo em mais de 30%. Portanto, a performance aqui alcançada com o uso de materiais obtidos a partir do emprego de metodologias facilmente escaláveis, como é a eletrodeposição e o *spray*, prova que técnicas de baixo custo podem ser competitivas e promissoras quando comparadas a processos complexos e custosos utilizados na redução dos efeitos



de recombinação de carga no seio e na interface eletrólito-fotoanodo.

Bibliografias

Abdi, F. F., Firet, N., & Krol, R. van de. (2013) Efficient BiVO₄ thin film photoanodes modified with cobalt phosphate catalyst and W-doping. *ChemCatChem*, 5(2), 490-496. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200472>

Berglund, S. P., Rettie, A. J. E., Hoang, & S., Mullins, C. B. (2012). Incorporation of Mo and W into nanostructured BiVO₄ films for efficient photoelectrochemical water oxidation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(19), 7065-7075, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2cp40807d>

Brillet, J., Cornuz, M., Formal, F. le, Yum, J.-H., Grätzel, M., & Sivula, K. (2010). Examining architectures of photoanode-photovoltaic tandem cells for solar water splitting. *Journal of Materials Research*, 25(1), 17-24. <https://doi.org/10.1557/JMR.2010.0009>

Chartier, P., Ba, B., Ebothe, J., Vante, N. A., & Cong, H. N. (1982). Photoassisted interfacial charge transfers at inhomogeneous semiconducting film - electrolyte junction in photoelectrochemical cells: Case of CdS and CdS(al) sprayed films on to conductive glass. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 138(2), 381-394. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(82\)85089-4](https://doi.org/10.1016/0022-0728(82)85089-4)

Choi, S. K., Choi, & W., Park, H. (2013). Solar water oxidation using nickel-borate coupled BiVO₄ photoelectrodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(17), 6499-6507. <https://doi.org/10.1039/C3CP00073G>

Coelho, D., Gaudêncio, J. P. R. S., Carminati, S. A., Ribeiro, F. W. P., Nogueira, A. F., & Mascaro, L. H. (2020). Bi electrodeposition on WO₃ photoanode to improve the photoactivity of the WO₃/BiVO₄ heterostructure to water splitting. *Chemical Engineering Journal*, 399, Article 125836. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125836>

Coelho, D., Gaudêncio, J. P. R. S., & Mascaro, L. H. (2022). Boosting the photocurrent of the WO₃/BiVO₄ heterojunction by photoelectrodeposition of the oxy-hydroxide-phosphates based on Co, Fe and Ni. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33(7), 743-752. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220015>

Gerische, H. (1960). On role of electrons and holes in surface reactions on semiconductors. *Surface Science*, 13(1), 265-278. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(69\)90257-X](https://doi.org/10.1016/0039-6028(69)90257-X)

Gromboni, M. F., Araújo, M. A., Downey, E., Marken, F., & Mascaro, L. H. (2016). Photoanodes on titanium substrates: one-step deposited BiVO₄ versus two-step nano-V₂O₅ films impregnated with Bi³⁺. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 20(1), 273-283. <https://doi.org/10.1007/s10008-015-3034-1>

Jeong, H. W., Jeon, T. H., Jang, J. S., Choi, W., & Park, H. (2013). Strategic modification of BiVO₄ for improving photoelectrochemical water oxidation performance. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(18), 9104-9112. <https://doi.org/10.1021/jp400415m>

Kamat, P. V. (2007). Meeting the clean energy demand: Nanostructure architectures for solar energy conversion. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(7), 2834-2860. <https://doi.org/10.1021/jp066952u>



Kanan, M. W., & Nocera, D. G. (2008). In situ formation of an oxygen-evolving catalyst in neutral water containing phosphate and Co^{2+} . *Science*, 321(5892), 1072-1075.

<https://doi.org/10.1126/science.1162018>

Kim, J.-H., Kim, D. H., Yoon, J. W., Dai, Z., & Lee, J.-H. (2019). Rational design of branched WO_3 nanorods decorated with BiVO_4 by all-solution processing for efficient photoelectrochemical water splitting. *Applied Energy Materials*, 2(6), 4535-4543.

<https://doi.org/10.1021/acsaem.9b00776>

Langer, J. M., & Heinrich, H. (1985). Deep-level impurities: A possible guide to prediction of band-edge discontinuities in semiconductor heterojunctions. *Physical Review Letters*, 55(13), 1414-1417.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.55.1414>

Lee, M. G., Kim, D. H., Sohn, W., Moon, C. W., Park, H., Lee, S., & Jang, H. W. (2016). Conformally coated BiVO_4 nanodots on porosity-controlled WO_3 nanorods as highly efficient type II heterojunction photoanodes for water oxidation. *Nano Energy*, 28, 250-260.

<https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2016.08.046>

Li, D., Shi, J., & Li, C. (2018). Transition-metal-based electrocatalysts as cocatalysts for photoelectrochemical water splitting: A mini review. *Small*, 14(23), Article 1704179.

<https://doi.org/10.1002/sml.201704179>

Li, Z., Luo, W., Zhang, M., Feng, J., & Zou, Z. (2013). Photoelectrochemical cells for solar hydrogen production: Current state of promising photoelectrodes, methods to improve their properties, and outlook. *Energy & Environmental Science*, 6(2), 347-370.

<https://doi.org/10.1039/C2EE22618A>

Haynes, W. M., Lide, D. R., & Bruno, T. J. (Eds.). (2014). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (95th ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

Luo, W. J., Wang, Z. Q., Wan, L. J., Li, Z. S., Yu, T., & Zou, Z. G. (2010). Synthesis, growth mechanism and photoelectrochemical properties of BiVO_4 microcrystal electrodes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 43(40), Article 405402. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/43/40/405402>

Mascaro, L. H., Pockett, A., Mitchels, J. M., Peter, L. M., Cameron, P. J., Celorrio, V., ... Marken, F. (2014). One-step preparation of the BiVO_4 film photoelectrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 19(1), 31-35.

<https://doi.org/10.1007/s10008-014-2495-y>

Mckone, J. R., Lewis, N. S., & Gray, H. B. (2014). Will solar-driven water-splitting devices see the light of day? *Chemistry of Materials*, 26(1), 407-414.

<https://doi.org/10.1021/cm4021518>

Moniz, S. J. A., Shevlin, S. A., Martin, D. J., Guo, Z.-X., & Tang, J. (2015). Visible-light driven heterojunction photocatalysts for water splitting - a critical review. *Energy & Environmental Science*, 8(3), 731-759.

<https://doi.org/10.1039/C4EE03271C>

Nozik, A. J. (1978). Photoelectrochemistry: Applications to solar-energy conversion. *Annual Review of Physical Chemistry*, 29(1), 189-222.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pc.29.100178.001201>

Pihosh, Y., Turkevych, I., Mawatari, K., Uemura, J., Kazoe, Y., Kosar, S., ... Kitamori, T. (2015). Photocatalytic generation of hydrogen by core-shell $\text{WO}_3/\text{BiVO}_4$ nanorods with ultimate water splitting efficiency. *Scientific Reports*, 5(1),



Article 11141.

<https://doi.org/10.1038/srep11141>

Razykov, T. M., Ferekides, C. S., Morel, D., Stefanakos, E., Ullal, H. S., & Upadhyaya, H. M. (2011). Solar photovoltaic electricity: Current status and future prospects. *Solar Energy*, *85*(8), 1580-1608.

<https://doi.org/10.1016/j.solener.2010.12.002>

Roger, I., & Symes, M. D. (2016). First row transition metal catalysts for solar-driven water oxidation produced by electrodeposition, *Journal of Materials Chemistry A*, *4*(18), 6724-6741.

<https://doi.org/10.1039/C5TA09423B>

Seabold, J. A., & Choi, K. S. (2012). Efficient and stable photo-oxidation of water by a bismuth vanadate photoanode coupled with an iron oxyhydroxide oxygen evolution catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(4), 2186-2192.

<https://doi.org/10.1021/ja209001d>

Silva, M. R. da, Dall'Antonia, L. H., Scalvi, L. V. A., Santos, D. I. dos, Ruggiero, L. O., & Urbano, A. (2012). Deposition and characterization of BiVO₄ thin films and evaluation as photoanodes for methylene blue degradation. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *16*(10), 3267-3274.

<https://doi.org/10.1007/s10008-012-1765-9>

Tersoff, J. (1984). Theory of semiconductor heterojunctions: The role of quantum dipoles. *Physical Review B*, *30*(8), 4874-4877.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.30.4874>

Walter, M. G., Warren, E. L., McKone, J. R., Boettcher, S. W., Mi, Q. X., Santori, E. A., & Lewis, N. S. (2010). Solar water splitting cells. *Chemical Reviews*, *110*(11), 6446-6473.

<https://doi.org/10.1021/cr1002326>

Wang, X., Liao, D., Yu, H., & Yu, J. (2018). Highly efficient BiVO₄ single-crystal photocatalyst with selective Ag₂O-Ag modification: Orientation transport, rapid interfacial transfer and catalytic reaction. *Dalton Transactions*, *47*(18), 6370-6377.

<https://doi.org/10.1039/C8DT00780B>

Yang, J.-S., & Wu, J.-J. (2017). Low-potential driven fully-depleted BiVO₄/ZnO heterojunction nanodendrite array photoanodes for photoelectrochemical water splitting. *Nano Energy*, *32*, 232-240.

<https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2016.12.039>

Zhou, M., Bao, J., Bi, W. T., Zeng, Y. Q., Zhu, R., Tao, M. S., & Xie, Y. (2012). Efficient water splitting via a heteroepitaxial BiVO₄ photoelectrode decorated with Co-Pi catalysts.

ChemSusChem, *5*(8), 1420-1425.

<https://doi.org/10.1002/cssc.201200287>

Financiamento

Esta pesquisa teve financiamento da FAPESP e do CNPq sob seguintes processos:

FAPESP processo 2020/05476-7

FAPESP/CDMF processo 2013/07296-2

FAPESP/Shell processo 2017/11986-5.

CNPq

Agradecimentos

Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais – CDMF

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Shell

Centro de Inovação em Novas Energias – CINE

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

“Síntesis y caracterización de materiales catódicos $\text{LiNi}_0.5\text{Mn}_1.5\text{O}_4$ obtenidos por el método sol-gel para su evaluación preliminar en una celda de ion litio”



C.24. Ciencia e ingeniería de materiales

“Síntesis y caracterización de materiales catódicos LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄ obtenidos por el método sol-gel para su evaluación preliminar en una celda de ion litio”

Autor: Duran Palenque Wiñay; wduranp@fcpn.edu.bo

Co-autor(es): Ph. García, Gustavo; jggarcia6@umsa.bo , M Sc. Palabral, Karen;

karen.xpv@gmail.com

Universidad Mayor de San Andrés (UMSA)

Resumen

A medida que nuevas tecnologías van naciendo, crece la necesidad de almacenar energía. Actualmente se van desarrollando nuevos tipos de baterías con diversas características. Pero sin duda una de las baterías que tiene más demanda y que se convierte en una alternativa prometedora, es definitivamente la batería de ion litio (LIBs). El desarrollo de baterías de iones de litio (LiBs) con alta energía y la densidad de potencia ha sido de gran interés en la industria durante muchos años y ahora más que nunca la necesidad a nivel mundial es acuciante debido al aumento de producción de artefactos electrónicos. La eficiencia, el tiempo de vida y las propiedades electroquímicas de las baterías de litio se atribuye principalmente al material catódico, y aproximadamente el 40% de los costos de una batería provienen de este. Uno de los materiales catódicos más prometedores es el LNMO que interviene durante los procesos de ciclado que mejora el rendimiento y las propiedades electroquímicas de las baterías. Las características más llamativas de este material es su capacidad de voltaje de (4.7 V), la alta capacidad teórica (147 mAhg⁻¹) y su peculiar canal de difusión de iones litio. Estos factores dependen de la síntesis del material catódico por eso es importante tomar en cuenta las variables como: el tamaño de partícula, tensión en la red cristalina, morfología de las partículas, estados de oxidación y ordenamiento de Mn/Ni para obtener un excelente material y que brinde óptimas propiedades electroquímicas a la batería de ion litio.

El material catódico LNMO se sintetizará a partir de materia prima boliviana tales como carbonato de litio, carbonato de manganeso, carbonato de níquel y urea como agente quelante, mismos que son abundantes en nuestro país y fáciles de conseguir, ya que contamos con una gran reserva mundial de litio en el Salar de Uyuni en el departamento de Potosí, Níquel en rincón del Tigre en el departamento de Santa Cruz, Manganeso en el Mutún y urea que se produce en la Planta de Amoniaco-Urea (PAU). La metodología experimental

consiste en emplear el método sol-gel y un tratamiento térmico para controlar la formación cristalina de los complejos de urea-ion metálico y el orden catiónico con el fin de obtener un material de tamaño micrométrico, con estructura homogénea y óptimas características electroquímicas para posteriormente realizar la caracterización: estructural mediante DRX (Difracción de Rayos X) y SEM (Microscopio electrónico de barrido) y caracterización electroquímica mediante pruebas preliminares electroquímicas en el armado de celdas de litio/grafito. Mediante este estudio piloto de la síntesis del LNMO a partir de materia prima boliviana se espera que se pueda fabricar baterías de litio a bajo costo y que un futuro se logre la exportación del producto obtenido, en respuesta a las necesidades del desarrollo tecnológico actual y amigable con el medio ambiente. Palabras clave: Síntesis del LNMO, batería de ion de litio, material catódico, método sol-gel, tratamiento térmico, tamaño de partícula, ordenamiento catiónico Mn/Ni.

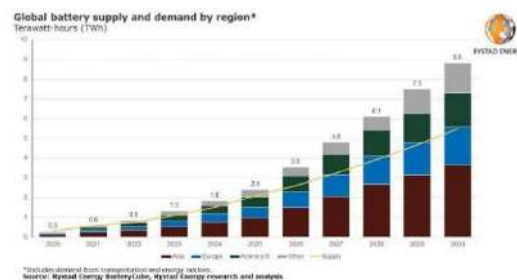
Palabras clave: Material catódico LNMO, método sol-gel, materia prima boliviana, baterías de litio.

Introducción

A medida que nuevas tecnologías se van desarrollando crece la necesidad de almacenar energía. Actualmente se van desarrollando nuevos tipos de baterías con diversas características, pero sin duda una de las baterías que actualmente tiene una demanda creciente y que es una alternativa prometedora, es la batería de ion litio (LIBs).

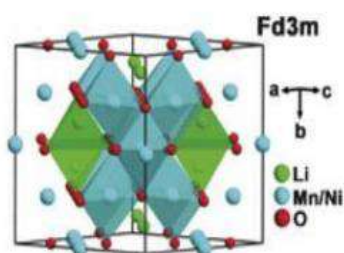
El desarrollo de baterías de iones de litio (LiBs) con alta energía y densidad de potencia ha sido de gran interés en la industria durante muchos años. Y ahora más que nunca es una necesidad a nivel mundial debido al aumento de producción de artefactos electrónicos, sobre todo los autos eléctricos. Según un estudio realizado por Rystad Energy, en el que se

muestra que en 2021 la demanda de baterías se situó en los 580 GWh, cifra que ya duplicó a lo demandado el año anterior.

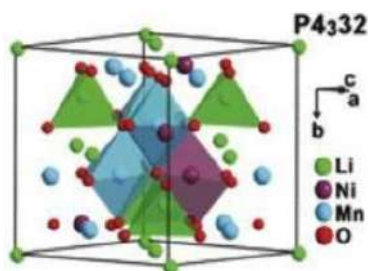


Hoy en día se quiere ir reemplazando totalmente el uso de baterías convencionales y emplear las LIBs para el almacenamiento de energías renovables para que permita la distribución de energía a varios lugares. La eficiencia, el tiempo de vida y las propiedades electroquímicas de las baterías de litio se atribuye principalmente al material catódico del que

está compuesto, la espinela LNMO. Las características más llamativas de este material es su capacidad de voltaje de (4.7 V), la alta capacidad teórica (147 mAhg⁻¹) y el único y peculiar canal de difusión se iones litio.



La estructura de cristalina del $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ se puede clasificar en dos estructuras diferentes, $Fd3m$ (desordenada) y $P4332$ (ordenada), que son ambas estructuras de espinela pero difieren entre sí dependiendo en el orden de Mn/Ni.



En la estructura cúbica centrada en las caras ($Fd3m$), los átomos de litio ocupan los sitios 8a mientras que el manganeso junto con los átomos de níquel se encuentra aleatoriamente posicionado en los sitios 16d. El oxígeno se encuentra en las posiciones 32e. En el caso de la estructura cúbica simple ($P4332$), los

átomos de litio están en los sitios 8c, el manganeso en 12d y níquel en los sitios 4a, mientras que los átomos de oxígeno ocupan los sitios 24e y 8c [5].

En otras palabras, ambas espinelas tienen orden catiónico Mn/Ni distinto. La espinela desordenada se ve favorecida a temperaturas de calcinación superiores a 700°C debido a la formación cinética lenta, mientras que la fase desordenada requiere un recocido por debajo de 700°C para formarse. Sin embargo, la presencia de vacantes de oxígeno puede conducir a la reducción de una pequeña cantidad de Mn^{4+} inactivo Mn^{3+} para compensar la pérdida de oxígeno. El Mn^{3+} redox activo en la fase desordenada mejora ligeramente la conductividad eléctrica y la difusión de litio Li^+ que es responsable del comportamiento electroquímico mejorado. Por el contrario, la fase ordenada contiene estados de oxidación fijos de Ni^{2+} y Mn^{4+} donde se ha encontrado al níquel como metal de transición.

El orden catiónico del Mn/Ni tiene una gran importancia como se señaló anteriormente y de hecho existen muchos estudios sobre la eficiencia de las estructuras ordenadas o desordenadas, por ejemplo, Kunduraci et al [7] informó que el LNMO desordenado exhibió un mejor rendimiento cíclico debido a su mayor conductividad electrónica y deiones de litio. Sin embargo, Ma et al [10]



informó que el LNMO ordenado podría mostrar una estabilidad de ciclo superior con una capacidad de alta velocidad. Se demostró que el rendimiento electroquímico del LNMO está fuertemente vinculado a la concentración de vacantes de oxígeno [9]. Según los estudios de Burack et al. [5] señala que por primera vez se ha demostrado que no existe una conexión directa entre la liberación de oxígeno y el desorden catiónico, y como catión desordenado es observado al empezar la liberación de oxígeno cuando las muestras son calentadas en una atmósfera de oxígeno. Con este resultado demuestra que es posible sintonizar el desorden en LNMO sin inducir deficiencias de oxígeno. También en otro estudio de Burack et al. [9] demuestra que la disposición estructural de Mn/Ni tiene efecto en la superficie y en las propiedades de la “superficie cercana” del LNMO, particularmente en el estado delitiado, que está relacionado con las propiedades electrónicas del material de electrodo. Otro factor importante es el tamaño de partícula, ya que las propiedades electroquímicas pueden variar según distintos casos. En el estudio de Capcha et al. [10] señala que mediante el tratamiento pirolítico/ a trano en medio acuoso ha obtenido partículas con buena cristalinidad con un orden de partículas de $7,5 \mu\text{m} \pm 3,5 \mu\text{m}$

(micropartículas). En cambio, en otra investigación se sintetizan partículas nanométricas Uddin et al. [11] quien señala que la nanotecnología provee nuevas rutas de diseño y síntesis de materiales catódicos, en su estudio compara distintos métodos de síntesis y los tamaños de las partículas. En este trabajo de investigación se desea obtener un material catódico sintetizado a partir de materia prima boliviana para la implementación en el armado de celdas electroquímicas de ion litio y posterior fabricación de baterías de litio a bajo costo. Los factores que se toman en cuenta es la formación de la estructura cristalina de la espinela y el tamaño de partícula. El material catódico se va a sintetizar mediante el método sol-gel y el agente quelante urea. Las materias primas que se emplearán son fáciles de conseguir en Bolivia aprovechando que contamos con una gran reserva mundial de litio en el Salar de Uyuni en el departamento de Potosí, Níquel en rincón del Tigre en el departamento de Santa Cruz, Manganeseo en el Mutún [12] y urea que se produce en la Planta de Amoniaco Urea (PAU). También se implementará un tratamiento térmico para controlar la formación cristalina y el orden catiónico con el fin de obtener un material de tamaño micrométrico, con estructura homogénea y óptimas características electroquímicas

para posteriormente realizar la caracterización: estructural mediante DRX (Difracción de Rayos X) y SEM (Microscopio electrónico de barrido) y caracterización electroquímica mediante pruebas preliminares electroquímicas en el armado de celdas de litio/grafito.

Objetivos

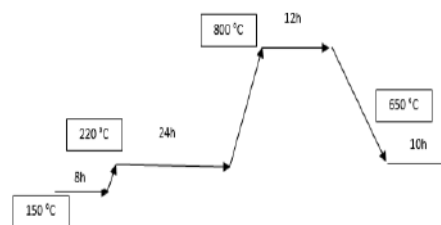
Objetivo General Utilizar materia prima boliviana de fácil acceso para transformarla en un material catódico “LNMO” para la fabricación de baterías de litio. Objetivos específicos • Sintetizar LNMO por el método solgel con control de tamaño de partícula y con tratamiento térmico de 120°C a 800°C. • Caracterizar el material catódico mediante técnicas de Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía electrónica de barrido (SEM) y softwares especializados. • Evaluar las propiedades electroquímicas del material catódico en una celda de prueba de ion litio.

Materiales y métodos

La obtención del LNMO se realizará mediante el método sol – gel empleando como materia prima el carbonato de litio, carbonato de manganeso y carbonato de níquel que se disuelven en urea (agente quelante). La preparación de será a partir de las cantidades estequiométricas y disueltos en agua desionizada con

agitación constante a 50°C. La solución de urea es preparada en una relación 1:1 con los metales iónicos y se añadirá lentamente mientras la solución es calentada. Después de 5 horas de agitación constante la temperatura se aumenta a 85°C para que se evapore el agua.

La solución pasará a un horno al vacío a 125°C durante una noche. Y posteriormente se realizará un tratamiento térmico para eliminar la materia orgánica atrapada. Para ello se proponen temperaturas de calcinación de 150°C, 220°C y 800°C. Llegar hasta la temperatura de 780°C es importante debido a que ya se forma la espinela desordenada.



Método de caracterización estructural 1. Difracción de Rayos X (DRX) Las muestras de LNMO serán analizadas mediante la técnica de difracción en polvo en el equipo Rigaku-Geiger (Laboratorio de Geología-UMSA) con fuente de cobre (Cu/Ka1=1.54 Å) en el rango 2theta 5 – 70. Los difractogramas serán comparados con los patrones indexados en los archivos de difracción en polvo para minerales

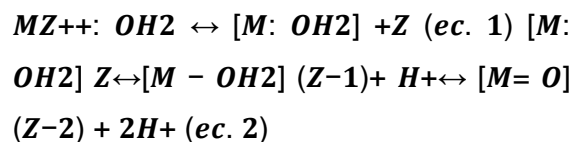
mediante el software Xpert Hihg Score. Los resultados que se obtienen de este método de caracterización son: la cristalinidad de las fases cristalinas presentes y el tamaño promedio de microdominio cristalino [10], adicionalmente se realizará un refinamiento mediante el método Rietveld con el fin de determinar porcentajes de pureza del LMNO frente a productos secundarios. 2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) Las micrografías de los productos de los materiales catódicos LNMO serán obtenidas con el equipo SEM– EDS Philips XL-30. Se tomarán en promedio 10 micro imágenes de cada producto de en magnificaciones en el rango de 1000X–10000X y un voltaje de aceleración de electrones de 10-15kV. Los resultados que provienen de este método de caracterización son la morfología del material LMNO o de impurezas, homogeneidad y distribución del tamaño de las partículas del sólido a escala micrométrica [13]. 3. Caracterización Electroquímica/ Ensamblado de celdas de ion litio Se emplea la técnica galvanostática /modo carga – descarga. Los materiales de los electrodos se ensamblarán en celdas electroquímicas para la medición electroquímica. Los experimentos de desmontaje de la celda se llevarán a cabo en el equipo Glovebox con atmósfera de argón de alta pureza (99,999%) [13]. El cátodo

será fabricado mediante la mezcla de las muestras LNMO como preparados, negro de acetileno, y fluoruro de polivinilideno (PVDF) (EnNmetil-2-pirrolidona) con una relación en peso de 80:10:10. La mezcla de los tres componentes es recubierta en papel de aluminio el cual se dejará en reposo a 70 ° C durante 24 h. El litio de alta pureza se utilizará como el contra electrodo y electrodo de referencia. El electrolito fue preparado 1.0 M de la sal LiPF₆ en una mezcla de carbonato de etileno (CE) y carbonato de dimetilo (DMC) (EC: DMC = 1: 1, relación de volumen) [13].

Resultados y discusión

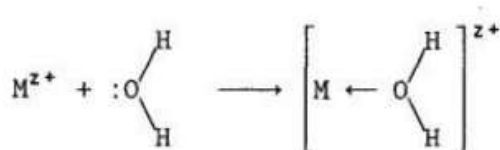
El material catódico que se sintetice mediante el método sol gel debería ayudar a que el material sea homogéneo y puro a bajas temperaturas que otros métodos. El método sol gel por la ruta de noalcóxidos usa sales inorgánicas, tales como carbonatos, nitratos, cloruros, etc. que requieren una etapa adicional para la remoción del anión inorgánico.

El proceso sol-gel, consta de la reacción de hidrólisis y condensación:



En primer lugar, se tiene la interacción del catión metálico Mz^+ con agua (ecuación 1), y luego ocurre la hidrólisis dependiendo de

la acidez del agua coordinada (ecuación 2), tal que se tiene la posible coexistencia de estos tres ligandos, acuoso $M-(OH)_2$, hidroxido $M-OH$, oxo $M=O$. Las reacciones de condensación en disoluciones acuosas pueden ocurrir mediante los mecanismos de reacción por olación, oxolación, y de la oxolación combinada en dos pasos, dependiendo del tipo de puentes ligando formados entre los cationes metálicos durante la reacción de condensación y del grado de saturación del índice de coordinación del catión metálico [13].



Por tanto, en la reacción los precursores que son los carbonatos pasarán a disociarse, y los iones metálicos formarán complejos con el agente quelante que es la urea. Se favorecerá esta reacción con agitación constante y en calor. En cuanto, al tratamiento térmico se esperaría observar una buena estructura desordenada obteniendo la menor cantidad de deficiencias de oxígeno e impurezas. Esto se realiza con el fin de evitar la generación de Mn^{3+} para que el LNMO tenga más ciclabilidad y más tiempo de vida. Si es así, el material tendrá una buena capacidad de descarga alrededor de 120 a 140 mAhg⁻¹. Por otro lado, en la primera etapa del tratamiento térmico se

espera que todas las moléculas de agua se evaporen y se favorezca el proceso de condensación. En la segunda etapa se produce la pirólisis, que es la combustión de (ignición) del material orgánico que se transforma en CO_2 , CO , NO_2 y C [12]. En la tercera etapa a 800°C durante 12 horas se espera que la estructura de la espinela ya este desordenada (780°C según Burak), en si a esta temperatura ya favorece la cristalinidad. En la cuarta etapa se sigue con un tratamiento de recocido a 650°C por 10 horas bajo aire para asegurar el tamaño de partícula y que sea más homogéneo el material.

Por último, en los difractogramas de DRX deberían mostrar picos que corresponden a una estructura espinela cúbica desordenada y en el SEM se debe apreciar partículas de tamaño micrométrico.

Bibliografía

- [1] Livage, J., Henry, M., & Sanchez, C. (1988). Sol-gel chemistry of transition metal oxides. *Progress in Solid State Chemistry*, 18(4), 259- 341. doi:10.1016/0079-6786(88)90005-2
- [2] Saul Cabrera, Jamal El Haskouri, Carmen Guillem, Julio Latorre, Aurelio Beltrán-Porter, Daniel Beltrán-Porter, M. Dolores Marcos y Pedro Amorós. Generalised synthesis of ordered mesoporous oxides: The atrane route.



Solid State Science, 2 (4), 405-420,
10.1016/S1293-2558(00)00152-7

[3] Aktekin, B. 2019. The Electrochemistry of $\text{LiNi}_{0.5}\text{-xMn}_{1.5}\text{+xO}_4$ in Li-ion Batteries. Structure, Side reactions and Cross-talk. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 1827. 84 pp. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. ISBN 978-91-513-0698-8.

[4] Lisandro J. Giovanetti, Joaquín Silveira, Helen Goitía y Félix G. Requejo, Caracterización avanzada para superar los nuevos desafíos en el diseño de las baterías de ion-Li, 2020, 197-207.

[5] Burak Aktekin, Felix Massel, Majid Ahmadi, Mario Valvo, Maria Hahlin, Wolfgang Zipprich, Fernanda Marzano, Laurent Duda, Reza Younesi, Kristina Edström, and Daniel Brandell. (2020), How Mn/Ni Ordering Controls Electrochemical Performance in High-Voltage Spinel $\text{LiNi}_{0.44}\text{Mn}_{1.56}\text{O}_4$ with Fixed Oxygen Content, ACS Applied Energy Materials, (6), 6001-6013, DOI: 10.1021/acsaem.0c01075 2020, 3, 6001-6013.

[6] Md-Jamal Uddin, Pankaj Kumar Alaboina, Sung-Jin Cho (2017), Nanostructured Cathode Materials Synthesis for Lithium-Ion Batteries, This manuscript version is made available under the Elsevier user license.

[7] Ying Wang and Guozhong Cao (2008), Developments in Nanostructured Cathode Materials for High Performance Lithium-Ion Batteries, Advanced Materials, 2 (0), 2251-2269. DOI: 10.1002/adma.200702242.

[8] R. Pitchai, V. Thavasi, S.G. Mhaisalkar, S. Ramakrishna, (2011), Nanostructured cathode materials: a key for better performance in Li-ion batteries, J. Mater. Chem. 21, 11040-11051. doi:10.1039/c1jm10857c.

[9] Burak Aktekin, Mario Valvo, Ronald I. Smith, Magnus H. Sørby, Fernanda Lodi Marzano, Wolfgang Zipprich, Daniel Brandell, Kristina Edström, and William R. Brant (2019), Cation Ordering and Oxygen Release in $\text{LiNi}_{0.5}\text{-xMn}_{1.5}\text{+xO}_4$ y (LNMO): In Situ Neutron Diffraction and Performance in Li Ion Full Cells, ACS Applied Energy Materials, 2 (5), 3323-3335. DOI: 10.1021/acsaem.8b02217

[10] Dayana Capcha (2016), “Síntesis y caracterización de materiales catódicos tipo $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ con tamaño de partícula variable, obtenidos por la ruta pirolítico/atranó, para su evaluación preliminar en una celda de ion litio”, Trabajo dirigido, Universidad Mayor de San Andrés, Repositorio Institucional Universidad Mayor de San Andrés, <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/18171>.



[11] Ou Sha, Shaoliang Wang a , Zhi Qiao, Wei Yuan, Zhiyuan Tang, QiangXu, Yanjun Su. (2012), Synthesis of spinel $\text{LiNi}_0.5\text{Mn}_1.5\text{O}_4$ cathode material with excellent cycle stability using ureabased sol-gel method, EISEVIER, 89, 251-253, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.08.126> [12] Max Vargas (2012), “Síntesis y caracterización de materiales en el sistemas Li:Fe:P para su uso como cátodos en baterías de potencia de ion litio”. Trabajo dirigido, Universidad Mayor de San Andrés, Repositorio Institucional Universidad Mayor de San Andrés <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/18084> [13] Quispe Zulema (2017), “Sistema foto catalítico combinado ($\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$) para la degradación de cianuro acuoso con radiación UV y solar”. Tesis de maestría, Universidad Mayor de San Andrés, Repositorio Institucional Universidad Mayor de San Andrés <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/17867>.

Financiamiento

Cooperación Sueca para el Desarrollo - ASDI mediante el Proyecto “Productos minerales no metálicos, nanomateriales y energías renovables” patrocinantes de este trabajo.

Agradecimiento

Mi agradecimiento a la Carrera de Ciencias Químicas, al Instituto de Investigaciones Químicas “IIQ”, Instituto de geología y medio ambiente “IIGEMA”, Instituto de metalurgia y materiales “IIMET-MAT”, al Ph. Gustavo García y a la M Sc. Karen Palabral por todo el apoyo brindado.

Atributo de calidad evaluado en paltas cosecha tratadas con UV-C



C_25_ Ciencia, tecnología e innovación

Atributo de calidad evaluado en paltasposcosecha tratadas con UV-C

Autor: Danielsen Rodriguez Karen, e.mail: karendanielsen92@gmail.com

Co-autores: Campero E. Vanesa, e.mail: vcampero@herrera.unt.edu.ar;
Gomez Marigliano

A. Clelia, e-mail: agomezmarigliano@herrera.unt.edu.ar

Profesora guía: Barrionuevo Ma. Julia, e.mail: mbarrionuevo@herrera.unt.edu.ar

Universidad Nacional de Tucumán (UNT)

Resumen

La palta es un cultivo tropical o subtropical, encontrándose su consumo en pleno auge debido a sus diversas propiedades saludables y nutricionales, siendo una fruta muy apreciada por los consumidores argentinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de la radiación UV-C en el proceso poscosecha de paltas de Tucumán, analizando temporalmente el parámetro color, antes y después de la aplicación del método. Los frutos fueron irradiados en un prototipo compuesto por 3 lámparas UV-C a 8 KJ/m^2 , luego se almacenaron en frío frigorífica a temperatura de $8 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $90 \pm 5\%$, durante 21 días. Se evaluó color en fruto completo a los 0, 7, 14 y 21 usando un espectrorradiómetro Photo Reseach PR715, con una apertura de medida de 1,1 cm de diámetro, iluminante D65 y un ángulo de observación de 2° , en la escala de color CIELab previamente calibrado. Según el espacio de color CIELab, en general se observó que en la muestra control y tratada el eje vertical L^* presentó valores de luminosidad tendientes a opaco. El eje horizontal a^* presentó valores negativos indicando el contenido de tonalidad verdosa y el eje horizontal b^* , perpendicular al eje a^* , presenta valores positivos indicando el contenido de amarillo en las muestras. Se observó una estabilidad de los valores indicando una conservación del color en todas las muestras. A la vista de los resultados, se puede concluir que la radiación UV-C mostró estabilidad de color, conservando la calidad del mismo durante los 21 días de almacenamiento, considerándose una tecnología alternativa, económica, ecológica e inteligente para el tratamiento poscosecha de paltas.

Palabras claves: palta, color, irradiación UV-C.

Introducción

La palta es un cultivo tropical o subtropical, encontrándose su consumo en pleno auge debido a sus diversas propiedades saludables y nutricionales, siendo una fruta muy apreciada por los consumidores argentinos. En términos de ácidos grasos, el perfil nutricional promedio del aguacate consiste en monoinsaturados ($\approx 73\%$), saturados ($\approx 15\%$) y poliinsaturados ($\approx 12\%$), que se asocian con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Dreher & Davenport, 2013; Ramos-Aguilar y otros, 2019). Por otro lado, la creciente popularidad de la palta a nivel mundial ha obligado a mejorar la cadena de distribución y la gestión de la cosecha del fruto. La complejidad de la fisiología de la palta es innegable, complicando la estrategia óptima para identificar la madurez fisiológica, algunos índices de madurez de uso común son la concentración de aceite, la firmeza y la materia seca (MS), que está relacionada con el contenido de aceite (Ncama y otros, 2018). Por otra parte, el uso combinado de dos indicadores de cosecha como la opacidad de la cáscara y contenido de materia seca, para determinar el momento de cosecha de la palta resulta conveniente y de aplicación muy práctica, porque facilita la cosecha en el campo al usar el primero y con el

segundo se comprueba la madurez fisiológica del fruto. Determinar visualmente la etapa de madurez apropiada para recolectar la palta es muy difícil porque la fruta no exhibe ningún cambio externo notable en la apariencia (Kassim y otros, 2013). Por lo tanto, no es raro encontrar paltas en el mercado con un color poco característico y una cáscara arrugada, especialmente al principio de la temporada (Osuna-García y otros, 2010; Pedreschi y otros, 2014). La determinación del momento de corte es un factor clave para garantizar la adecuada maduración de los frutos, optimizar la calidad y minimizar las pérdidas. El color es el primer atributo de calidad de los alimentos evaluado por los consumidores y, por lo tanto, es un componente importante de la calidad de los alimentos relevante para la aceptación en el mercado. Se requiere una medición rápida y objetiva del color de los alimentos en el control de calidad para la clasificación comercial de los productos. La visión artificial es una técnica prometedora actualmente investigada para la medición del color de los alimentos, especialmente con la capacidad de proporcionar una caracterización detallada de la uniformidad del color a nivel de píxeles (Wu, 2013). Se utilizan diferentes espacios de color para medir el color en los alimentos, y el más utilizado es el

espacio de color $L^*a^*b^*$ debido a la distribución uniforme de los colores y su cercanía a la percepción humana del color. El espacio de color $L^*a^*b^*$, o CIELab, es un estándar internacional para la medición del color, adoptado por la Comisión Internacional de Eclairage (CIE) en 1976. L^* es la componente de luminancia o luminosidad, que va de 0 a 100, y los parámetros a^* (de verde a rojo) y b^* (de azul a amarillo) son las dos componentes cromáticas, que van de -120 a 120. El espacio $L^*a^*b^*$ es perceptualmente uniforme, es decir, la distancia euclidiana entre dos colores diferentes corresponde aproximadamente a la diferencia de color percibida por el ojo humano (Mathias-Rettig, 2014).

Según el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa), la producción nacional no alcanza a abastecer la demanda, importándose desde países de América bajo estrictas normas de sanidad, calidad e inocuidad, respondiendo a los requisitos establecidos por las normas nacionales y protocolos firmados con esos países. Se debe tener un manejo postcosecha preciso con la finalidad de garantizar un producto de calidad y fresca aptos para el consumo. Por lo que la temperatura controlada para el aguacate se convierte en un factor determinante para la conservación de sus propiedades. La

fruta cosechada debe cumplir con una serie de requisitos mínimo respecto al exterior del fruto donde la superficie de la palta debe ser: verde brillante, áspera, de consistencia coriácea y de textura rugosa. (Res. SENASA N° 38/2011).

Las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) durante el transporte y la maduración, son definitivas para garantizar que el fruto llegue al consumidor con las mejores características fisicoquímicas y organolépticas (Benitez, 2021). En los últimos años diferentes autores han estudiado distintos tratamientos físicos alternativos para ser utilizados durante el procesamiento de frutas y verduras con el fin de reducir su carga orgánica. Estos métodos físicos incluyen ultrasonido, alta presión, pulsos eléctricos de alta intensidad, radiación ultravioleta C (UV-C), tratamientos térmicos moderados, oxígeno superatmosférico y tratamientos con gases innovadores (argón, helio, xenón, óxido nitroso). El uso de radiación ultravioleta artificial (UV) a una longitud de onda de 190 a 280 nm (UV-C) tiene poder germicida y puede ser eficaz para la descontaminación de la superficie de frutas y hortalizas. Sin embargo, su eficacia antimicrobiana puede estar influenciada por las características y composición del producto. El tratamiento con UV-C ofrece varias ventajas a los

procesadores de alimentos, ya que no deja residuos, no tiene restricciones legales, es fácil de usar, es letal para la mayoría de los tipos de microorganismos, y no requiere un equipo de seguridad complejo para ser implementado. (Gutierrez, 2016), esta tecnología ha mostrado buenos resultados en el control y conservación poscosecha y control de algunos fitopatógenos asociados a la poscosecha (Dauito y otros, 2013).

Objetivo

Evaluar la aplicación de la radiación UV-C en el proceso poscosecha de paltas de Tucumán, analizando temporalmente el parámetro color, antes y después de la aplicación del método.

Materiales y métodos

Se utilizaron paltas recién cosechadas durante finales de marzo, que fueron cedidas por Jabulissa SRL, ubicado en la localidad de El Sunchal, Tucumán.

Para reducir el deterioro poscosecha, los frutos recolectados fueron inmediatamente conservados a 8 ± 1 °C hasta ser transportados al laboratorio para realizarlos distintos ensayos.

Las paltas recibidas se dividieron en 2 muestras, cada una contenía 40 frutos. Una de ellas sirvió de testigo y a la restante se le aplicó dosis de radiación

UV- C, cada muestra fue dividida en 4 lotes:

1. Muestra Control, en el tiempo 0.
2. Muestra irradiada en el prototipo.
Dosis: 8 kJ/m^2

Equipo utilizado

Para las distintas aplicaciones se usó el prototipo construido para irradiar, ubicado

en el Laboratorio de Física Aplicada, del Departamento de Física, FACET-UNT. El mismo está constituido por tres lámparas UV-C y una cinta transportadora realizando el proceso de manera continua. En la figura 1 puede observarse el interior del prototipo



Fig. 1. Foto del interior del prototipo antes de irradiar las paltas.

Todas las muestras, tanto control como irradiada, se almacenaron a 8 °C y humedad relativa de $90 \pm 5\%$ en

oscuridad, procurando un manejo postcosecha preciso con la finalidad de garantizar un producto de calidad y fresca aptos para el consumo, siendo la temperatura controlada un factor determinante para la conservación de sus propiedades. Cabe destacar, que una vez que se separa de su planta, la palta inicia un proceso de maduración acelerado, provocando la producción de etileno, el cual (junto con otros elementos) es propicio para la proliferación de agentes patógenos que disminuyen la calidad y salubridad.

A cada muestra se le evaluó color en fruto completo a los 0, 7, 14 y 21 días posteriores. En todos los casos se mantuvieron idénticas las condiciones de Presión y Temperatura de las muestras.

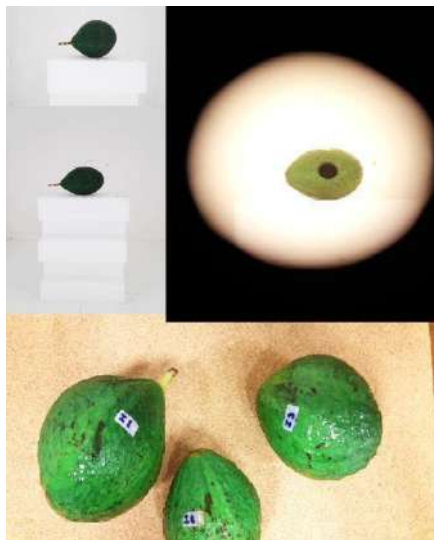


Fig. 2. Determinación de color las muestras de paltas usando el espectrorradiómetro Photo Reseach PR715 i.

Color superficial

El exterior de las paltas es uno de los parámetros de calidad comercial que determina la aceptación por parte del consumidor siendo deseable que la fruta presente una coloración homogénea en toda su superficie: verde brillante, áspera, de consistencia coriácea y de textura rugosa.

El sistema CIE-L*a*b* es empleado frecuentemente como un método versátil y fiable para evaluar el color de frutas y hortalizas, así como también los cambios ocurridos durante su maduración, procesamiento, almacenamiento, etc.

El color superficial de las paltas de los distintos lotes (testigos y con irradiación UV-C) se determinó realizando 6 medición por palta y evaluando 3 frutos por muestra, a los 0, 7, 14 y 21 días; con el espectrorradiómetro Photo Reseach PR715, con una apertura de medida de 1,1 cm de diámetro, iluminante D65 y un ángulo de observación de 2°, en la escala de color CIELab previamente calibrado.

A partir del espectro de reflexión de las muestras se obtuvieron las coordenadas rectangulares CIE-L*a*b*, donde L* es la luminosidad (0, negro; 100, blanco), el parámetro a* indica color verde (-) a rojo (+), mientras que b* varía desde el azul (-) al amarillo.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se observan los valores del parámetro de color L* (luminosidad) en la muestra de palta control y tratada con irradiación UV-C, evaluadas a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 8 °C y humedad relativa de 90±5% en oscuridad.

Las muestras tratadas en el prototipo presentaron una luminosidad similar a la muestra control tanto el día cero como a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento. Inmediatamente después de la aplicación del tratamiento, la luminosidad L* de las paltas tratadas presentaron valores similares a la muestra control, indicando que el efecto del tratamiento UV-C no produce modificaciones considerables en dicho parámetro. De igual manera Rodoni y otros (2015) no encontraron diferencias en la luminosidad y el tono (L* y hab) de pimientos frescos cortados por efecto de la radiación UV-C. Ortiz Araque y otros (2018), tampoco encontraron diferencias en el tono de las frutillas antes y después del tratamiento con radiación UV-C, pero sí una reducción en L*.

Tabla 1: Parámetro de color L* luminosidad en muestra control y tratada de palta a 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento [días]	Muestra	
	Control	Tratada
	L*	
0	36,88 ± 0,89 ^c	37,93±0,45 ^b
7	35,54±1,87 ^{ab}	36,82±1,69 ^{ab}
14	34,59±1,32 ^a	35,74±1,77 ^a
21	36,41±1,16 ^{bc}	36,59±1,97 ^{ab}

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05). Test (LSD Fisher)

Durante el almacenamiento refrigerado, los valores L* de las paltas control y las tratadas presentaron similares tendencias. El valor L* se comporta con una tendencia sin variaciones significativas en su valor a lo largo del tiempo, conservándose la luminosidad entre la muestra control y la tratada.

La Figura 3 muestra la evolución de la luminosidad, en la muestra control e irradiada con UV-C. Se observa una leve disminución a los 14 días de almacenamiento, luego presenta un leve aumento manteniéndose prácticamente estable. Evangelista (2015) señaló una elevación de la luminosidad en los frutos irradiados durante su experimento con jabuticabas.

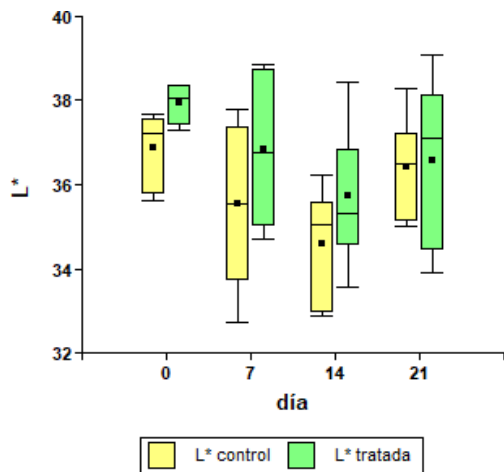


Fig.3. Parámetro de color L* (luminosidad) en muestra de palta control y tratada en el prototipo con UV-C a 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

En la tabla 2 se observa el parámetro de cromaticidad a* a partir de las mediciones en muestra de palta control y tratada.

Tabla 2 Parámetro de cromaticidad a* en muestra de palta control y tratada en el prototipo con UVC a 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento [días]	Muestra	
	Control	Tratada
0	-10,42±0,35 ^a	-10,35±0,46 ^a
7	-10,49±1,80 ^a	-10,22±0,58 ^a
14	-9,81±1,64 ^a	-10,82±0,83 ^a
21	-9,67±1,71 ^a	-10,52±1,47 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test (LSD Fisher)

Los valores del parámetro de cromaticidad a* no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre tratamientos y días de almacenamiento. Del mismo modo que el parámetro luminosidad, a* tuvo un comportamiento estable con tendencia a color verdoso tanto en la muestra control como tratada.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos a partir de las mediciones en palta control y tratada.

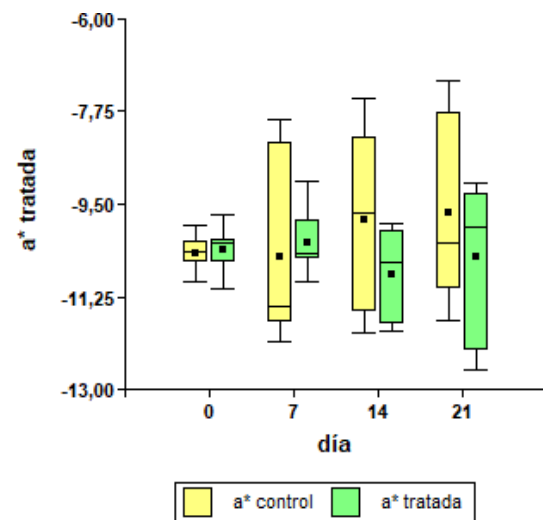


Fig. 4. Parámetro de color a* muestra de palta control e irradiada en el prototipo con UV-C a 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

En la tabla 3 se observa el parámetro de cromaticidad b* a partir de las mediciones en muestras de palta control e irradiada a distintas dosis.

Tabla 3. Parámetro de cromaticidad b^* en muestras de paltas control e irradiada en el prototipo con UV-C a 0, 7 y 14 días de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento [días]	Muestra	
	Control	Tratada
	b^*	
0	17,00±0,95 ^a	17,62±1,11 ^a
7	19,01±2,99 ^a	17,18±0,90 ^a
14	18,71±2,40 ^a	21,80±3,19 ^b
21	18,73±2,71 ^a	20,25±3,68 ^b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Test (LSD Fisher)

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos a partir de las mediciones en palta control e irradiada.

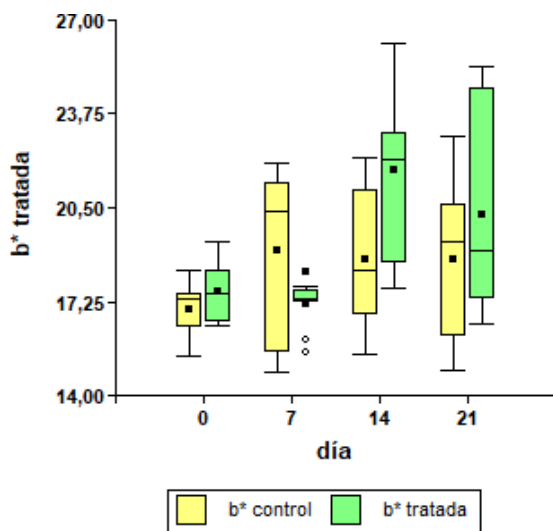


Fig. 5. Parámetro de color b^* en muestras de palta control e irradiada en el prototipo con UV- C a 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

Según el espacio de color CIELab, en general se observa que en la muestra control y tratada el eje vertical L^* presenta valores de luminosidad tendientes a opaco. El eje horizontal a^* presenta valores negativos indicando el contenido de tonalidad verdosa y el eje horizontal b^* , perpendicular al eje a^* , presenta valores positivos indicando el contenido de amarillo en las muestras. Se observa una estabilidad del color en todas las muestras, indicando que la irradiación UV- C no produce efectos considerables sobre las paltas. Se probaron varios métodos con el objetivo de mantener dichas cualidades como Osuna-García y otros (2005), quienes observaron un retraso significativo del proceso de maduración de aguacates 'Hass' al aplicar 1- MCP (200 ppb). Tanto en condiciones de refrigeración como ambiente, las paltas tardaron 5 días más en cambiar naturalmente el color de la piel de verde a negro y en ablandarse. Además, Woolf y otros (2005) y Defilippi y otros (2015) comprobaron que la utilización del 1-MCP disminuía la incidencia de desórdenes fisiológicos internos de los frutos. La aplicación de ceras reduce la actividad metabólica de los frutos y les da brillo, haciéndolos más atractivos para los consumidores.

Conclusión

Es importante realizar aquellas operaciones y tratamientos que permitan extender la vida comercial del producto para poder alcanzar mercados más lejanos sin que se vea comprometida la textura, el color o el sabor de las paltas. A la vista de los resultados, se puede concluir que la radiación UV-C mostró estabilidad de color, conservando la calidad del mismo durante los 21 días de almacenamiento, considerándose una tecnología alternativa, económica, ecológica e inteligente para el tratamiento poscosecha de paltas.

Bibliografía

- Arias Vargas PhD, F., y Montoya, C. (2019). Dynamics of the world avocado Market, 55. 22-35.
- Astudillo, C., y Ordóñez, P. (2018). Parámetros fisicoquímicos del aguacate *Persea americana* Mill. cv. Hass (Lauraceae) producido en Antioquia (Colombia) para exportación. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 383- 392.
- Bill, M., Sivakuman, D., Thompson, A. K. y Korsten, L. (2014). Avocado Fruit Quality Management during the Postharvest Supply Chain. *Food Reviews International*, 30, 169-202.
- Carbajo, M.S.; Pisano Torres Leal, G.J., Silva J., Medina J. (2012). Conservación de palta (*Persea americana* Mill.) "Hass" mediante la aplicación de 1-MCP. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), VII Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, La Plata, Argentina.
- Carvalho, C. P.; Velásquez, M. A.; Van Rooyen, Z. (2014). Determinación del índice mínimo de materia seca para la óptima cosecha del aguacate 'Hass' en Colombia. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 399-406.
- Daiuto, É.R., Vieites, R.L., Tremocoldi, M.A., Carvalho, L.R., y Fumes, J.G. (2013). Postharvest of 'Hass' avocados submitted to UV-C radiation.
- Davies, T. (2005). NIR spectroscopy. An introduction to near infrared spectroscopy. *NIR News*, 16: 9-11.
- Defilippi, B.B., Robledo, P.M., Rivera, S.S., Ferreyra, R.E. (2015). Tecnologías de postcosecha. En: Optimización de la calidad de palta "Hass". *Boletín INIA*, 307, 43-67.
- Díaz, I. (2013). Evaluación de la respuesta de almacenamiento refrigerado de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) de diferentes razas (tesis de grado). Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España.
- Dreher, M.L y Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical*



- Reviews in Food Science and Nutrition, 53, 738–750. Benitez, J., Sánchez, A., Bolaños, C., Bernal, L., Ochoa-Martínez, C., Vélez, C. Sandoval, A. (2021). Cambios fisicoquímicos del aguacate Hass durante el almacenamiento frío y la maduración acelerada. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19, 41-56.
- Evangelista, Z. R. Radiação UV-C e cloreto de cálcio na qualidade póscolheita da jabuticaba „sabará“. (2015). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Agroindustriais). Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.
- González-Fernández, J.J.; Galea, Z.; Alvarez, J.M.; Hormaza, J.I.; López-Núñez, R. (2014). Evaluation of compostion and performance of composts derived from guacamole residues. *Journal of Environmental Management*, 147, 132-139
- Gutiérrez, D., Ruiz López, G., Sgroppo, S., Rodríguez, S. (2016). Uso de la radiación UV-C en el proceso de elaboración de hortalizas de IV gama. *Agrociencia Uruguay*, 20, 7-13.
- Kassim, A., Seyoum Workneh, T., Bezuidenhout, C. (2013). A review on postharvest handling of avocado fruit. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 2385-2402.
- Khayelihle Ncama, L.S., Magwaza, C.A., Poblete-Echeverría, H.H., Nieuwoudt, Samson Z. Tesfay, Asanda Mditshwa, On- tree indexing of „Hass“ avocado fruit by non-destructive assessment of pulp dry matter and oil content. *Biosystems Engineering*, 174(2), 41-49.
- Kumar, B., y Cumbal, L. (2016). UV-Vis, FTIR and antioxidant study of Persea Americana (Avocado) leaf and fruit: A comparison.
- MAPAMA (2018). *Agricultura Ecológica. Estadísticas 2017.*
- Mathias-Rettig, K., AH-Hen, K. (2014) El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro sur*, 42(2), 57-66.
- Millán V., Dionelys, Romero González, L., Brito, M., y Ramos-Villarroel, A.Y. (2015). Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas. *Saber*, 27(3), 454-469.
- Ncama, K., Magwaza, L. S., Poblete-Echeverría, C. A., Nieuwoudt, H. H., Tesfay, S. Z., y Mditshwa, A. (2018). On- tree indexing of „Hass“ avocado fruit by non-destructive assessment of pulp dry matter and oil content“. *Biosystems Engineering*, 174, 41–49.
- Nunes C, Graça A, Salazar M, Abadias M, Usall J. (2011). Potential of UV-C illumination for reducing microbial pathogens in fresh-cut avocado. *International Society for Horticultural Science*. Belgium.

- Ortiz Araque, L., Rodoni, L., Darré, M., Ortiz, C., Civello, P. y Vicente, A. (2018). Cyclic low dose UV-C treatments retain strawberry fruit quality more effectively than conventional pre-storage single high fluence applications". *Food Science and Technology*, 92, 304-31.
- Osuna-García, J. A., Doyon, G., Salazar-García, S., Goenaga, R., y GonzálezDurán, I. J. L. (2010). Effect of harvest date and ripening degree on quality and shelf life of Hass avocado in Mexico. *Fruits* 65, 367–375. doi: 10.1051/fruits/2010031.
- Pedreschi, R., Muñoz, P., Robledo, P., Becerra, C., Defilippi, B. G., van Eekelen, H., et al. (2014). Metabolomics analysis of postharvest ripening heterogeneity of "Hass" avocados. *Postharvest Biol. Technol*, 92, 172–179.
- Pinheiro, J.C., Alegria, C.S., Abreu, M.M., Goncalves, E.M., Silva, C.L. (2016). Evaluation of alternative preservation treatments (water heat treatment, ultrasounds, thermosonication and uv-c radiation) to improve safety and quality of whole tomato. *Food and Bioprocess Technology*, New York, 9(6),924-935.
- Ramírez-Gil J.G., 2018. Avocado wilt complex disease, implications and management in Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Colombia*, 71., 8525–8541. doi: 10.15446/rfna.v71n2.66465.
- Ramos-Aguilar, A., Ornelas-Paz, J., Tapia, L., Ruiz-Cruz, S., Gardea-Bejar, A., Yahia, E., Ornelas-Paz, J. Ibarra-Junquera, V. (2019). The importance of the bioactive compounds of avocado fruit (*Persea americana* Mill) on human health. *Biotechnia*, 21, 154-162. doi: 10.18633/biotechnia.v21i3.1047.
- Rodoni, L., Zaro, M., Hasperué, J., Concellón, A. y Vicente, A. (2015) "UV-C treatments extend the shelf life of fresh-cut peppers by delaying pectin solubilization and inducing local accumulation of phenolics". *Food Science and Technology*, 63(1), 408-414.
- Rodríguez, G., Pérez, D. y Paredes, V. (2017). Cultivo de palta: actividad comercial en la Argentina y Tucumán. Gastos de producción en la campaña 2016. *Boletín N° 133*. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.
- Russo, V., Daiuto, E., Vieites, R., Smith, R. (2014). Postharvest Parameters of the "Fuerte" Avocado When Refrigerated in Different Modified Atmospheres. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38. doi: 10.1111/jfpp.12177.
- Sandoval, J., Hernández, M., Rodríguez, P., y Herrera, A. (2017). Evaluación de variables físico-químicas de importancia en la calidad del fruto de



aguacte (*Persea americana* Mill) cv. Hass producidos en cuatro estados de Colombia. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate, 353-364.

Terao, D., De Carvalho, C.J.S., Benato, E.A., Hashimoto, J.M. (2015). Alternative strategy on control of postharvest diseases of mango (*Mangifera indica* L.) by use of low dose of ultraviolet-C irradiation. *Food Engineering Reviews*, New York, 7(2), 171-175.

WU, D., SUN, D. W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control—A Review. *Trends in Food Science & Technology* 29(1), 5-20.

Zafar, T., Sidhu, J. (2018). *Avocado Production, Processing, and Nutrition*. doi: 10.1002/9781119098935.ch22.

Extracción líquido-líquido de Cobalto (II) desde soluciones acuosas usando líquidos iónicos como diluyentes y Cyanex 272 como extractante



C.25) Ciencia, tecnología e innovación

Extracción líquido-líquido de Cobalto (II) desde soluciones acuosas usando líquidos iónicos como diluyentes y Cyanex 272 como extractante

Autor: Olea, Felipe (felipe.oleac@usach.cl)

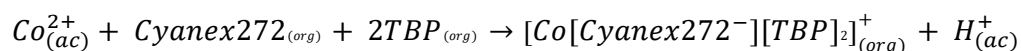
Co-autores: Padilla, Juan (juan.padilla.m@usach.cl); Parraguez, Benjamín (benjamin.parraguez.c@usach.cl); Quijada, Esteban (esteban.quijada@usach.cl); Romero, Julio (julio.romero@usach.cl);

Profesor guía: Quijada, Esteban (esteban.quijada@usach.cl)

Universidad de Santiago de Chile (USACH)

Resumen: Este trabajo tiene como objetivo estudiar el mecanismo de extracción de cobalto (II) desde soluciones acuosas, utilizando Cyanex 272 como extractante y líquidos iónicos como fase diluyente. Donde la extracción de este metal por el método tradicional involucra la utilización de solventes orgánicos los cuales presentan serios riesgos tanto para la salud humana como para el medioambiente. Buscando una alternativa mucho más sustentable, se utilizó un extractante orgánico convencional altamente selectivo, Cyanex 272, disuelto en el líquido iónico (IL) a base de imidazolio (1-octil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)amida ([omim][TF₂N]) y a base de fosfonio, Trihexil(tetradecil) fosfonio bis(trifluorometilsulfonil)amida ([P₆₆₆₁₄][TF₂N]) comparando el efecto de la fase diluyente sobre la extracción de cobalto (II).

En los estudios de la extracción por solventes se encontró que el extractante Cyanex 272 es insoluble en el líquido iónico a base de imidazolio, por lo que se agregó un modificante de fase tributilfosfato (TBP) para formar una sola fase, para el caso del [P₆₆₆₁₄][TF₂N], no fue necesario la adición de este modificador. La extracción de cobalto (II) utilizando el Cyanex 272 en [omim][TF₂N] generó una nula extracción de cobalto (II), pero con la adición del modificador TBP produjo un efecto sinérgico con el Cyanex 272 mejorando la extracción hasta un 25.2 % de Cobalto (II). Finalmente, la estequiometría de reacción en la extracción de cobalto (II) utilizando Cyanex 272 y líquido iónico [omim][TF₂N] con TBP queda de la siguiente forma:



Palabras Claves: Cobalto, diluyentes, separación.



• Introducción

En la actualidad, el Cobalto (Co) es uno de los elementos más estratégicos e imprescindibles para el desarrollo tecnológico y para conseguir la neutralidad del CO₂ en 2050, ya que este metal es ocupado en las baterías ion-litio (Li_{1-x}_yMn_xCo_yO₂). Se espera que la demanda de vehículos eléctricos se triplicará la próxima década y con esto la incertidumbre por el suministro de cobalto, debido a problemas de concentración y de suministro, ya que se produce principalmente en la República democrática del Congo y en China (Alves Dias et al., 2018; Fu et al., 2020). Según el reporte del Sernageomim, Chile cuenta con la presencia de minerales de cobalto, los que tienen la posibilidad de ser extraídos en una mediana escala (Townley et al., 2017), por lo cual es de gran interés su explotación dada su importancia en la economía nacional y global.

Un 55% del cobalto a nivel mundial se encuentra en los minerales de laterita junto al níquel (Sole, 2018), en la que es posible recuperar este metal a partir de la aplicación la lixiviación ácida a presión, en donde ciertos estudios muestran que es posible utilizarla incluso con una baja

concentración en sulfuros de cobre, cobalto y níquel (Huang et al., 2007; Moskalyk & Alfantazi, 2000; Whittington et al., 2003). La separación selectiva de cobalto y níquel es difícil debido a que se encuentran adyacentemente en la tabla periódica, y por lo cual tienen una gran similitud química, lo que repercute en su separación (Rodríguez-Iznaga et al., 2018; S. Wang, 2006).

Para evitar algunas etapas de oxidación y/o precipitación al lixiviado de laterita que contiene cobalto, níquel, hierro y manganeso (L. Y. Wang & Lee, 2017) es que se ha propuesto el uso de una extracción por solventes directa desde el lixiviado (SXD) con el objetivo de reducir los costos capitales y operacionales en comparación a la precipitación (Cheng & Urbani, 2005). Existen diferentes extractantes utilizados en la separación selectiva de cobalto sobre níquel tales como el ácido di(2-etilhexilo) fosfórico (D2EHPA), ácido 2-etil-hexil-fosfónico (PC88A), ácido bis(2,4,4-trimetilpentilo) fosfínico (Cyanex 272), o el fosfato de tributilo (TBP), los cuales han sido estudiados extensamente, reportándose valores de selectividad Co/Ni (α) menores a 60 (Swain et al., 2015).



Los diluyentes orgánicos convencionales como el queroseno causan problemas de salud (Ritchie et al., 2003), seguridad laboral y medioambientales debido a su inflamabilidad y volatilidad. Los líquidos iónicos (LIs) han sido utilizados como una alternativa potencial de reemplazo para estos diluyentes orgánicos convencionales dadas sus favorables propiedades físico-químicas (Billard et al., 2011; Dietz, 2006; Dietz & Hawkins, 2019; Kubota & Goto, 2006; Rogers & Seddon, 2003; Zaijun et al., 2007), como su no inflamabilidad, alta estabilidad térmica, son líquidos en un amplio rango de temperatura, poseen nula presión de vapor y son considerados disolventes de diseño debido a la posibilidad de cambiar sus grupos funcionales para una aplicación específica (Kubota & Goto, 2006; Wytze Meindersma et al., 2007). Estos pueden ser ocupados como diluyentes de otros extractantes mejorando la extracción (Baba et al., 2011; Lertlapwasin et al., 2010; E. Quijada-Maldonado et al., 2017; Raut & Mohapatra, 2015; Turanov et al., 2020; Wei et al., 2003) y la selectividad (E. Quijada-Maldonado, Allain, et al., 2020; Sengupta et al., 2012), de la misma forma se han utilizado LIs como extractante aumentando la extracción o la selectividad (Gao et al., 2015; Mishra & Devi, 2018; Shi et al., 2014)

y también se han utilizado dos LIs, en donde uno actúa como diluyente y otro como extractante (Sun & Waters, 2014; Zhao et al., 2017). Si bien los LIs presentan desventajas como una alta viscosidad y pérdida de LI hacia la fase acuosa (Baba et al., 2011; Billard et al., 2011), estos pueden ser justificados en la extracción de metales por una mejora en la extracción y de selectividad comparado con los diluyentes moleculares (Esteban Quijada-Maldonado et al., 2020).

Con respecto a la extracción de cobalto utilizando líquidos iónicos se ha utilizado el Oleato de tetraoctilfosfonio $[P_{888}][Oleato]$ para la extracción de cobalto desde una solución acuosa modelo alcanzando extracciones superiores al 90% (A. Othman et al., 2019) y con una muy baja presencia de LI en el refinado de 26 [mg/L], cantidad que es muy baja cuando se compara con respecto a otros extractantes comerciales como D2EHPA o TBP (1000 [mg/L]) (Lee et al., 2011). En tanto, para la extracción selectiva de cobalto, Chaverra y colaboradores ha estudiado la extracción de cobalto utilizando diferentes LIs en base a fosfonio $[P_{8,8,8,n}][Cl]$ (con $n=5, 8, 14, 16$). De acuerdo a sus resultados la extracción ocurre mediante un intercambio aniónico, en el que participan dos moles de fosfonio en la extracción de cobalto, también en



este trabajo estudio el efecto de la concentración de ácido clorhídrico, en el que se obtiene porcentajes de extracción cercanos al 98% cuando se ocupan una concentración 5M, y en el rango estudiado la extracción de níquel es nula debido a que no forma complejos clorados, por lo cual el proceso se puede considerar muy selectivo (Chaverra et al., 2020), a pesar de los buenos resultados de selectividad es necesario que este posea altas concentraciones de cloruros para llevar a cabo la extracción con lo cual se pueden presentar problemas de corrosión en los equipos y además el metal no puede provenir de otro medio acuoso, por ejemplo, con nitratos porque se puede generar una contaminación del LI por intercambio aniónico (Dupont et al., 2015).

De acuerdo con lo anterior, es posible plantear una ruta hidrometalúrgica para la extracción selectiva de cobalto (II) desde una fase que simula una solución de lixiviación con ácido sulfúrico utilizando extractantes comerciales o LIs extractantes que están disueltos en un líquido iónico diluyente.

Por lo tanto es necesario estudiar la dependencia de variables de operación como la correcta elección del líquido iónico, pH y concentración del extractante ácido en

la solución acuosa (Chaverra D., 2020), pero como se ha evidenciado la mayoría de estos mecanismos se realizan en medios clorados, por lo cual es necesario desarrollar una metodología para la determinación de la estequiometría de extracción en medio sulfato utilizando el extractante comercial Cyanex 272 y los líquidos iónicos específicamente el 1-octil-3-metilimidazolio

bis(trifluorometilsulfonil)amida ([omim][TF₂N]) o Trihexilt(tetra)decil fosfoniobis(trifluorometilsulfonil)amida ([P₆₆₆₁₄][TF₂N]), para así estudiar el reemplazo de los solventes orgánicos convencionales.

• **Objetivos**

Objetivo general

Evaluar el mecanismo de extracción de cobalto desde soluciones acuosas diferentes líquidos iónicos como diluyentes y Cyanex 272 como extractante.

Objetivos específicos

1. Analizar el pH de extracción en la extracción de cobalto desde soluciones acuosas cuando se utiliza un líquido iónico como diluyente y Cyanex 272 como extractante.
2. Evaluar el efecto de diferentes líquidos iónicos como diluyentes en la extracción de cobalto desde soluciones acuosas.

3. Evaluar experimentalmente la estequiometría de extracción cuando se utiliza Cyanex 272 y un líquido iónico como diluyente.

• Materiales y métodos

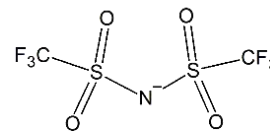
Extracción por solvente

Se utilizará el extractante ácido comercial Cyanex 272 que estarán disueltos en los ILs con cationes en base a fosfonio e imidazolio (Grande et al., 2015; Park et al., 2013; Reyna-González et al., 2013; Schaltin et al., 2007) junto a los aniones de $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ debido a que este anión confiere una alta hidrofobicidad al IL.

Tabla 1. Nombres y estructuras de los líquidos iónicos utilizados.

Nombre Cation u anión	Estructura
1-octil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida (Omim)	
Trihexil(tetradecil)fosfonio ($\text{P}_{6,6,6,14}$)	

bis(trifluorometilsulfonil)imida (Tf_2N)



Todas las muestras preparadas se utilizarán una razón de orgánico/acuoso 1:1, utilizando 2 [mL] de cada una de ellas. En esta oportunidad solo el Cobalto (II) estará presente en la fase acuosa a una concentración de 1000 ppm. Las fases serán agitadas y centrifugadas por 40 minutos en cada etapa para alcanzar el equilibrio químico y su posterior separación completa de fases. La fase acuosa recuperada será diluida con agua ultrapura milli-Q ($18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$) para ser enviada a medición en un espectrofotómetro de emisión atómica plasma inductivamente acoplado (ICP-AES), tal como se resumen en la siguiente Figura 1.

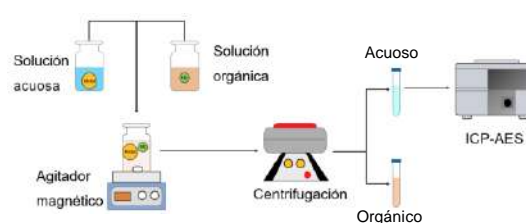


Figura 1. Diagrama de la extracción por solventes.

A partir de los resultados obtenidos, se obtendrá la constante de distribución (D) y el porcentaje de extracción ($\%E$):

$$D = \frac{[M]_{(org)}^{eq}}{[M]_{(ac)}^{eq}} \quad (1)$$

$$\%E = \frac{D}{D + (V_{org}/V_{ac})} \cdot 100 \quad (2)$$

En donde, $[M]_{(org)}^{eq}$ y $[M]_{(ac)}^{eq}$ son las concentraciones molares en el equilibrio del metal en la fase orgánica y acuosa respectivamente. V_{org} y V_{ac} son los volúmenes de las fases orgánica y acuosa respectivamente usados en la extracción líquido-líquido.

Las variables de operación para extraer el cobalto son:

- Modificación de la concentración del extractante disuelto en el LI.
- Efecto del pH inicial.
- Diferentes ILs como fase diluyente.

Determinación de la estequiometría según el método de las pendientes

La determinación de la estequiometría será llevada a cabo por el mecanismo de la pendiente, para esto es necesario ir variando la concentración del extractante a un pH inicial constante del que se obtendrá la constante de reparto del metal y se medirá el pH de equilibrio, de esto se graficará la $\log(k_c)$ vs $\log([HE]) + pH$ (ver Figura 2), en donde la pendiente corresponderá a la cantidad de moléculas

de extractante que participan en la extracción del metal y el coeficiente de posición representa la espontaneidad de la extracción para ese extractante disuelto en una cierta fase orgánica.

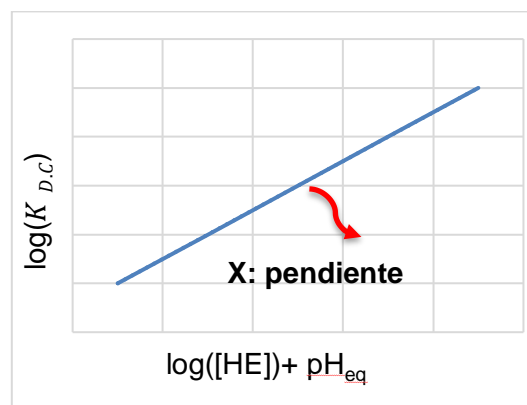


Figura 2. Representación gráfica de la obtención del número de extractantes ácidos involucrados en la extracción de metal.

Resultados y discusión

Estudio de solubilidad del extractante en la fase orgánica del IL.

La adición del extractante Cyanex 272 y el IL $[omim][Tf_2N]$ en un 40% V/V produce la generación de una segunda fase, lo cual es perjudicial para los procesos de extracción por solventes. Esto ocurre cuando el diluyente no logra disolver al extractante en la fase orgánica y con ello es incapaz de formar el complejo metálico, en este caso es necesario la adición de un agente modificador que cumplirá la función formar



una sola fase mejorando la solubilidad entre el extractante y el diluyente en la fase orgánica. Los modificadores, generalmente, son alcoholes de cadena larga de ocho a diez carbonos. Sin embargo, estas pueden presentar ciertos inconvenientes ya que poseen una cierta solubilidad en la fase acuosa. Además de los alcoholes de cadena larga, se puede utilizar, el tributilfosfato (TBP) como modificador. Su utilización es aconsejable en algunos casos, porque puede presentar también propiedades sinérgicas en conjunto con ácidos alquilfosfóricos.

Por lo mencionado anteriormente se evaluó el efecto del modificador utilizando TBP y dodecanol para analizar una mejora en la extracción, su estructura se muestra en la tabla 5.2:

Tabla 5.2. Estudio de la solubilidad del Cyanex 272 en el IL [omim][Tf₂N] en presencia de diferentes modificantes.

Modificador	Doble fase orgánica
Sin modificador	SI
Dodecanol	SI
TBP	NO

El extractante Cyanex 272 con el líquido iónico [omim][TF₂N] forma una segunda

fase el cual al añadir dodecanol no mejoró la solubilidad entre las fases, pero al adicionar Tributilfosfato (TBP) a la fase orgánica esta mejoró la solubilidad formando casi de forma instantánea una única fase orgánica, por lo cual debido a los estudios previamente vistos se utilizó TBP como modificador en la extracción de Cobalto (II) con Cyanex 272 como extractante y [omim][TF₂N].

SX de Co (II) con Cyanex 272 y LI [omim][TF₂N] y TBP como modificador

La tabla 5.3. presenta una matriz con diferentes concentraciones de extractante y modificador con una composición de Cyanex 272 entre 16,05 y 26,75 %v/v mientras que el TBP tuvo una composición entre 13,16 y 54,83 %v/v en la fase orgánica donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5.3. Extracción de Cobalto (%) utilizando Cyanex 272 en el IL [omim][Tf₂N] utilizando como modificador TBP.

Relación molar Cyanex 272 /TBP	Concentración Cyanex		
	16%	21%	27%
	v/v	v/v	v/v
1:1	5,48	8,07	15,38
1:1.5	11,20	8,99	18,92
1:2.5	8,17	9,23	22,70

Con la adición de TBP como agente modificante se mejoró sustancialmente la extracción con el líquido iónico [omim][TF₂N] donde el efecto sinérgico del TBP junto con el extractante arroja una extracción máxima de cobalto de un 22,7%. También el aumento de la concentración de extractante aumento la extracción de Cobalto.

Probablemente el TBP cumplió la función de agente modificador y agente sinérgico, donde en un principio debió actuar como diluyente mejorando la solubilidad entre el extractante y líquido iónico, y a su vez en la formación del complejo organometálico el TBP sustituye las moléculas de agua que pueden rodear al complejo y dando paso

de esta forma a un complejo mucho más hidrofóbico (Chaverra et al., 2020)

Estequiometría de extracción usando Cyanex 272, disuelto en [omim][TF₂N] y TBP.

De acuerdo con la Figura 3. la pendiente de la ecuación dio un valor de 1.1 la cual se esperaba un valor cercano a 2, el valor de la pendiente indica que el Co (II) por un lado se coordina con el Cyanex 272 y otro ligando aniónico. Posiblemente este otro ligando sea el anión del LI [TF₂N]⁻, esto quiere decir básicamente que, por cada mol de metal en el intercambio catiónico, reacciona 1 mol de extractante Cyanex 272 junto a 1 mol de [omim][TF₂N] para la formación de un complejo neutro. Esto se debe evaluar si es que con otros LI la estequiometría se comportará acorde al modelo planteado, ya que existe evidencia de que LI con cierto tipo de ligandos, interactúan en la estequiometría (E. Quijada-Maldonado, Olea, et al., 2020).

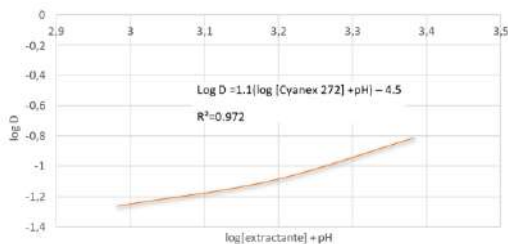


Figura 3. Estequiometría de extracción del Cyanex 272 cuando se encuentra disuelto en [omim][TF₂N] y TBP.

SX de Cyanex 272 Y LI [P₆₆₆₁₄][TF₂N]

A continuación, en la tabla 5.4. se muestra el % de extracción de cobalto con Cyanex 272 disuelto en el LI [P₆₆₆₁₄][TF₂N] con pH variable y una concentración constante de extractante al 25% v/v Cyanex 272 en la fase orgánica.

Tabla 5.4. pH inicial y final, junto al %E de cobalto usando Cyanex 272 con [P₆₆₆₁₄][TF₂N].

	pH inicial	pH final	%E
Blanco	5.80	2.92	-----
1	6.11	2.93	6.00
2	6.31	2.94	6.21
3	6.69	2.97	13.79
4	7.01	2.98	3.00

Según los resultados indican que a diferentes pH iniciales se esperaba que alguna de las muestras se acercara al rango entre pH de 4.5 y 5, donde el pH

resultante prácticamente se mantuvo constante en tres, con una extracción máxima de 13,79 % a un pH inicial de 6,69, donde probablemente las concentraciones de extractante eran demasiado altas por lo que se acidificó la solución acuosa hasta llegar al pH mencionado. Otra alternativa es basificar la fase ya sea antes o después de la agitación para evitar este problema operacional, donde mantener el pH dentro del rango en función de la concentración del Cyanex 272 es la principal problemática. Otra opción es que el líquido iónico también tenga la capacidad sin el extractante de bajar el pH de la solución, por lo que estos parámetros serán tópicos de estudios más adelante.

Si bien el porcentaje de extracción con [P₆₆₆₁₄][TF₂N] (13,8 %) fueron menores a la fase TBP-Cyanex 272-[omim][TF₂N], (22,7%), este líquido iónico no requiere la adición de un agente modificante.

Estequiometría de Co (II) con Cyanex 272-[omim][TF₂N]-TBP

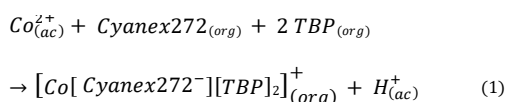
Como se puede apreciar en la figura 4. donde la linealización de la estequiometría de extracción se obtuvo R² de 0,9573 y con una pendiente de 1,99, dando cuenta que el TBP interactúa en la estequiometría de reacción, desplazando moléculas de agua y sustituyéndolas por moléculas de TBP

dándole un carácter más hidrofóbico al complejo (X. Wang et al., 2018).



Figura 4. Estequiometría TBP en la SX de Co - Cyanex 272 / [P₆₆₆₁₄][Tf₂N].

Por lo cual sabiendo lo anterior donde la pendiente obtenida del Cyanex 272 es 1.1, que se desprotona para la formación del complejo y junto a la estequiometría del TBP, donde el coeficiente estequiométrico fue de 1.9 se propone el siguiente mecanismo según muestra la siguiente ecuación:



Conclusiones

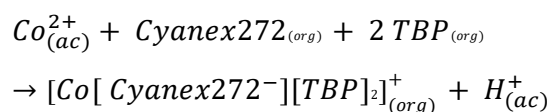
Para el estudio de la estequiometría del cobalto (II) desde soluciones acuosas utilizando el extractante comercial Cyanex 272 y líquidos iónicos como diluyentes se concluyó:

La extracción de cobalto con Cyanex 272-[omim][Tf₂N] es 0% de extracción, debido a que el LI no se disolvió con el extractante en la fase orgánica.

Con la adición del TBP, la SX de Co (II) con Cyanex 272-[omim][Tf₂N] se obtuvo una extracción máxima de 25.2%.

En la extracción de Co (II) con Cyanex 272-[P_{6,6,6,14}][Tf₂N] obtuvo una extracción de 13.8% sin la necesidad de un modificador de fase.

La estequiometría propuesta de la SX de Cobalto (II) con Cyanex 272-[omim][Tf₂N]-TBP es:



• Bibliografía

- A. Othman, E., G.J. Van der Ham, A., Miedema, H., & R.A. Kersten, S. (2019). Ionic Liquid-Based Process Development for Cobalt Recovery from Aqueous Streams. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 10(2). <https://doi.org/10.35248/2157-7048.19.10.397>
- Alves Dias, P., Darina, B., Claudiu, P., & Nikolaos, A. (2018). Cobalt: demand-supply balances in the transition to electric mobility | EU Science Hub. In *European Union / European Atomic Energy Community*. <https://doi.org/10.2760/97710>



- Baba, Y., Kubota, F., Kamiya, N., Goto, M., Aba, Y. B., Ubota, F. K., Amiya, N. K., Oto, M. G., Baba, Y., Kubota, F., Kamiya, N., Goto, M., Aba, Y. B., Ubota, F. K., Amiya, N. K., & Oto, M. G. (2011). Recent advances in extraction and separation of rare-earth metals using ionic liquids. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 44(10 SPEC. ISSUE), 679–685. <https://doi.org/10.1252/jcej.10we279>
- Billard, I., Ouadi, A., & Gaillard, C. (2011). Liquid-liquid extraction of actinides, lanthanides, and fission products by use of ionic liquids: From discovery to understanding. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(6), 1555–1566. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4478-x>
- Chaverra, D. E., Restrepo-Baena, O. J., & Ruiz, M. C. (2020). Cobalt Extraction from Sulfate/Chloride Media with Trioctyl(alkyl)phosphonium Chloride Ionic Liquids. *ACS Omega*, 5(11), 5643–5650. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03266>
- Cheng, C., & Urbani, M. D. (2005). The recovery of nickel and cobalt from leach solutions by solvent extraction: Process overview, recent research and development. *Proceedings of ISEC 2005, January 2005*, 503–526. https://www.researchgate.net/publication/284143853_The_recovery_of_nickel_and_cobalt_from_leach_solutions_by_solvent_extraction_Process_overview_recent_research_and_development
- Dietz, M. L. (2006). Ionic liquids as extraction solvents: Where do we stand? *Separation Science and Technology*, 41(10), 2047–2063. <https://doi.org/10.1080/01496390600743144>
- Dietz, M. L., & Hawkins, C. A. (2019). Metal ion extraction with ionic liquids. *Liquid-Phase Extraction*, 539–564. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00018-9>
- Dupont, D., Depuydt, D., & Binnemans, K. (2015). Overview of the Effect of Salts on Biphasic Ionic Liquid/Water Solvent Extraction Systems: Anion Exchange, Mutual Solubility, and Thermomorphic Properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(22), 6747–6757. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02980>
- Fu, X., Beatty, D. N., Gaustad, G. G., Ceder, G., Roth, R., Kirchain, R. E., Bustamante, M., Babbitt, C., & Olivetti, E. A. (2020). Perspectives on Cobalt



- Supply through 2030 in the Face of Changing Demand. *Environmental Science and Technology*, 54(5), 2985–2993.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04975>
- Gao, D., Yu, X., Guo, Y., Wang, S., Liu, M., Deng, T., Chen, Y., & Belzile, N. (2015). Extraction of lithium from salt lake brine with triisobutyl phosphate in ionic liquid and kerosene. *Chemical Research in Chinese Universities*, 31(4), 621–626.
<https://doi.org/10.1007/s40242-015-4376-z>
- Grande, L., Von Zamory, J., Koch, S. L., Kalhoff, J., Paillard, E., & Passerini, S. (2015). Homogeneous Lithium Electrodeposition with Pyrrolidinium-Based Ionic Liquid Electrolytes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(10), 5950–5958.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b00209>
- Huang, K., Li, Q., & Chen, J. (2007). Recovery of copper, nickel and cobalt from acidic pressure leaching solutions of low-grade sulfide flotation concentrates. *Minerals Engineering*, 20(7), 722–728.
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.01.011>
- Kubota, F., & Goto, M. (2006). Application of ionic liquids to solvent extraction. *Solvent Extraction Research and Development*, 13(September), 23–36.
- Lee, P.-C., Li, C.-W., Chen, J.-Y., Li, Y.-S., & Chen, S.-S. (2011). Dissolution of D2EHPA in liquid–liquid extraction process: Implication on metal removal and organic content of the treated water. *Water Research*, 45(18), 5953–5958.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.054>
- Lertlapwasin, R., Bhawawet, N., Imyim, A., & Fuangswasdi, S. (2010). Ionic liquid extraction of heavy metal ions by 2-aminothiophenol in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and their association constants. *Separation and Purification Technology*, 72(1), 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.01.004>
- Mishra, B. B., & Devi, N. (2018). Solvent extraction and separation of europium (III) using a phosphonium ionic liquid and an organophosphorus extractant-A comparative study. *Journal of Molecular Liquids*, 271(lii), 389–396.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.160>
- Moskalyk, R. R., & Alfantazi, A. M. (2000).



- Review of present cobalt recovery practice. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 17(4), 205–216. <https://doi.org/10.1007/BF03403236>
- Park, J., Lee, C. K., Kwon, K., & Kim, H. (2013). Electrodeposition of silicon from 1-butyl-3-methyl-pyridinium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide ionic liquid. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(3), 4206–4214.
- Quijada-Maldonado, E., Allain, A., Pérez, B., Merlet, G., Cabezas, R., Tapia, R., & Romero, J. (2020). Selective liquid-liquid extraction of molybdenum (VI) and rhenium (VII) from a synthetic pregnant leach solution: Comparison between extractants and diluents. *Minerals Engineering*, 145(October 2019), 106060. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2019.106060>
- Quijada-Maldonado, E., Olea, F., Sepúlveda, R., Castillo, J., Cabezas, R., Merlet, G., & Romero, J. (2020). Possibilities and challenges for ionic liquids in hydrometallurgy. *Separation and Purification Technology*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117289>
- Quijada-Maldonado, E., Torres, M. J. J., & Romero, J. (2017). Solvent extraction of molybdenum (VI) from aqueous solution using ionic liquids as diluents. *Separation and Purification Technology*, 177(Vi), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.12.045>
- Quijada-Maldonado, Esteban, Olea, F., Sepúlveda, R., Castillo, J., Cabezas, R., Merlet, G., & Romero, J. (2020). Possibilities and challenges for ionic liquids in hydrometallurgy. *Separation and Purification Technology*, 251(January), 117289. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117289>
- Raut, D. R., & Mohapatra, P. K. (2015). Extraction of Uranyl Ion Using 2-Thenoyltrifluoro Acetone (HTTA) in Room Temperature Ionic Liquids. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 50(3), 380–386. <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.973523>
- Reyna-González, J. M., Reyes-López, J. C., & Aguilar-Martínez, M. (2013). Silver and silver-copper electrodeposition from a pyridinium-based ionic liquid. *Electrochimica Acta*, 94, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.09.035>
- Ritchie, G. D., Still, K. R., Rossi, J.,



- Bekkedal, M. Y. V., Bobb, A. J., & Arfsten, D. P. (2003). Biological and health effects of exposure to kerosene-based jet fuels and performance additives. In *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 6, Issue 4).
<https://doi.org/10.1080/10937400306473>
- Rodríguez-Iznaga, I., Rodríguez-Fuentes, G., & Petranovskii, V. (2018). Ammonium modified natural clinoptilolite to remove manganese, cobalt and nickel ions from wastewater: Favorable conditions to the modification and selectivity to the cations. *Microporous and Mesoporous Materials*, 255, 200–210.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.07.034>
- Rogers, R. D., & Seddon, K. R. (2003). Ionic Liquids - Solvents of the Future? *Science*, 302(5646), 792–793.
<https://doi.org/10.1126/science.1090313>
- Schaltin, S., Nockemann, P., Thijs, B., Binnemans, K., & Franssaer, J. (2007). Influence of the anion on the electrodeposition of cobalt from imidazolium ionic liquids. *Electrochemical and Solid-State Letters*, 10(10), 1010–1013.
<https://doi.org/10.1149/1.2760185>
- Sengupta, A., Mohapatra, P. K., Iqbal, M., Huskens, J., & Verboom, W. (2012). A highly efficient solvent system containing functionalized diglycolamides and an ionic liquid for americium recovery from radioactive wastes. *Dalton Transactions*, 41(23), 6970–6979.
<https://doi.org/10.1039/c2dt12364a>
- Shi, C., Duan, D., Jia, Y., & Jing, Y. (2014). A highly efficient solvent system containing ionic liquid in tributyl phosphate for lithium ion extraction. *Journal of Molecular Liquids*, 200(PB), 191–195.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.10.004>
- Sole, K. C. (2018). The Evolution of Cobalt–Nickel Separation and Purification Technologies: Fifty Years of Solvent Extraction and Ion Exchange. *The Minerals, Metals & Materials Series*, 1167–1191.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-95022-8_95
- Sun, X., & Waters, K. E. (2014). The adjustable synergistic effects between acid-base coupling bifunctional ionic liquid extractants for rare earth separation. *AIChE Journal*, 60(11), 3450–3460.



- 3859–3868.
<https://doi.org/10.1002/aic.14563>
- Swain, B., Cho, S.-S., Lee, G. H., Lee, C. G., & Uhm, S. (2015). Extraction/Separation of Cobalt by Solvent Extraction: A Review. *Applied Chemistry for Engineering*, 26(6), 631–639.
<https://doi.org/10.14478/ace.2015.1120>
- Townley, B., Díaz, A., & Luca, R. (2017). *Cobalt mineral resources in Chile exploration and mining potential*. http://renova2.cl/wp-content/uploads/2018/08/PotentialCobaltResources-Chile_vEnglish.pdf
- Turanov, A. N., Karandashev, V. K., & Boltoeva, M. (2020). Solvent extraction of intra-lanthanides using a mixture of TBP and TODGA in ionic liquid. *Hydrometallurgy*, 195(May), 105367.
<https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105367>
- Wang, L. Y., & Lee, M. S. (2017). Separation of Co(II) and Ni(II) from chloride leach solution of nickel laterite ore by solvent extraction with Cyanex 301. *International Journal of Mineral Processing*, 166, 45–52.
<https://doi.org/10.1016/j.minpro.2017.07.004>
- Wang, S. (2006). Cobalt - Its recovery, recycling, and application. In *JOM* (Vol. 58, Issue 10, pp. 47–50).
<https://doi.org/10.1007/s11837-006-0201-y>
- Wang, X., Jing, Y., Liu, H., Yao, Y., Shi, C., Xiao, J., Wang, S., & Jia, Y. (2018). Extraction of lithium from salt lake brines by bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide-based ionic liquids. *Chemical Physics Letters*, 707, 8–12.
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.07.030>
- Wei, G., Chen, J.-C., & Yang, Z. (2003). Studies on Liquid/liquid Extraction of Copper Ion with Room Temperature Ionic Liquid. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 50(6), 1123–1130.
<https://doi.org/10.1002/jccs.200300159>
- Whittington, B. I., McDonald, R. G., Johnson, J. A., & Muir, D. M. (2003). Pressure acid leaching of arid-region nickel laterite ore: Part I: Effect of water quality. *Hydrometallurgy*, 70(1–3), 31–46.
[https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00043-4](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00043-4)
- Wytze Meindersma, G., Galán Sánchez, L. M., Hansmeier, A. R., & De Haan, A. B. (2007). Application of task-specific



Ionic liquids for intensified separations. *Monatshefte Fur Chemie*, 138(11), 1125–1136.
<https://doi.org/10.1007/s00706-007-0757-4>

Zaijun, L., Jie, C., Haixia, S., & Jiaomai, P. (2007). Advance of Room Temperature Ionic Liquid as Solvent for Extraction and Separation. *Reviews in Analytical Chemistry*, 26(2), 109–153.
<https://doi.org/10.1515/REVAC.2007.26.2.109>

Zhao, Z., Lyu, H., Guo, X., Dong, Y., Wang, Y., & Sun, X. (2017). The synergistic extraction by combined ammonium and phosphonium type ionic liquids for rare earth elements separation. *Hydrometallurgy*, 174(February), 234–247.
<https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2017.05.020>

Agradecimientos

Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico FONDECYT regular 1211234

Programa de becas DOCTORADO NACIONAL/2019- 21191785 (ANID)

Laboratorio de Intensificación de Procesos de Separación (SPI), Universidad de Santiago de Chile.

Vicerrectoría de postgrado. Universidad de Santiago de Chile

Financiamiento

Vicerrectoría de postgrado. Universidad de Santiago de Chile

Caracterización Acústica Direccional en Caverna de las Brujas



.25.Ciencia, tecnología e innovación

Caracterización Acústica Direccional en Caverna de las Brujas

Payo, Damian, sdpayo@ucasal.edu.ar

Eguia, Manuel, mequia@unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)

Resumen

El presente trabajo expone el estudio acústico de una formación cavernaria denominada "Caverna de las Brujas" colindante a la Cordillera de los Andes en el Departamento de Malargüe (Mendoza). A diferencia de estudios tradicionales en acústica de salas, en este caso se utilizan fuentes y receptores direccionales, sin asumir la condición de 'campo difuso' en el recinto. De esta forma, resulta posible comparar las diferentes posiciones de la fuente y el receptor no sólo a partir de los parámetros acústicos usuales (tiempo de reverberación, claridad, centro temporal) sino también en función de la variación de dichos parámetros con las direcciones de emisión y recepción. Asimismo el trabajo se completa con el análisis de muestras obtenidas con receptor omnidireccional homologado a fin de realizar comparaciones entre ambos casos metodológicos.

Introducción

El presente trabajo expone un estudio acústico basado en el análisis de respuestas impulso direccionales de un espacio natural en nuestro país, considerado patrimonial, cuyo uso actual en prácticas musicales se expone vigente. Esta elección está basada tanto en las características acústicas únicas del recinto, como en el interés cultural, histórico y turístico que tiene actualmente.

El espacio elegido es una formación cavernaria cerrada conocida como "Caverna de Las Brujas", ubicada a

8 km al norte de la Ruta Nacional N° 40, en las cercanías de la localidad de Bardas Blancas en el Valle del río Grande, al Sur de la provincia de Mendoza, en el departamento de Malargüe.

Partiendo de la inexistencia de directrices generales para el uso de fuentes o receptores omnidireccionales en estos espacios, estudiamos su acústica, sin asumir la condición difusa presente en la normativa vigente para salas de espectáculos [1]. De modo que, se utilizaron tanto emisores como receptores



direccionales, a fin de tener en cuenta la información direccional, tanto para la fuente como para el receptor [2].

Aunque ha habido varios enfoques recientes para incluir características direccionales en fuentes sonoras reales y receptores [3-5], aún no existe un método comúnmente aceptado para realizar este tipo de estudios con fuentes sonoras artificiales a los fines de obtener parámetros acústicos específicos. Aquí adoptamos un procedimiento simple utilizando un solo parlante con un patrón de direccionalidad conocido, en diferentes orientaciones y un micrófono Ambisonics, para los distintos puntos de medición.

Con el propósito de realizar una evaluación exhaustiva de las características citadas anteriormente, realizamos un estudio de la dependencia con la direccionalidad de la fuente y el receptor de los parámetros acústicos temporales clásicos (tiempo de reverberación, claridad y centro temporal) derivados de las medidas

Objetivos

Como objetivo general, el presente artículo busca sentar precedente en el reconocimiento e importancia de la preservación del patrimonio acústico y sonoro Argentino, y en su relación con el espacio a través de tecnologías que lo

acerquen a la comunidad. Del mismo se desprenden una serie de Objetivos Específicos que dan cuenta de la necesidad de la realización de un reconocimiento a primera escucha de rasgos distintivos en las dimensiones temporales espectrales y espaciales (resonancias, flutter eco, difusión, focalización, etc.) para obtener mayor cobertura de las cualidades y características de este espacio, como así también, la obtención de Respuestas Impulso (IR's) con calidad Soundfield para su análisis acústico y uso en post-producción de audio.

Materiales y Método

La Caverna presenta tres niveles de corredores principales. En el nivel intermedio se encuentra el recorrido más conocido, que se extiende casi horizontalmente con respecto a la entrada y tiene una longitud de aproximadamente 200 metros. El nivel alto se desarrolla en forma casi horizontal pero 20 metros por encima del primero. El tercer corredor está constituido por pasadizos que descienden a 20 metros por debajo del primero. Existen otros sectores que resultan prácticamente intransitables debido a su estrechez o por estar obstruidos. Nuestro estudio estuvo centrado en la sala más amplia y accesible, reconocida por sus

características acústicas y el paso de comunidades preexistentes llamada “Sala de la Virgen”. Su acceso cerrado, de aproximadamente 15 metros de largo, da a una sala de 35 metros de profundidad y 20 metros de ancho aproximadamente con una altura irregular que llega a los 10 metros en algunos puntos (Figura 1).



Fig. 1: Sala de La Virgen en Caverna de las Brujas. A la izquierda, al fondo de la imagen, puede observarse el acceso a las siguientes salas. PH: Juan Barthe.

Los espeleotemas que la forman, están estructurados por piedra caliza, formada de carbonato de calcio de origen marino. Dentro de la caverna, son notorios los cristales de calcita que forman unas estructuras alargadas con forma de carámbano llamadas estalactitas. Otros espeleotemas, muy vistosos, son los velos o cortinas y las flores o corales, que tapizan las paredes de las cavernas. El suelo de la Sala de la Virgen está cubierto de ceniza volcánica proveniente del volcán “El descabezado” que erupcionó en Chile en 1932 [6].

Debido a las características topográficas del espacio (gran irregularidad de sus paredes, techo y niveles del suelo con diferencias de hasta

4 metros de altura) fue necesario realizar una grilla rombaleada a una altura fija lo cual permitió relevar las distintas posiciones de la fuente y el receptor con una referencia clara, utilizando como herramienta de replanteo un nivel topográfico. A partir de un punto central se determinaron dos ejes de coordenadas y cinco targets de referencia (uno para el centro y cuatro para cada esquina del rombo). De este modo, para cada posición se midieron las distancias hasta al menos tres targets, pudiendo obtener una ubicación precisa y unívoca para todas las posiciones de fuente y receptor en el recinto.

La fuente acústica fue ubicada a un altura de 1.60m (Parlante Genelec 8030 Bi-amplificado) y el receptor a 1.50m (Ambisonics: Sennheiser Ambeo). Para la reproducción y el registro se utilizó una grabadora digital ZOOM F4.

El método empleado para obtener las respuestas impulso es el barrido senoidal exponencial tradicional (ESE) propuesto por Angelo Farina [7]. Un barrido de 20 segundos de una onda sinusoidal de 20 a 24 kHz con una frecuencia de muestreo de 96 kHz. Para alinear las Respuestas Impulso (IR's), se registró un loopback. Es necesario aclarar que se usó un emisor direccional en cuatro orientaciones correspondientes a cuatro rotaciones de 90 grados: D1 hace

referencia a la dirección frontal (Flecha roja en Figura 2), D2, D3 y D4 a las rotaciones (siempre a la derecha). Los barridos fueron grabados por el micrófono Ambisonics en formato A. Las IR's se obtuvieron al convolucionar las grabaciones de barrido con el filtro inverso. Estas se codificaron en Matlab del formato A al formato B. Con el formato B, se realizó una decodificación: omnidireccional, frontal, lateral y altura (W-X-Y-Z respectivamente).

Para el estudio se emplearon cuatro posiciones de fuente (L1-L4), teniendo en cuenta los lugares utilizados en eventos musicales anteriores y otras por mostrar características acústicas llamativas a primera escucha, y seis posiciones para receptor (M1-M2, M4-M7), excluyéndose las muestras que presentan proximidad entre ambos. Se obtuvieron un total de 12 combinaciones fuente-receptor (Tabla 1 - Figura 2).

		Emisores				Altura
		L1	L2	L3	L4	
Receptores	M1		8.36 m	17.78 m	24.23 m	0.53 m
	M2	8.36 m		20.93 m	19.05 m	0.87 m
	M4	24.23 m	19.05 m	24.07 m		2.91 m
	M5	10.39 m	17.28 m	10.84 m	25.58 m	-1.08 m
	M6	7.74 m	9.66 m	11.38 m	17.98 m	0 m
	M7	27.01 m	24.18 m	17.18 m	8.49 m	-0.99 m
Altura		0.53 m	0.87 m	-1.07 m	2.91 m	

Tabla 1: Distancias entre los diferentes pares Fuente-Receptor en metros y altura relativa de cada emisor/receptor.

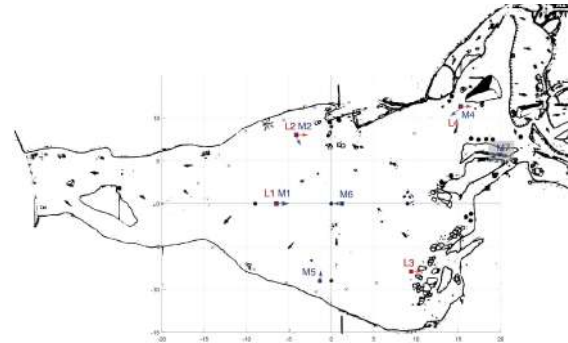


Fig. 2: Planta de Sala de la Virgen de Caverna de las Brujas, que muestra las posiciones de Fuente (L1, L2, L3 y L4) y las Posiciones de Receptor (M1, M2, M4, M5, M6 y M7). la dirección frontal "F" de la fuente y el eje "X" del receptor, están indicados con una flecha.

De cada posición, se registraron 3 barridos de frecuencia que fueron promediados para obtener cada IR. Al no presentar diferencias significativas, dicho método fue óptimo para la obtención final de las muestras (Ver Figura 3)

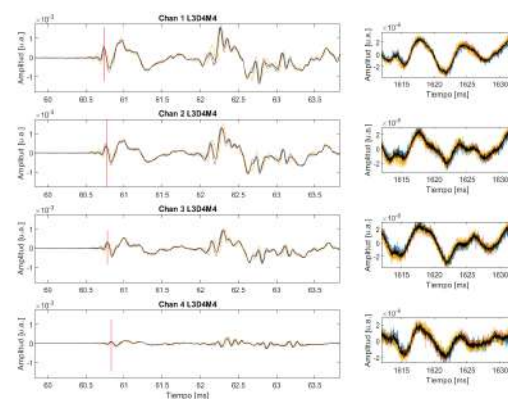


Fig. 3: Muestra de las tres respuestas impulsivas superpuestas (color) y su promedio (negro) en cada gráfico (fuente)

en L3 apuntando en la dirección 4 y receptor en M4) para los cuatro canales del micrófono Ambisonics (en formato A), para dos intervalos de tiempo. En la columna izquierda entre 60 y 64 milisegundos mostrando el arribo del primer frente de onda (indicado por la línea vertical), en la columna izquierda un intervalo en torno a los 1620 milisegundos donde se puede apreciar que las tres respuestas siguen una coherencia a pesar de que su amplitud decae tres órdenes de magnitud y la presencia de un cierto nivel de ruido.

Resultados y Discusión

Las Figuras 4-9, muestran los resultados obtenidos en grabaciones dentro del recinto para tres parámetros acústicos relevantes relacionados con los aspectos temporales de las IR's: el tiempo de reverberación tradicional T_{30} , el Tiempo Central (o centro de gravedad) t_s , el índice de Claridad C_{50} en dB. En todos los casos mostramos las once combinaciones de posición de parlante (L) y micrófono (M) en diferentes paneles, y en cada panel las cuatro direcciones de fuente y las seis direcciones de receptor decodificadas. Como referencia el canal W brinda información omnidireccional.

A. *Tiempo de Reverberación (T_{30})*

Fuente 1: En términos generales, el T_{30} se presenta alrededor de los 1.5 segundos. Disminuye notoriamente cuando la fuente es direccionada al lado izquierdo de la caverna (L1-D4) y en el caso particular para el receptor M2. Los valores máximos en este caso, fueron arrojados al direccionar la fuente hacia la parte posterior de la Caverna (L1-D1), debido a que los canales comunicantes con el resto de la formación cavernaria se presentan como resonadores acoplados a la sala principal. Caso notorio, tanto para esta fuente como para las otras, el receptor M4, que presenta valores cercanos a los 2 segundos. Cabe resaltar que en la posición M4 la altura del techo asciende a 10.7 metros aproximadamente.

Fuente 2: Presenta valores similares y sin grandes cambios para los receptores colindantes al centro de la caverna (M5-M6) con un T_{30} entre 1 y 1.5 segundos. El receptor ubicado en la parte posterior de la sala (M4) muestra valores por encima de los 2 segundos. En todos los receptores, T_{30} disminuye al direccionar la fuente hacia el centro de la caverna (L2-D2).

Fuente 3: Esta fuente muestra cierta homogeneidad en sus valores, oscilantes entre 1.5 y 2 segundos. Caso distante el

presente en el receptor ubicado en la parte posterior de la caverna, que muestra un valor por encima de los 2 segundos.

Fuente 4: En este caso, se presentan los valores de T_{30} más elevados de toda la medición, por encima de los 2.5 segundos. Cabe destacar que este caso es el que mayor homogeneidad presenta en las distintas direcciones tanto de emisor como del receptor.

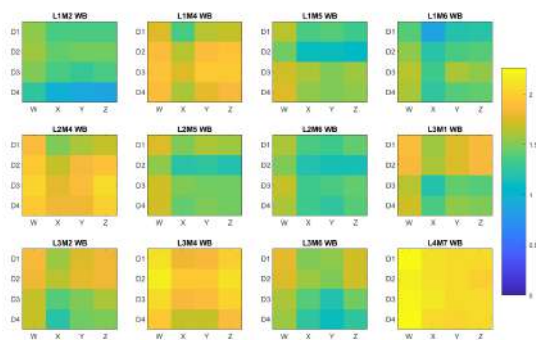


Fig. 4: Tiempo de Reverberación (T_{30}) de banda ancha, medido en segundos, obtenidos en Caverna de las Brujas. La gráfica muestra las cuatro posiciones de fuente (L1, L2, L3 y L4) y las seis posiciones de Micrófono (M1, M2, M4, M5, M6 y M7). En escala de colores los valores direccionales para las 16 combinaciones posibles de orientación de fuente (D1-D4) y micrófono (WXYZ), como se describe en el texto.

B. Tiempo Central (t_s)

Fuente 1: Las muestras obtenidas en este caso, presentan valores homogéneos

(entre 0.02 y 0.09 segundos) en el receptor con algunos cambios considerables en relación a la direccionalidad de la fuente. De este modo pueden notarse valores menores en todas las direcciones del receptor en el momento en que la fuente apunta directamente al mismo (L1M2-D4, L1M5-D2 y L1M6-D1) indistintamente de su direccionalidad. Del mismo modo los valores aumentan al presentarse el emisor en sentido opuesto (L1M2-D2, L1M5-D4 y L1M6-D3). El receptor más alejado (M4) es el único caso que se destaca del resto, exponiendo valores más elevados a la media (entre 0.14 y 0.18 segundos) y una notoria disminución de los valores en el canal X del receptor indistintamente de la direccionalidad de la fuente.

Fuente 2: Del mismo modo que en el caso anterior, la fuente 2 presenta información con cierta homogeneidad para todos los receptores que se presentan en las cercanías de la fuente (entre 0.02 y 0.06 segundos) y una particular refuerzo de t_s en el receptor ubicado en el fondo de la sala (M4). Una característica marcada en los primeros es una leve disminución al direccionar la fuente hacia el centro de la sala (D2), indistintamente de la direccionalidad del receptor. El receptor M4, sin embargo, presenta valores por encima de la media (en los casos D2 y

D3, mayores a 0.16 segundos) y una disminución marcada en el eje frontal (eje X) del receptor para todas las direccionalidades de la fuente.

Fuente 3: Los valores de t_s se presentan idénticos para el caso M1 y M2, exponiendo valores más bajos al direccionar la fuente hacia los receptores.

Esta variación, sin embargo, no es tal para el receptor en la parte central de la sala (M6) que se presenta como la muestra con valores tan homogéneos como los expuestos en los pares fuente receptor cercanos a la fuente 2. Nuevamente el receptor ubicado al fondo de la caverna expone los valores más elevados para la fuente, sin embargo, esta vez signados por la direccionalidad de la fuente, más que por la direccionalidad del receptor.

Fuente 4: El par L4M7 presenta los valores de t_s más elevados en todas las muestras obtenidas, como así también cierta homogeneidad tanto en la direccionalidad de la fuente como del receptor.

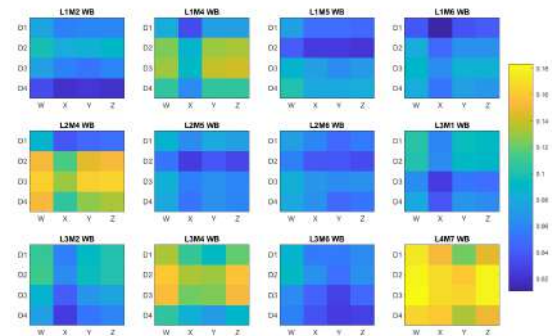


Fig. 5: Centro Temporal (t_s) de banda ancha, medido en segundos, obtenidos en Caverna de las Brujas. Las directrices de la gráfica se presentan de modo similar a la figura 4.

C. Claridad (C_{50})

Fuente 1: Se muestra cierta heterogeneidad en las muestras obtenidas en este caso, datada en las medidas cercanas por un aumento de Claridad (del orden de los 10 dB) al direccionar la fuente al receptor (L1M2-D4, L1M5-D2 y L1M6-D1) y un decrecimiento a exponerlas de modo opuesto. El receptor M4 presenta los valores más bajos de C_{50} (1-4dB). Tanto M6 como M4, presentan un aumento en los valores en el eje frontal del receptor.

Fuente 2: De los pares Fuente-Receptor cercanos pueden notarse ciertas similitudes en sus valores, sin embargo, el receptor M5 presenta los valores más elevados de la muestra al direccionar la fuente de modo frontal (8 dB), pese a estar ubicado a una distancia mayor que

el receptor M6. Finalmente el receptor ubicado al fondo de la sala presenta los valores más bajos obtenidos para esta ubicación de la fuente (menor a -4dB) con un leve aumento al direccionar la fuente de modo frontal.

Fuente 3: Presenta los valores con mayor grado de homogeneidad entre las diferentes posiciones de receptor. Entre los receptores M1 y M2 los valores son prácticamente idénticos (Entre -2 y 4dB), el receptor ubicado al centro de la sala presenta índices mayores (\sim -2dB) y mayor condición difusa. M4 del mismo modo que en los casos anteriores presenta los valores más bajos obtenidos (entre 0 y -8dB).

Fuente 4: Este par fuente-receptor expone los valores más bajos (entre -6 y -10dB) y homogéneos de todos los anteriormente expuestos.

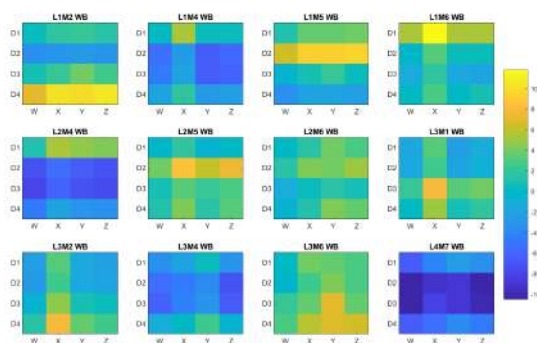


Fig. 6: Claridad(C_{50}) de banda ancha, medido en dB, obtenidos en Caverna de las Brujas. Las directrices de la gráfica se presentan de modo similar a la figura 4.

Conclusión

El análisis de los parámetros que surgen de las IR's direccionales (tanto desde la fuente como desde el receptor) nos permitió evaluar la acústica de Sala de la Virgen en Caverna de las Brujas sin asumir la condición de campo sonoro difuso. A partir de las diferencias observadas en los parámetros acústicos con respecto a la orientación de la fuente o el receptor, es notorio que existen zonas específicas de la sala en donde la direccionalidad del receptor no afecta a la percepción de los distintos parámetros. Este análisis fue útil para determinar que, hacia la parte posterior de la sala (M4 y M7) los valores de reverberación y centro temporal tienden a aumentar, tal vez debido a las cercanías con el resto de la formación cavernaria que actúan como resonadores acoplados. Asimismo, los índices de claridad disminuyen notoriamente hacia este sector. Vale la pena señalar que pese a ser la ubicación de fuente L4 la que presenta valores de T_{30} más cercanos a una sala de conciertos (aproximadamente 2 segundos). Esta posición no es utilizada con regularidad para la ejecución musical en la sala ya que se presenta como un sector de paso hacia las formaciones cavernarias colindantes. Si bien las ubicaciones L1-L3 (salvo para el receptor M4 en todos los



casos) presentan valores de T_{30} similares, la ubicación L3 es la más utilizada por visitantes en la sala para ejecuciones musicales espontáneas y L1 en formaciones específicas de instrumentistas.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó adelante con el financiamiento del Consejo de Investigaciones de la Universidad Católica de Salta (UCaSal), Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y el apoyo logístico de la Red de Áreas Naturales Protegidas de Mendoza. Asimismo no hubiese sido posible sin el apoyo técnico y colaboración de Lisandro Fernandez, Ariane Cuminale y Juan Barthe.

Bibliografía

- [1] ISO 3382-1:2009; Acoustics—Measurement of Room Acoustic Parameters. I: Performance Spaces (International Standards Organization, 2009).
- [2] Kuttruff, H. Room Acoustics Sixth Edition, CRC Press, 2014.
- [3] Wenmaekers, R. H. C., Hak, C. C. J. M., Hornikx, M. C. J., and Kohlrausch, A. G. “Sensitivity of stage acoustic parameters to source and receiver directivity: Measurements on three stages

and in two orchestra pits,” Applied Acoustics, vol. 123, pp 20–28, 2017.

[4] Berzborn, M., and Vorländer, M. “Investigations on the Directional Energy Decay Curves in Reverberation Rooms.,” Euronoise 2018, Crete.

[5] Martellotta, F; Álvarez-Morales, L; Girón, S.; Zamarreño, T. “An investigation of multi-rate sound decay under strongly non-diffuse conditions: The crypt of the Cathedral of Cadiz”. Journal of Sound and Vibration, vol. 421, pp. 261-274, 2018.

[6] NEOAMBIENTAL. “Planes de gestión o de uso público para 8 ANPs de la provincia de Mendoza. Tomo I. Conocimiento del Área. Reserva Natural Caverna de las Brujas”. NEOAMBIENTAL. 2007.

[7] Farina, A. “Advancements in impulse response measurements by sine sweeps” Audio Engineering Society Convention 122, 21, 2007.

Elaboración de un nuevo producto sustituto de la madera tradicional, mediante el reciclado de papel periódico



C.25. Ciencia, tecnología e innovación

Elaboración de un nuevo producto sustituto de la madera tradicional, mediante el reciclado de papel periódico

Autor: Flores, Jose Luis; floresjoseluis.jlf2021@gmail.com

Co-autor(es): Patricio Aponte, Bizet; bizet258@gmail.com

Profesor/a Tutor/a: Fernández Álvarez, Álvaro Rodrigo; alvaro_fernandez25@hotmail.com

Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca(UMRPSFXCH)

Resumen

En Bolivia se tiene demasiado papel periódico el cual es desechado, archivado, quemado, y no se lo utiliza para algo que beneficie a las personas, es así que el presente proyecto da a conocer un nuevo producto que será útil, novedoso, y beneficioso que sustituirá a la madera convencional a partir del reciclado del papel periódico, sus propiedades son tomadas en cuenta, no se realiza ninguna separación, ya que se trata de tener un producto natural y artesanal el cual tratará de tener las características que tiene una madera tradicional, brindando los mismos beneficios que ofrece en sus distintas utilidades. Mediante el diseño experimental comparativo se buscó la selección de cantidad másica del papel periódico y la cantidad de resina en volumen, se realizó 9 muestras distintas y como resultado se obtuvo que la muestra N°9 tiene una resistencia a la flexión, y la característica física del mismo es peculiar ya que se tiene detalles que hacen que el nuevo producto sea interesante y agradable, entonces las diferentes utilidades que proporcionará este producto ayudará a reducir el impacto ambiental que el papel posee y poder motivar e incentivar a las personas en este proyecto a donar el papel periódico y sacar ventaja de la reutilización del mismo, y así evitar la tala de árboles y conservar el medio ambiente.

Palabras clave: Catalizador, Melamina, Resina.



Introducción

Dentro del desarrollo económico de un país cualquiera se encuentra la fabricación de muebles a partir de la madera, la cual tiene un uso para el beneficio humano, siendo utilizado a nivel mundial, y en la actualidad podemos encontrar variedad de tipos de madera para diferentes usos.

Por otro lado, tenemos al periódico el cual es una fuente de información diaria que muchas personas adquieren para estar informados sobre noticias y novedades que ocurren en el mundo, hoy en día se producen enormes cantidades de papel periódico en nuestra sociedad siendo una materia prima barata y fácil de conseguir además que con el tiempo se puede llegar a convertir en una materia reciclable proporcionando beneficios óptimos.

Al año se talan alrededor de 3,006,665 hectáreas de árboles, aproximadamente la tercera parte de este va destinado a la fabricación de papel y lo demás se va para la fabricación de muebles de cualquier tipo y de la implementación de madera en los autos más caros. El consumo de papel es muy elevado en el mundo, 115 mil millones de hojas de papel se utilizan anualmente en oficinas, el consumo anual promedio de papel es de 48kg por persona a nivel mundial.

En el desarrollo del proyecto se orienta a disminuir el uso de madera para dar valor al papel periódico y aumentar su reciclado para que se realice la producción de un nuevo producto a base de papel periódico y permita sustituir a la madera convencional y melamina. Este producto nuevo tendrá las características propias como la flexibilidad y esfuerzo máximo que exige una madera o melamina.

En los últimos años se desarrollan nuevos productos los cuales son innovadores y en beneficio de la población siempre evitándose dañar a la madre naturaleza, lo cual ha despertado interés en científicos y tecnólogos, lo que ha creado áreas muy activas de investigación y desarrollo de nuevas cosas, esto se debe a la alta competencia que existe entre fabricantes industriales lo cual les impulsa a crear cosas que sean novedosas y que cumplan con las exigencias del consumidor.

La producción del papel periódico en Bolivia y el mundo va en ascenso día a día esto debido a que es llamativa por la disposición final del papel periódico como un resultado de residuo sólido, actualmente en nuestro país se cuenta con una capacidad de producción muy alta de muebles a partir de la madera, en el mercado hay productos que sustituyen a la madera como ser la melamina y



aglomerados, pese a ser productos que valen un poco menos son muy poco utilizados ya que su vida útil no es tan larga.

El papel de prensa es el tipo de papel que se utiliza para la impresión de periódicos, el cual está fabricado principalmente a base de papel recuperado o en su caso de pasta mecánica, puede ser blanco o ligeramente coloreado y el gramaje que normalmente tiene es de 40 g/m² y los 52 g/m² y alguna vez puede llegar a los 65 g/m². Alrededor de 10 toneladas de papel reciclado y cada 15 días son enviados a la fábrica de papel Scott, que forma parte de Kimberly-Clark Corporation, en el Departamento de Santa Cruz, este papel es enviado a la fábrica para luego ser vendido y se lo clasifica en tres tipos: blanco, de colores, y el periódico, en el caso del periódico por semana se recolecta entre 500 y 600 kilos de papel y por mes más de 15 toneladas. Dentro del papel reciclado se encuentra: hojas bond, cuadernos, libros en mal estado, folletos, revistas y afiches.

En cuanto al precio de venta por kilo, se tiene:

- Papel blanco a 1 boliviano con 0.20 centavos y cuando sobre pasa los 100 kilos el costo sube hasta 1 boliviano con 0.50 centavos.

- Papel de color a 0.50 centavos, y cuando el volumen sobre pasa los 100 kilos es 0.70 centavos
- Papel periódico a 0.20 centavos y cuando pasa los 100 kilos es a 0.20 kilos.

Los Departamentos de Bolivia que tienen un consumo elevado de papel periódico primeramente son Santa Cruz y La Paz, por tener un gran número de habitantes; luego se tiene a Tarija, Beni, Chuquisaca, Oruro y Cochabamba, por tener un número importante de lectores y luego se tiene a los demás departamentos.

El producto que se pretende desarrollar es nuevo y no existe uno similar en el mercado regional y/o nacional y es una oportunidad para captar nuevos segmentos de consumidores; además de aplicar en el desarrollo del producto los conocimientos y habilidades de la ingeniería.

Esta nueva propuesta será elaborada mediante el diseño experimental para identificar el proceso conveniente que cumpla con las características de una madera convencional, y que sea utilizada de la misma manera. En nuestro medio no existe investigaciones relacionadas con el reciclaje del papel periódico para la sustitución de la madera.



Objetivos

Objetivo General.

Desarrollar un nuevo producto sustituto de la madera mediante reciclado de papel periódico, que cumpla con las especificaciones de la madera tradicional, melamina o aglomerado.

Objetivos Específicos.

- Definir el producto a desarrollar.
- Determinar las variables involucradas en el proceso que garanticen un producto con buenos atributos de calidad y seguridad.
- Definir el proceso de producción de la madera a partir de periódico.
- Realizar un análisis del módulo de elasticidad y el esfuerzo máximo sometida a carga de tensión y compresión para elegir el mejor producto de acuerdo al proceso desarrollado.
- Disminuir la generación de residuos sólidos a partir del reciclado de papel periódico.
- Incentivar el desarrollo de nuevas industrias y así generar nuevas fuentes de empleo.

Materiales y métodos

Los materiales principales son:

- Papel periódico.

- Resina.
- Catalizador.

Como materiales secundarios tenemos:

- Tijeras.
- Moldes de madera de diferentes medidas.
- Recipiente con agua.
- Triturador eléctrico.
- Tela permeable.
- Espátula.

La metodología que se emplea y la descripción de la investigación es la siguiente:

Diseño.-El desarrollo de la investigación se basa en el diseño experimental comparativo que busca la selección de la combinación de la cantidad másica de papel periódico (previo remojado y triturado) y la cantidad volumétrica de resina, que permita la mayor resistencia a la flexión del producto obtenido, madera de papel periódico. Se utilizó un diseño completamente al azar que permitió la elección de la mejor formulación de papel y resina.

Población y muestra.-Se tomaron 9 unidades experimentales, cada unidad experimental se etiquetó con su código. Los tratamientos se realizaron con repeticiones por tratamiento y cada tratamiento se mantuvo bajo control de

tiempo de secado y el control de su durabilidad en un tiempo determinado.

Métodos y técnicas.-En la parte experimental se utilizó papel periódico reciclado, resina y se adicionó el catalizador de resina para acelerar el secado en diferentes cantidades para obtener placas con distintos grados de resistencia a la flexión a fin de que sea próxima a las normas europeas.

A continuación, se menciona los tratamientos evaluados:

Ítem	Papel (g)	Resina (ml)	Resistencia (N/mm ²)
1	100	50	28
2	100	80	30
3	100	100	28
4	200	50	28
5	200	80	30
6	200	100	29
7	500	50	27
8	500	80	32
9	500	100	35

Fuente: Elaboración Propia

Preparación del papel periódico.-El papel periódico reciclado es picado manualmente y llenado a un recipiente se añade agua al recipiente que cubra completamente el papel picado. En esta etapa se debe verificar que exista la mayor separación de papel, para que el agua pueda penetrar en

el papel. Se deja en reposo por un tiempo de 12 horas, tiempo que permite que el papel se pueda deshacer. Utilizando un triturador manual, se tritura completamente el papel periódico. Una vez triturado se extrae la mayor cantidad de agua posible con la ayuda de una tela permeable. Finalmente se obtiene una pasta de papel periódico.

Preparación de la resina.-Se procede a medir el volumen de la resina en vaso precipitado, de acuerdo a los tratamientos mencionados en la tabla anterior. El manejo de la resina debe realizar con mucho cuidado.

Preparación del catalizador.-El catalizador que permite acelerar el secado es añadido en gotas.

Preparación del molde.-Se construye un molde de 15 mm de espesor para alojar el componente.



Figura1: Preparación del molde

Mezclado de los componentes.-En un recipiente y con la ayuda del triturador manual se procede a mezclar, hasta

alcanzar una masa homogénea. Posteriormente se coloca en molde utilizando una espátula para cubrir toda la superficie del mismo. Una vez vaciada la mezcla, se procede al secado con la ayuda de un quemador para acelerar el secado. La transferencia de calor es por conducción durante 10 minutos. El tiempo del secado total es de 48 horas, dado que no se cuenta con un secador por convección.



Figura 2: Aplicando el mezclado en el molde



Figura 3: Dando firmeza por encima del mezclado con papel transparente y un pedazo de madera

Resultados y discusión

Con ayuda del software Minitab v.17, se realiza las combinaciones de papel y resina como se aprecia en siguiente cuadro:

Orden Est.	Orden Corrida	Tipo PT	Bloque S	papel	resina	Resistencia	RESI 1	COEF 1
1	1	1	1	100	50	28	3.5527E-15	29.66666667
2	2	1	1	100	80	30	3.5527E-15	-1
3	3	1	1	100	100	28	3.5527E-15	-0.6666666667
4	4	1	1	200	50	28	3.5527E-15	1.6666666667
5	5	1	1	200	80	30	3.5527E-15	-2
6	6	1	1	200	100	29	3.5527E-15	1
7	7	1	1	500	50	27	3.5527E-15	1
8	8	1	1	500	80	32	3.5527E-15	1.3333333333
9	9	1	1	500	100	35	7.1054E-15	0.3333333333

Figura 4: Generación de tabla por software Minitab v.17

La siguiente figura representa el comportamiento de la mezcla.

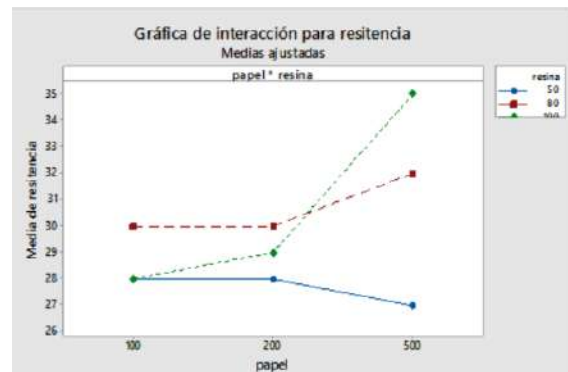


Figura 5: Interacción para resistencia

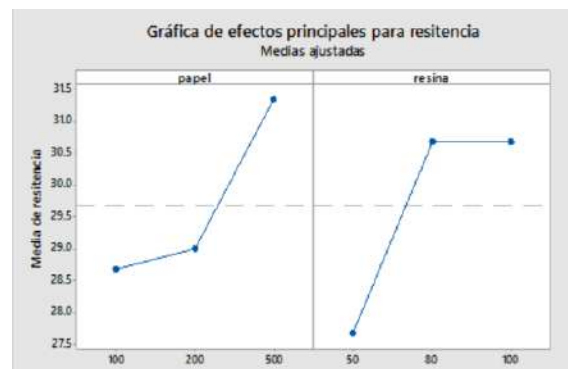


Figura 6: Efectos principales para resistencia



Resultados obtenidos:

- ❖ Elaboración de producto sustituto de la madera a partir del reciclado del papel periódico
- ❖ Cantidad de papel periódico, cantidad de resina, cantidad de catalizador, cantidad de cola, cantidad de aserrín, cantidad de agua, tiempo de secado.
- ❖ Control de variables, control de flujo de proceso, control de tiempo de proceso.
- ❖ Módulo de elasticidad.
- ❖ Esfuerzo máximo.

Discusión.-Según los resultados, encontramos un número de variables que son importantes y dependientes, las cuales desempeñan un rol importante y significativo como por ejemplo el tiempo de secado o la temperatura ambiente a la cual se encuentran las muestras durante el secado.

Por ello el presente estudio, con un diseño metodológico adecuado encuentra factores en cuanto a la cantidad de los elementos que deben ser tomados en cuenta para futuros estudios.

Conclusiones

Los resultados del modelo experimental dieron a conocer 9 tipos de combinaciones realizadas. La prueba que se eligió fue la novena ya que posee mayor resistencia a la flexión, tomando en cuenta que se la

comparó con la norma Europea EN310, la cual se utiliza para la producción de melamina. También se observó que el impacto ambiental se reduce y llega a convertirse en un producto amigable con el medio ambiente pues los materiales utilizados están acumulados en las imprentas u hogares, siendo tomados como desperdicio. Con este proyecto hacemos conocer a la población y a algunas empresas que el papel periódico puede ser reutilizado.

Bibliografía

- Bea Sánchez, J. L. (s.f.). *Formulación Y Preparación De Mezclas*. Madrid: Síntesis S.A.
- Epóxicos, D. (s.f.). Resina De Secado Rápido, Aprende A Usarla. Obtenido de <https://xn--diseosepoxicos-tnb.com/blog/resina-de-secado-rapido/>
- Ing. Osorio, J. (2022). *360 En Concreto*. Obtenido de <https://360enconcreto.com/blog/detalle/elasticidad-del-concreto/#:~:text=M%C3%B3dulo%20de%20elasticidad-,El%20m%C3%B3dulo%20de%20elasticidad%20de%20un%20mater>



ial%20es%20la%20relaci%C3%B3n, carga%20impuesta%20sobre%20el%20mismo.

material-properties.org. (2022). ¿Qué es el módulo de elasticidad? – Módulo de elasticidad – Definición. Obtenido de <https://material-properties.org/es/que-es-el-modulo-de-elasticidad-modulo-de-elasticidad-definicion/>

Real Academia Española. (2022). Obtenido de <https://dle.rae.es/catalizador>

Sur, C. D. (2019). Acopio De Papel Usado, Una Labor Que Es Poco Comprendida En Sucre. Obtenido de https://correodelsur.com/capitales/20160503_acopio-de-papel-usado-una-labor-que-es-poco-comprendida-en-sucre.html#:~:text=Los%20precios,peri%C3%B3dico%20a%20Bs%200%2C10.

Taha, H. A. (2012). Investigación De Operaciones. *9th Edition*, 824. (G. Lopez Ballesteros, Ed.)

Uriarte, J. M. (Noviembre de 2020). *Características*. Obtenido de <https://www.caracteristicas.co/periodico/#:~:text=Caracter%C3%ADsti>

cas%20del%20peri%C3%B3dico&text=Estar%20impreso%20en%20apel%20delgado,acceso%20gratuito%20a%20determinadas%20noticias.

Agradecimiento

Se agradece al Ing. Álvaro Rodrigo Fernández Álvarez por el apoyo y el incentivo en el proyecto, a nuestras familias por el apoyo constante y la ayuda que se nos dio durante todo el desarrollo del proyecto realizado durante varios meses.

Evaluación de eficiencia energética y emisiones en cocinas mejoradas a biomasa
bajo la norma ISO 19867:1-2018



C.25. Ciencia, tecnología e innovación

Evaluación de eficiencia energética y emisiones en cocinas mejoradas a biomasa bajo la norma ISO 19867:1-2018

Autor: Abu Ghosh Borja, Dalia Diab; ddabughosh@umsa.bo

Co-autor: Casanova Velasquez, Libertad Mariana; lmcasanova@umsa.bo

Profesor/a Tutor/a: Calle Mendoza, Iris; jabneeliris@gmail.com

Universidad Mayor de San Andrés (UMSA)

Resumen

De acuerdo al INE (2012), en Bolivia el 62.8% de la población rural utiliza leña como combustible. Las estufas tradicionales a base de leña representan riesgos para la salud, inclusive pueden llegar a ocasionar la muerte prematura ya que liberan contaminantes nocivos, principalmente CO y PM2.5. Implementar cocinas mejoradas significa tiempos de cocción reducidos, menor contaminación intradomiciliaria y menor uso de leña.

Para evaluar la eficiencia energética (EE) y emisiones de cocinas mejoradas, se emplea el protocolo ISO 19867:2018, que consiste en tres etapas de prueba, de potencia alta, media y baja (Wyatt M. Champion, et.al.). Cada etapa consta de un encendido, un período de combustión de 30 min y un período de apagado. Este protocolo se realizó con el Sistema de Laboratorio para Monitoreo de Emisiones (LEMS). El objetivo del proyecto es el de evaluar la EE y emisiones de un modelo de cocina mejorada tipo "rocket" a biomasa bajo la norma ISO 19867-1:2018. Se realizaron 5 pruebas en potencia alta con un dispositivo de inyección de aire secundario denominado Jet Flame.

A partir de las pruebas realizadas fue posible comprobar que las eficiencias energéticas en comparación con las cocinas tradicionales son muy superiores, las primeras no superan el 12% (Mwandosya & Luhanga, 1993; Wiskerke et al., 2010). Los valores de eficiencias energéticas obtenidos se encuentran en el rango de 44.5% al 51.3%. Además, se determinaron las métricas de emisiones para la cocina evaluada, y los niveles de desempeño de la cocina para CO y PM2.5 obteniendo valores intermedios. Los resultados obtenidos son indicadores del rendimiento de la cocina y brindan información útil a los fabricantes, implementadores y usuarios de cocinas mejoradas a fin de apoyar el proyecto de cocción limpia en el área rural.

Palabras clave: emisiones intradomiciliarias, cocinas mejoradas, eficiencia energética



1. Introducción

Un tercio de la población mundial equivalente a 2.6 mil millones de personas no tienen acceso a energías limpias para la cocción de sus alimentos. El uso de combustibles, ineficientes y contaminantes representan un riesgo para la salud y son el mayor contribuyente a enfermedades y muertes, particularmente de mujeres y niños de medianos y bajos recursos (OMS, 2022).

Respirar el humo que se produce al cocinar con combustibles contaminantes puede producir enfermedades cardíacas, problemas cerebrales, cáncer, problemas crónicos a los pulmones y neumonía. Año tras año mueren millones de personas prematuramente debido a la contaminación intradomiciliaria, la cual es producida por el uso de cocinas ineficientes en combinación con combustibles como la leña, el carbón, residuos animales, de cultivos, entre otros. Si no se toman acciones rápidas para ampliar el acceso a las cocinas limpias el mundo no podrá cumplir con el objetivo de lograr el acceso universal a la cocina limpia para el año 2030 (OMS, 2022).

En Bolivia, especialmente en el área rural el uso de biomasa¹ es muy común para la

cocción de alimentos. De acuerdo con datos del año 2012 del INE (Instituto Nacional de Estadística) un 62.8% de la población rural utilizaba leña como combustible sólido. En zonas altiplánicas donde la vegetación es escasa, inclusive se llega a utilizar residuo animal como fuente de energía. Para la realización de estas actividades, los pobladores necesitan considerables cantidades de combustible, complicando aún más sus actividades diarias. Por tal motivo, la implementación de cocinas mejoradas con mayor eficiencia energética además de reducción en las emisiones es una alternativa para la mejora de la calidad de vida, en especial de mujeres y niños con alta exposición a contaminantes provenientes de la combustión.

El Centro de Pruebas de Cocinas (CPC) es una institución de investigación, prueba y certificación de sistemas de cocción a biomasa, gas y solares y calentamiento de agua. El CPC fue patrocinado inicialmente en 2009 por Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) Project Energizing Development (EnDev) - Bolivia y finalmente se estableció como un laboratorio de referencia internacional apoyado por la Fundación de las Naciones

¹ Materia orgánica utilizada como fuente energética (APPA Renovables)



Unidas (UNF) y la Alianza Global para Estufas Limpias (GACC), ahora Clean Cooking Alliance (CCA) y opera dentro del Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos (IIDEPROQ) de la Universidad de San Andrés (UMSA). En 2012, el CPC se convierte en un Centro Regional de Pruebas y Conocimiento (RTKC). Actualmente, realiza un conjunto de estudios para la implementación de normas y protocolos internacionales en la evaluación de sistemas de combustión asociados a la cocción de alimentos a través del uso de diferentes combustibles. Recientemente se ha actualizado el Sistema de Laboratorio para el Monitoreo de Emisiones (LEMS), cumpliendo la norma internacional ISO 19867: 1-2018. Este sistema permite evaluar las eficiencias energéticas y emisiones contaminantes de cocinas mejoradas a biomasa, mediante el Protocolo ISO 19867: 1-2018 (CPC,2022).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Evaluar la eficiencia energética y emisiones de un modelo de cocina mejorada tipo "rocket" a biomasa bajo la norma ISO 19867-1:2018

2.2. Objetivos específicos

- Implementar el protocolo de evaluación de cocinas mejoradas

bajo la ISO 19867:2018 en los procedimientos de trabajo del Centro de Pruebas de Cocinas.

- Realizar las pruebas de evaluación de eficiencia energética y emisiones utilizando el sistema LEMS (Laboratory Emissions Monitoring System) en una cocina mejorada tipo "rocket" a biomasa.
- Evaluar un sistema de cocción con tiro inducido por ventilador (Jet-Flame) en la base de la cámara de combustión de una cocina mejorada.
- Comparar los resultados obtenidos con métricas internacionalmente aceptadas de rendimiento para eficiencia energética y emisiones

3. Materiales y métodos

3.1. Protocolo ISO 19867

El protocolo ISO consta de tres fases de prueba. Cada fase está compuesta de un encendido, un período de combustión de 30 minutos y un período de apagado. El período de apagado se define como el que finaliza cuando cualquiera de las siguientes dos opciones ocurre primero: 5 minutos después del final del período de combustión, o cuando la temperatura del agua ha descendido 5 °C (desde la temperatura máxima del agua observada

durante el período de combustión). En la primera fase de la ISO (o de alta potencia) opera la estufa cerca del límite superior de potencia de fuego, mientras que la fase final (o de baja potencia) la estufa opera cerca del límite inferior de potencia de fuego. La segunda fase (o de potencia media) es aproximadamente el punto medio (en términos de potencia de fuego) de las otras dos fases (Wyatt M. Champion, et.al.).

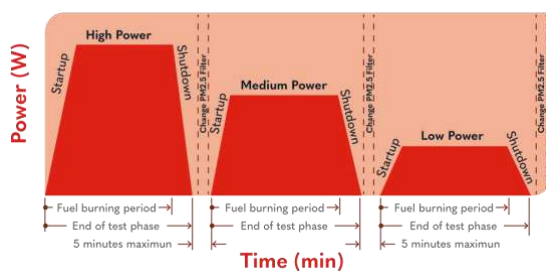


Figura 1. Diagrama de la secuencia de prueba estándar para cocinas con una gama de potencias de cocción

Fuente: ISO 19867, 2018

De acuerdo al protocolo, el proceso completo debe ser llevado a cabo por lo menos cinco veces por cada cocina. Se inició la primera fase (alta potencia) con 2 kilogramos de leños de pino y 30 gramos de astilla como material iniciador para hervir 5 kg de agua, estos y otros datos juntamente con la masa de la cocina vacía fueron registrados al inicio de la prueba. Para la aplicación del Protocolo ISO se utilizó el Sistema LEMS (Laboratory

Emissions Monitoring System) el cual consta de una campana y túnel de dilución además de sistemas de medición de flujo y temperatura de gas, sensores de CO/ CO₂ y PM_{2.5} además de medición gravimétrica de material particulado. Durante las pruebas se registraron datos ambientales (temperatura, humedad relativa, presión atmosférica), temperatura de los gases en el túnel de dilución y del agua en la olla, también se registran las concentraciones de CO, CO₂ y PM_{2.5} cada dos segundos y el tiempo de ebullición local (aproximadamente 89°C). Una vez transcurridos los 30 minutos de prueba se esperaron 5 minutos después de la prueba de combustión y se procedió a registrar la masa final del agua, la masa final de combustible, la masa de carbón y ceniza remanente. Los filtros para medir material particulado PM_{2.5} del sistema gravimétrico utilizados en la primera fase fueron retirados y llevados a un desecador y permanecieron 24 horas antes de ser pesados.

3.1.1. Métricas importantes

Los parámetros requeridos por la norma ISO que se monitorean en la evaluación de cocinas mejoradas son los siguientes:

- **Material particulado (PM2.5)**

El material particulado PM2.5 se calcula con la siguiente ecuación:

$$m_{PM2.5} = \frac{Q_{tunel}}{Q_{muestra}} * m_{muestra} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde:

$m_{PM2.5}$ es la masa de partículas de materia emitidos durante el periodo de muestra, mg;

Q_{tunel} es el caudal volumétrico de gas en el túnel de dilución, m³/min;

$Q_{muestra}$ es la tasa de flujo volumétrico de gas en la corriente de muestra, m³/min;

$m_{muestra}$ es la masa de partículas finas recogidas en el filtro, mg.

- **Energía útil entregada (Q1)**

La energía útil entregada se calcula con la siguiente ecuación:

$$Q_1 = C_p * G_1 * (T_2 - T_1) + (G_1 - G_2) * \gamma \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

Q_1 es la energía útil entregada, kJ;

C_p es la capacidad calorífica aproximada de masa específica isobárica del agua entre 20 °C y 100 °C;

G_1 es la masa inicial de agua en el recipiente de cocina, kg;

G_2 es la masa final de agua en el recipiente de cocina, kg;

T_1 es la temperatura inicial del agua en el recipiente de cocina, °C;

T_2 es la temperatura del punto de ebullición local o la temperatura más alta alcanzada por el agua en el recipiente de cocción, °C;

γ es el calor latente de vaporización del agua al punto local de ebullición, kJ/kg.

- **Poder de cocción (Pc)**

El poder de cocción se calcula con la ecuación:

$$P_c = \frac{Q_1}{(t_3 - t_1)} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

P_c es el poder de cocción, kW;

Q_1 es la energía útil entregada, kJ;

t_3 es el tiempo final al finalizar una fase de prueba, s;

t_1 es el tiempo inicial al comienzo una fase de prueba, s.

- **La eficiencia energética de cocción sin crédito de energía para el carbón restante**

La eficiencia térmica de cocción sin crédito de energía para el carbón restante se calcula con la siguiente ecuación:

$$\eta_c = \frac{Q_1}{BQ_{net.af}} * 100 \% \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde:

η_c es la eficiencia energética de cocción sin crédito de energía por cualquier carbón restante, %;

Q_1 es la energía útil entregada, kJ;

B es la masa del combustible alimentado, kg;

$Q_{net.af}$ es el poder calorífico inferior del combustible, kJ/kg.

- **La eficiencia energética de cocción con crédito de energía para el carbón restante**

La eficiencia energética de cocción con crédito de energía para el carbón restante se calcula con la siguiente ecuación:

$$\psi_c = \frac{Q_1}{BQ_{net.af} - CQ_{net.char}} * 100\% \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde:

ψ_c es la eficiencia térmica de cocción con crédito de energía para el carbón restante, %;

Q_1 Es la energía útil entregada, kJ;

B es la masa del combustible alimentado, kg;

$Q_{net.af}$ Es el poder calorífico inferior del combustible, kJ/kg.

C es la masa del carbón remanente, kg;

$Q_{net.char}$ Es el poder calorífico inferior del carbón, kJ/kg.

- **Las tasas de emisión de contaminantes**

Las tasas de emisión de contaminantes se calculan con la ecuación:

$$ER = \frac{M_i}{(t_3 - t_1)} \quad \text{Ec. (6)}$$

Donde:

ER es la tasa de emisión del contaminante, mg/s;

M_i es la masa total del contaminante durante la prueba, mg;

t_3 es el tiempo final al finalizar una fase de prueba, s;

t_1 Es el tiempo inicial al comienzo de una fase de prueba, s.

3.2. Cocina mejorada a biomasa tipo "rocket"

Está hecha de hierro fundido, tiene una cámara de combustión de acero inoxidable y presenta una base de cerámica gruesa. Pesa 5.9 kilogramos. La eficiencia de esta cocina permite utilizar poca cantidad de leña para la cocción de una gran cantidad de alimentos. También por su diseño, emite menores cantidades de gases contaminantes (Stovetecstore, 2022).



Figura 2. Cocina Diamond Peak Lite

Fuente: Stove Tec Biomass Cookstoves, 2022

3.3. SSM Jet-Flame

Es un dispositivo desarrollado por Aprovecho Research Center (Laboratorio de referencia ubicado en Oregón - EE UU), y proporciona aire forzado desde el fondo de fogatas y estufas abiertas generando una combustión más limpia (ARC, 2021).



Figura 3. SSM Jet-Flame

Fuente: SSM Jet-Flame, 2022

3.4. Sistema de Laboratorio para Monitoreo de Emisiones (LEMS)

El objetivo del Sistema de Laboratorio para Monitoreo de Emisiones es el de cuantificar las emisiones de dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO) y material particulado ($\text{PM}_{2.5}$) generadas en el proceso de combustión de biomasa. Este sistema está compuesto por una campana rígida de metal la cual se encarga de dirigir todas las emisiones hacia el túnel de dilución, esto se realiza mediante por un tiro inducido en el túnel a través de la acción de un ventilador. El sensor de

dióxido de carbono es de tipo infrarrojo no dispersivo (NDIR) mientras que el sensor de monóxido de carbono es de tipo celda electroquímica. La conductividad entre dos electrodos en la celda es proporcional a la concentración de monóxido de carbono presente. Se realizaron dos calibraciones a los sensores dióxido de carbono y monóxido de carbono, en la primera calibración se utilizó el método de calibración de un punto con un gas de calibración de una concentración de 3000 ppm para CO₂, y 300 ppm para CO, en la segunda calibración se realizó una calibración de tres puntos con dos gases de calibración uno de 3000 ppm para CO₂ y de 300 ppm para CO y el otro gas de 8000 ppm para CO₂ y 500 ppm para CO y aire cero es decir con una concentración nula de CO₂.

El sistema gravimétrico da una medición directa del total de material particulado usando una línea de muestreo gravimétrica. Dos bombas de vacío succionan la muestra a través de la línea de muestreo, y el orificio crítico mantiene un flujo constante por línea de 16.7 litros por minuto (lpm). Los ciclones (separadores de partículas) se usan para que todo el material particulado menor a 2.5 micras sea recolectado en los filtros de fibra de vidrio mientras la bomba está encendida. Los filtros fueron pesados por

triplicado al inicio y al final de cada prueba para calcular la masa total de material particulado depositado durante las pruebas.



Figura 4. Caja de sensores

Fuente: CPC, 2022



Figura 5. Ciclones para gravimetría de material particulado PM_{2.5}

Fuente: CPC, 2022



Figura 6. Foto panorámica del LEMS

Fuente: CPC, 2022



Figura 7. Sistema de combustión a biomasa

Fuente: CPC, 2022

4. Resultados y discusión

El reporte técnico ISO 19867-3 objetivos voluntarios de rendimiento para cocinas, proporciona orientación sobre el rendimiento de las estufas en relación con las métricas de emisiones, eficiencia térmica, seguridad y durabilidad. La escala para clasificar el desempeño es de 0 a 5, donde el nivel 0 representa el desempeño más pobre y el nivel 5 el mejor.

Se realizaron 5 pruebas a la cocina “Diamond Peak Lite” de la marca Stovetec con un dispositivo de inyección de aire secundario (Jet-Flame), y se obtuvieron resultados para las métricas de eficiencia energética y emisiones para la fase de alta potencia, debido a que el ventilador del Jet-flame no cuenta con un dispositivo de regulación de velocidad para poder realizar la evaluación de la cocina a distintos niveles de potencia.

La eficiencia energética (EE) se refiere a la fracción del calor liberado por la combustión de biomasa que se utiliza en el calentamiento y evaporación del agua (ISO 19867,2018), los valores de eficiencia energética con y sin crédito energético del carbón obtenidos se encuentran en el rango de 45.4% - 51.3% y 44.5% - 49.4% respectivamente, el valor de la EE sin crédito energético del carbón remanente al final de la fase se calcula sustrayendo el calor proporcionado por el carbón al calor suministrado por el combustible, por ende la EE con crédito energético del carbón es más alta, los valores obtenidos para cada prueba se encuentran en la **Figura 8**.

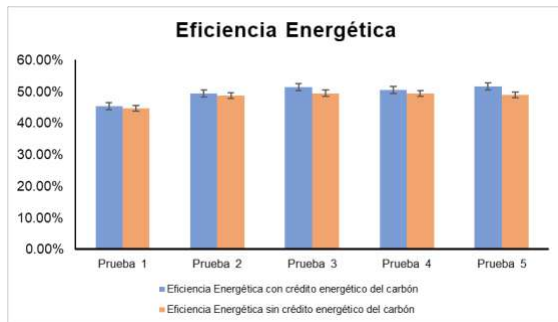


Figura 8. Eficiencias energéticas

Fuente: Elaboración propia

Las otras métricas relacionadas a eficiencia energética tales como la productividad energética del carbón remanente, la productividad de la masa de carbón remanente, la potencia de cocción y la tasa de combustión de biomasa permiten caracterizar el desempeño de la cocina, tomando en cuenta parámetros adicionales a la eficiencia energética como la cantidad de carbón producida durante una tarea de cocción simple y el aporte energético de este, la potencia de cocción indica la cantidad de energía proporcionada al recipiente de cocción en un periodo de 30 minutos y la tasa de combustión estima la cantidad de combustible necesaria para un periodo de uso de la cocina, los valores promedio de estas métricas se encuentran en la **Tabla 1**, junto a la desviación estándar e intervalos de confianza al 90%.

En la **Tabla 1** se obtuvo el valor del nivel para la eficiencia energética de la cocina

evaluada, este valor es 4, lo que indica un buen desempeño energético de la cocina comparado con una cocina tradicional de tres piedras cuyo nivel de desempeño es de 1 y su valor de eficiencia sería menor al 15% (Jetter, J., et.al.,2012)

Los resultados de eficiencia energética por sí mismos no pueden caracterizar el desempeño de una cocina de forma adecuada, es por eso que se obtuvieron las métricas de emisiones contempladas en la norma, los resultados y los intervalos de confianza al 90% de estas métricas también se muestran en la **Tabla 1**.

Los factores de emisión que contempla la norma para CO y PM_{2,5} son de gran importancia dado que pueden aproximar las exposiciones a los contaminantes a distintas potencias de cocción, ya que la potencia del fuego depende en gran parte del operador de la cocina, si la cocina se usa para tareas de cocción distintas a hervir agua puede que la potencia del fuego necesaria por el operador sea mayor y por ende la exposición a contaminantes también, es por esto que la prueba de la norma ISO no refleja el desempeño real de la cocina en campo, sin embargo, puede brindar información relevante para los fabricantes, consumidores y funcionarios públicos encargados de formular normativas legales y políticas

gubernamentales relacionadas a la calidad del aire intradomiciliario.

Como se aprecia en la **Figura 9** la tasa de emisión de monóxido de carbono de la cocina Stovetec, es mejor respecto de otra cocina mejorada estudiada en el CPC, de marca Gamadaric. Sin embargo, los valores obtenidos, sobrepasan el valor recomendado por la Organización mundial de la Salud equivalente a 0.23 g/min, valor que viene representado por la línea color azul. Los datos obtenidos pueden ser el resultado del modelo de la cocina. En la **Figura 10** se puede observar la tasa de emisión del material particulado menor a 2.5 micras. En esta gráfica se observa claramente la diferencia en la tasa de emisión en mg/min respecto a la cocina mejorada tipo Gamadaric. Al comparar los resultados de la cocina Stovetec respecto del valor recomendado por la Organización mundial de la Salud equivalente a 0.16 g/min, se puede observar que existe una diferencia. La cocina marca Stovetec no cumple con los valores recomendados por la OMS, se han obtenido valores intermedios en cuanto a las emisiones.

Al comparar las tasas de emisión de CO y PM2.5 que se muestran en la **Tabla 1** con los valores objetivos de tasas de emisión proporcionados por la OMS los cuales son 0.16 g/min para CO y 0.23 mg/min para

PM2.5 la cocina no cumple con los objetivos proporcionados por la OMS.

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar un sistema de cocción novedoso con un tiro inducido por un ventilador en la base del lecho de combustible, como se ha expuesto anteriormente, las pruebas de laboratorio controladas de la norma ISO no pueden reflejar completamente las pruebas de campo, sin embargo, se espera que puedan emular las condiciones de campo en la mayor medida posible de forma controlada. Es necesario ampliar la investigación de campo para proporcionar información crítica sobre las condiciones de uso reales que no se pueden duplicar en las pruebas controladas. Por lo tanto, es necesario que en el futuro se haga hincapié en la coordinación entre los ensayos controlados de laboratorio y los ensayos de campo.

Tabla 1

Resumen métricas de eficiencia energética y emisiones

Métrica	Resultado final
Energía útil suministrada [kJ]	2872.995 ± 510.292
Eficiencia energética con crédito de energía para el carbón remanente [%]	48.575 ± 2.38
Eficiencia energética sin crédito energético para el carbón remanente [%]	47.011 ± 1.363
Productividad energética del carbón [%]	3.394 ± 1.659
Productividad de la masa del carbón [%]	1.993 ± 0.974
Potencia de cocción [kW]	3179.996 ± 439.913
Tasa de quema de combustible [g/min]	10.465 ± 1.524
Masa de PM2.5 por unidad de energía útil suministrada [mg/MJ]	89.419 ± 23.533
Masa de PM2.5 por unidad de tiempo [mg/min]	9.099 ± 0.808
Masa de Monóxido de Carbono por unidad de energía útil suministrada [g/MJ]	2.404 ± 0.726
Masa de Monóxido de Carbono por unidad de tiempo [g/min]	0.309 ± 0.121
Masa de Dióxido de Carbono por unidad de energía útil suministrada [g/MJ]	211.734 ± 15.537
Masa de Dióxido de Carbono por unidad de tiempo [g/min]	19.404 ± 1.421

Fuente: Elaboración propia

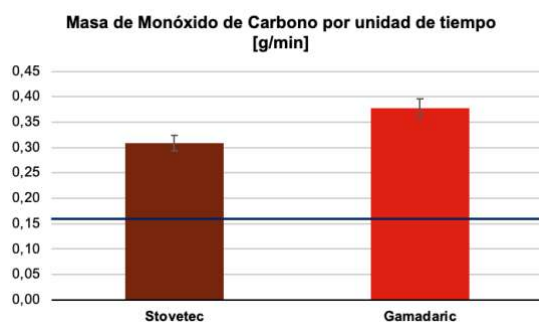


Figura 9. Tasa de emisión de Monóxido de Carbono en g/min de la cocina Stovetec vs. la cocina Gamadaric

Fuente: Elaboración propia

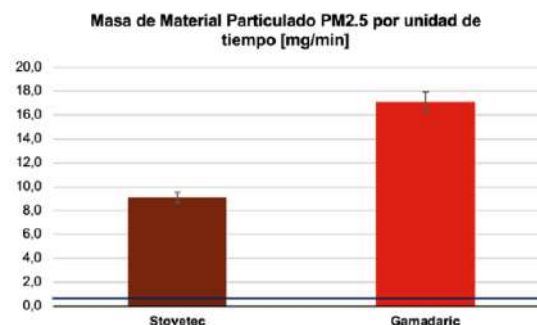


Figura 10. Tasa de emisión de Material Particulado 2.5 en mg/min de la cocina Stovetec vs. la cocina Gamadaric

Fuente: Elaboración propia

5. Conclusiones

Se cumplieron con los objetivos establecidos en el presente proyecto. Se implementó el protocolo de evaluación de cocinas mejoradas bajo la ISO 19867: 2018 en los procedimientos de trabajo del Centro de Pruebas de Cocinas, es así que el CPC se convierte el segundo laboratorio en Latinoamérica y único en Sudamérica que cumple con los requisitos de la norma.

Se realizaron cinco réplicas para la evaluación de eficiencia energética y emisiones utilizando el Sistema de Laboratorio para Monitoreo de Emisiones (LEMS) en una cocina mejorada “rocket” a biomasa. Los resultados de las métricas obtenidas y procesadas se encuentran en la **Tabla 1**, y en las **Figuras 8, 9 y 10** se muestran los valores de eficiencia energética con y sin crédito energético del carbón y la relación de las tasas de misión

de CO y PM2.5 vs. otra cocina mejorada, marca Gamadaric, también se observan los valores recomendados de la OMS. Estos resultados, tanto de eficiencia energética como de emisiones son aceptables, ya que al compararlos con métricas internacionalmente aceptadas se encuentran dentro de los niveles que la ISO 19867:1 2018 exige. En cuanto a los valores recomendados por la OMS, tanto los diseñadores de este tipo de cocinas mejoradas, como los laboratorios de investigación tienen que seguir realizando esfuerzos para mejorar el diseño de las cocinas, para reducir el impacto ambiental de las mismas y reducir el impacto a la salud de los usuarios de este tipo de cocinas.

Se empleó un ventilador para evaluar la cocina con un tiro inducido. Este dispositivo permitió controlar un nivel de potencia de la llama para el hervor del agua durante las pruebas.

Mediante el análisis que se realizó posterior al procesamiento de los datos, se puede concluir que los valores de eficiencia energética con y sin crédito energético del carbón son hasta 3 veces superiores a cocinas a tres piedras.

Se deben tomar acciones prontas para ampliar el acceso a las cocinas limpias, especialmente en áreas rurales donde aún

se utiliza la biomasa como fuente de energía, de esta manera se estaría velando por mejorar la salud, la calidad de vida y las condiciones ambientales de los usuarios.

6. Bibliografía

- CPC Bolivia. (2021). Recuperado de: <https://cpc-bolivia.org/>
- ARC. (2022). Aprovecho Research Center. Recuperado 17 de junio de 2022: <http://aprovecho.org/>
- CCA. (2020). Clean Cooking Alliance. Clean Cooking Alliance - Home. Recuperado de: <https://cleancooking.org/>
- ISO. (2018). ISO/TR 19867–3:2018. ISO/TR 19867–3:2018. Recuperado de: <https://www.iso.org/standard/73935.html>
- INE. (2012). Instituto Nacional de Estadística. Recuperado de: <https://www.ine.gob.bo/>
- Chen, Y., Shen, G., Su, S., Du, W., Huangfu, Y., Liu, G., Wang, X., Xing, B., Smith, K. R., & Tao, S. (2016). Efficiencies and pollutant emissions from forced-draft biomass-pellet semi-gasifier stoves: Comparison of International and Chinese water boiling test protocols. *Energy for Sustainable Development*, 32, 22–30.

<https://doi.org/10.1016/j.esd.2016.02.008>

- Jetter, J., Zhao, Y., Smith, K. R., Khan, B., Yelverton, T., Decarlo, P., & Hays, M. D. (2012). Pollutant emissions and energy efficiency under controlled conditions for household biomass cookstoves and implications for metrics useful in setting international test standards. *Environmental Science and Technology*, 46(19), 10827–10834. <https://doi.org/10.1021/es301693f>
- Champion, W., Hays, M., Williams, C., Virtaranta, L., Barnes, M., Preston, W., Jetter, J. (2021). Cookstove emissions and performance evaluation using a new ISO protocol and comparison of results with previous test protocols - Supporting information. *Environmental Science & Technology*. Recuperado de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.1c03390?goto=supporting-info>
- APPA Renovables. (2018). ¿Qué es la biomasa? Recuperado de: <https://www.appa.es/appa-biomasa/que-es-la-biomasa/>

7. Financiamiento

El financiamiento de la Clean Cooking Alliance al Centro de Pruebas de Cocinas

para que el sistema de monitoreo de emisiones pueda cumplir con los requisitos de la norma ISO 19867-1:2018 consistió en material para el control de calidad como nuevos sensores para el monitoreo de emisiones, dispositivos de medición de flujo, gases de calibración, un ciclón y filtros para la medición de material particulado bajo el protocolo ISO 19867-1:2018. Adicionalmente dos semanas de entrenamiento sobre la aplicación del protocolo ISO 19867-1:2018 al personal del CPC, impartido por el ingeniero Samuel Benston, director de Aprovecho Research Center. El entrenamiento consistió en: la verificación de la instalación del sistema bajo la norma ISO 19867-1:2018, introducción a las pruebas de estufas y a la norma ISO 19867-1:2018, procedimientos de control de calidad, elaboración de informes y documentación de los resultados de las pruebas de evaluaciones de estufas, pruebas de durabilidad y seguridad con los instrumentos disponibles.

8. Agradecimiento

A los docentes investigadores del Centro de Pruebas de Cocinas, perteneciente al Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos de la Universidad Mayor de San Andrés por su mentoría y ayuda integral a lo largo de la realización de este proyecto.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

A la Clean Cooking Alliance por la gestión del financiamiento, el apoyo proporcionado al laboratorio con respecto a equipamiento y capacitación;

Al Aprovecho Research Center de la Universidad de Oregón por la retroalimentación y capacitación;

A nuestros compañeros de laboratorio Fabiana Paz, Jazmin Ruiz y José Alanoca por el apoyo brindado en la realización de las pruebas.

Pyronin Y, un colorante de ácidos nucleicos con altas prestaciones para detección temprana de NETosis mediante microscopía de fluorescencia multimodal.



"Generación de Conocimiento

con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos"

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

C.25 Ciencia, Tecnología e Innovación

Pyronin Y, un colorante de ácidos nucleicos con altas prestaciones para detección temprana de NETosis mediante microscopía de fluorescencia multimodal.

Autor: Chacón, Alejo; alejochacon96@gmail.com

Co-autores: Machtey, Matías; Etchart, Juan; Tolley, Rocío; Cettour, Hermes; Gareis, Débora; Salim Taleb, Nasim

Profesor Tutor: Schierloh, Pablo; pablo.schierloh@uner.edu.ar

Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), Facultad de Ingeniería (FI)

Resumen

En búsqueda de alternativas costo-efectivas para el desarrollo de micrométodos de *screening multiwell* para el monitoreo de NETosis, se analizaron varios intercalantes de DNA. A partir de preparaciones comerciales de *Methyl Green-Pyronin Y* se encontró que el segundo componente posee propiedades espectroscópicas compatibles con los objetivos buscados. Trabajando con cromatografía analítica se desarrolló un sencillo método de purificación mediante extracción sólido-líquido en acetona. El compuesto purificado, disuelto en DMSO y diluido en PBS presenta una coloración rosada, es biocompatible, fotoestable y sólo es internalizado en células no viables o fijadas químicamente. Este sistema exhibe una absorción máxima a 548nm por lo que es excitable por líneas 514nm y 561nm, con un pico de emisión de 571nm. Experimentos de 2,5hs de incubación de leucocitos polimorfonucleares humanos con Glucosa Oxidasa confirmaron la utilidad de *Pyronin Y* en la detección de figuras NETóticas. Ensayos de microscopía de superresolución indican que el compuesto permite detectar las alteraciones en los núcleos multilobulados de PMN que constituyen los pasos iniciales de entrada en NETosis. Microscopias de tiempo de vida media de fluorescencia (*FLIM*) en dominio temporal demuestran la utilidad del compuesto para diferenciar entre NETs vertidas al medio extracelular y el material genético constituyente del núcleo.

Palabras clave: *Pyronin Y*, NETosis, Microscopía de barrido láser confocal de Superresolución óptica (SR-LSCM), Microscopía de vida media de fluorescencia (*FLIM*).



● Introducción

Hace menos de 20 años se descubrió que los granulocitos neutrófilos (PMN, polimorfonucleares) inducidos a producir cantidades suficientemente altas de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) de manera intracelular, reaccionan extruyendo al medio extracelular cromatina decorada con proteínas bactericidas (Brinkmann, *et al.* 2004). Debido a que la cromatina liberada forma una estructura similar a una red (“NET” que en inglés significa “red” y además es acrónimo de “*Neutrophil Extracellular Traps*”) y que este fenómeno conduce a la muerte de la célula, se lo bautizó “NETosis” en alusión a otras formas de muerte celular mejor conocidas por entonces: Necrosis, Apoptosis y Piroptosis (Fuchs *et al.* 2007). Los mismos autores también advirtieron que debido a su contenido de histonas y proteínas granulares, las NETs pueden unir y matar bacterias y levaduras (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009). A la luz de la evidencia acumulada desde entonces, hoy se considera a la formación de NETs un evento central en la inmunidad innata contra microorganismos extracelulares dado que evita su propagación fijándolos a una matriz reticular que contiene una elevada concentración local de agentes antimicrobianos. Por ejemplo, los

pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), que no pueden generar NETs debido a mutaciones en alguna subunidad de la enzima NAD(P)H oxidasa, son muy susceptibles a diversas infecciones (“chicos de la burbuja”) (Steinberg & Grinstein 2007). Recientemente se demostró que la restauración -mediante terapia génica- de la formación de NETs da lugar a resistencia a dichas infecciones en niños nacidos con CGD (Bianchi *et al.* 2009). Por otro lado, la formación excesiva de NETs, puede inducir lesión de células endoteliales vasculares (Doring *et al.* 2013), trombosis (Fuchs *et al.* 2012) y retardo en la curación de heridas diabéticas (Wong, *et al.* 2015). Además, se ha demostrado que defectos en la regulación de la NETosis y la remoción ineficaz de las NETs están involucrados en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, incluidos lupus eritematoso sistémico (SEL) (Hakkim, *et al.* 2010) y vasculitis asociada a autoanticuerpos contra antígenos citoplasmáticos del neutrófilo (ANCA) (Kessenbrock *et al.* 2009, Nakazawa *et al.* 2014). Laboriosos métodos microscópicos (Ej: Microscopía de barrido electrónico (SEM), inmuno-TEM y microscopía de barrido láser confocal (LSCM) combinado inmunofluorescencia multicolor y reconstrucción en 3D) han desempeñado



un papel fundamental en el descubrimiento y posterior caracterización mecanicista de la NETosis (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009). Los rigurosos estándares experimentales impuestos tácitamente por estos estudios seminales, como así también la naturaleza lábil y reactiva de los granulocitos *in vitro*, signaron la investigación ulterior, limitando y restringiendo el desarrollo de bioensayos “*high throughput*” en este campo (Masuda et al. 2016).

Durante los últimos años, empleando métodos convencionales cómo “*gold-standards*” se han ido validando una serie de ensayos alternativos tendientes a simplificar, acelerar, automatizar y/o abaratar el análisis *in vitro* de la NETosis. En esta línea, bioensayos basados en citometría de flujo (Masuda et al. 2017), “*Flow imagine*” (Lelliott et al. 2019), LSCM “*end-point*” (Kraaij et al. 2016) y LSCM “*time-lapse*” (Hoppenbrouwers et al. 2017) demostraron alta correlación con los métodos convencionales y claras ventajas sobre su posibilidad de miniaturización (micrométodo) y su consecuente aplicabilidad en estudios de *screening* farmacológico. En particular, los estudios basados en video-microscopía (LSCM “*time-lapse*”) presentan una ventaja adicional dado que permiten una caracterización dinámica del proceso,

permitiendo discernir entre los dos tipos de mecanismos fundamentales de NETosis: i) “NETosis suicida”, dependiente de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) y de desarrollo lento (3hs) post-estimulación y ii) “NETosis vital”, independiente de ROS y rápida respuesta (10-30min) (Yipp & Kubes 2013, Rochoael, et al. 2015).

Con el objeto de identificar nuevas drogas que inhiban o promuevan la NETosis, hemos decidido innovar en nuevas aproximaciones experimentales que sean a la vez automatizables y económicas. Como primer paso, comparamos el desempeño de diferentes tipos y combinaciones de intercalantes y colorantes de contraste fluorescente como DAPI, PI, Azul de Evans, Verde de Metilo, Brillant green, CFDA, Safranina O entre otros. En este trabajo proponemos que *Pyronin Y*, un reactivo clásico de la histología comercializado en mezcla con verde de metilo, presenta altas prestaciones para el monitoreo de este particular mecanismo de muerte mediante técnicas multimodales de LSCM.

- **Objetivos**

Nuestro grupo de trabajo tiene por objetivo general el desarrollo de nuevos micrométodos multipocillo sensibles y costo-efectivos basados en LSCM para el *screening* de nuevos fármacos agonistas



y antagonistas de NETosis y otras formas de muerte celular programada. En esta línea, en el presente trabajo nos propusimos la identificación, purificación y posterior caracterización de un compuesto intercalante xantenoide fluorescente -clásicamente empleado en microscopía de campo claro- que, en función de sus características funcionales, espectroscópicas y bajo costo relativo, demostró un alto potencial tecnológico para ser utilizado en determinación de NETosis mediante técnicas multimodales de LSCM.

- **Materiales y métodos**

1. Espectroscopía UV-Visible

Como etapa inicial y con el fin de caracterizar las longitudes de onda óptimas para la excitación de los fluoróforos presentes en los colorantes utilizados en el estudio, se realizó una prueba de absorbancia sobre los mismos utilizando un espectrofotómetro Biotraza modelo 752. La misma consistió en un barrido espectral del UV cercano y espectro visible (200-700nm) realizando pasos de 5nm sobre muestras de colorante disueltas en PBS (pH 7,2) hasta que los valores de absorbancia obtenidos se encontraran dentro del rango de medición para todo el espectro analizado. Ante cada cambio en la longitud de onda utilizada, la muestra de colorante fue

comparada con un control del solvente puro para descartar posibles variaciones aleatorias o provocadas por alteraciones propias del equipo.

2. Cromatografía analítica

En un primer intento por separar el *Pyronin Y* de la solución inicial (verde de metilo+cristal violeta+pyronin Y) y testear sus propiedades como colorante para fluorescencia aislado, se optó por preparar una muestra del compuesto comercial disponible disuelto en etanol (5% m/v) y realizar múltiples corridas cromatográficas empleando celulosa como fase estacionaria (papel Whatman, grado 1) y aplicando distintos solventes (metanol, etanol, acetona, PBS, H₂O_d), tanto puros como combinados en distintas proporciones, como fase móvil. Sobre los resultados obtenidos (Fig. 1-B) se realizaron análisis cualitativos con luz visible (coloración sobre el papel según la efectividad del solvente utilizado para separar los 3 componentes de la solución) y UV (separación en componentes fluorescentes y opacos) a fin de identificar los coeficientes de partición más convenientes para el diseño racional de un protocolo de separación preparativo.

3. Obtención y preparación de *Pyronin Y*

En función del comportamiento de la mezcla comercial frente a los diferentes solventes orgánicos, acuosos y mezclas miscibles, se decidió probar 2 estrategias

de separación preparativa: i) una partición Líquido-Líquido empleando PBS-Cloroformo como fases acuosa y orgánica, respectivamente; ii) una secuencia de extracción Sólido-Líquido empleando primero cloroformo, luego acetona y finalmente PBS como solventes de extracción. Para ambos métodos, la fracción de interés (cloroformo (i) y acetona (ii)) fué llevada hasta la desecación total en rotavapor y los sólidos obtenidos fueron pesados y disueltos en DMSO anhidro (Sigma, calidad Biología Molecular) al límite de solubilidad (~30 mg/mL). El sistema fué luego diluido en PBS esteril (pH 7,2) hasta alcanzar la biocompatibilidad del vehículo en la concentración experimental final (DMSO < 0,05%v/v en cultivo). Las fracciones de *Pyronin Y* así preparadas fueron almacenadas en heladera a 4°C en oscuridad donde permanecen estables por al menos 4 meses. La pureza de las preparaciones fué estimada por espectroscopía UV (250-390nm), Visible (430-700nm) y cromatografía en papel (Whatman, grado 1 y/o nitrocelulosa).

4. Purificación de PMN

El proceso de purificación de los PMN comienza con un paso de centrifugación para separar y extraer el mayor contenido posible de plasma y plaquetas, seguido de resuspensión de la muestra al doble del volumen original con PBS (pH=7,2).

Luego se realiza una extracción primaria PMN mediante un gradiente de Ficoll-Paque (0,5ml solución *Nycoprep* por ml de sangre). Una vez realizado el sembrado, la muestra es centrifugada (15', 500xg). Luego de retirar el halo de leucocitos mononucleares, se extrae un buffy coat rico en PMN y eritrocitos, el cual es resuspendido con PBS y centrifugado nuevamente (10'). Por último, la sedimentación por Dextran (1%*m/v*) permite la separación de la mayor parte de los eritrocitos. Para esto se mezclan una parte de buffy coat, una parte de Dextran 6% y 4 partes de solución fisiológica, se mezcla por inversión y se deja sedimentar durante 20 minutos. Pasado este tiempo se extrae la fase de menor densidad (líquido rojizo transparente), se diluye al 50% con PBS (1X, pH 7,2) y se centrifuga (10') para obtener un pellet con eritrocitos y alto contenido de PMN. Finalmente se realiza un lisado a los eritrocitos remanentes resuspendiendo el pellet en 9 partes de agua bidestilada por 30" y se detiene la lisis con 1 parte de PBS 10X para luego repetir el paso de lavado y contabilizar las células en cámara de Neubauer. Un total de 10 muestras de sangre periférica fueron empleadas para el presente estudio.

5. Cultivo e inducción enzimática de H₂O₂



Para el cultivo de PMN se trabajó con cubetas de acrílico ajustables para cubreobjetos circulares (\varnothing 16mm), ambos fueron esterilizados mediante un ciclo de calor húmedo de 36' en olla a presión eléctrica y montados en condiciones de esterilidad para evitar contaminación de la superficie de cultivo. El cubreobjetos se pretrata durante 30' en un ambiente saturado de vapor de agua a 37°C con 50 μ l de solución 1mg/ml de colágeno Tipo I bovino (Sigma), que actuará como sustrato para la adhesión celular mediada por integrinas y otras adhesinas de membrana. Pasado el tiempo de incubación, se retira el excedente de colágeno no adherido y se incuba la superficie durante 15' con 50 μ l de medio bloqueante (100 μ l solución 10x M199 + 900 μ l H₂O bidestilada + 110 μ l plasma autólogo pobre en plaquetas) para neutralizar sitios de unión no específicos. Luego del bloqueo, se extrae la solución y se procede con la adhesión de neutrófilos, dispensando 50 μ l de suspensión 3x10⁶ PMN/ml (1,5x10⁵ PMN/cubreobjetos) e incubando por 40' a 37°. Una vez finalizada la adhesión, se procede a realizar la inducción la NETosis con Glucosa Oxidasa (GO) que cataliza la oxidación de la glucosa presente en el medio de cultivo para formar D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para esto se retira la

suspensión con neutrófilos no adherentes y se agregan 50 μ l de solución inductora (1ml medio de bloqueo + 4 μ l GO 1UI/ml, preparada inmediatamente antes de iniciar la estimulación) o medio control y se incuba durante 150', tras lo cual se agregan suavemente 200 μ l de PFA 4% frío para fijar la muestra ON a 4°C o 15' a T° ambiente.

6. Tinción y montaje

La células fijadas fueron teñidas *in situ* (en cubeta de cultivo) mediante el agregado de 20 μ l del/los colorante/s (Purificado de *Pyronin Y*= 1 μ g/ml; Fase acuosa de reactivo comercial extraído con CHCl₃ (MG:PyY \approx 1:1)= 5 μ g/ml; Evan's blue= 10 μ g/ml). Luego de 10' de incubación a T° ambiente en cámara húmeda se retira el exceso colorante y se lava (suavemente y por las paredes del recipiente para evitar la remoción mecánica accidental de células y/o NETs) con 200 μ l de PBS. Finalmente, los cubreobjetos se desmontan de las cámaras de cultivo y se montan en portaobjetos empleando glicerol:PBS 10x (9:1, pH 8) como medio de montaje y pintañas transparente para el sellado y sujeción del cubre al portaobjetos.

7. Configuración del sistema LSM 880

La estación de trabajo de microscopía confocal multimodal LSM880 (Zeiss, Alemania) instalada en el LAMAE (IBB-UNER-CONICET, FING), fué

empleada en todos los ensayos de microscopía. El equipo cuenta con 7 líneas de excitación provistas por un Láser multibeam de gas Argón (458nm, 488nm y 514nm, 25mW), un laser rojo de HeNe (633nm, 5mW), un diodo bombeado de Estado Sólido verde (DPSS, 561-10nm, 20mW) y 2 láser violetas de Diodo pulsado (405nm, 440nm, 30mW) que son necesarios para FLIM. Además, el equipo cuenta con un arreglo de 3 fotodetectores que permiten análisis multiespectral de la emisión de fluorescencia (3-channel QUASAR detection system, Zeiss), un sistema de superresolución de 32 canales que permite mejorar la resolución XYZ por debajo del límite de difracción (Airyscan[®], Zeiss), un módulo para adquisición de FLIM (Becker & Hickl, Alemania), una cámara de cultivo termostatzada con platina piezo motorizada y 2 PC de altas prestaciones equipadas con los softwares de control del equipamiento y el procesamiento digital de imágenes.

8. 3D-LSCM (z-stack)

Empleando fuentes de excitación de 458, 488, 514, 561 y 633nm, el objetivo de inmersión en aceite de 63X (Objective Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27, Zeiss) y el sistema de detección QUASAR, se adquirieron secciones ópticas de fluorescencia o DIC a lo largo del eje z. Las imágenes generadas fueron

combinadas en series de imágenes 3D (z-stacks) con formato ".czi". Según el experimento se almacenaron 2 o 3 canales, 1 para DIC y el resto para colores. Este tipo de adquisición se efectuó sobre 10 experimentos de tinción independientes.

9. LSCM espectral (λ -stack)

Empleando fuentes de excitación de 633nm, 440nm y 561nm y el mismo lente objetivo se seteó el sistema de detección QUASAR para la obtención de barridos espectrales de emisión en rangos comprendidos entre 530 y 725nm con ventanas de 5nm sobre diferentes regiones de interés (ROI) trazadas sobre los núcleos de PMN. Las imágenes de fluorescencia adquiridas a lo largo del barrido fueron combinadas en archivos ".czi" constituidos por series de imágenes 2D de un canal (λ -stacks). Las determinaciones se repitieron entre 3 a 6 veces con tinciones independientes.

10. Superresolución óptica (SR-LSCM)

Empleando la fuente de excitación de 561nm, el objetivo 63X y el módulo de detección AiryScan, se obtuvieron, procesaron y almacenaron z-stacks de fluorescencia (BP 595/50) de superresolución óptica (140nm). Esta clase de adquisición se repitió en 4 experimentos independientes.

11. Recuperación de fluorescencia post-fotoblanqueo (FRAP)

Empleando el láser de diodo pulsado de 440nm al 100% de su potencia se irradian áreas circulares de lóbulos nucleares de PMN por 1 minuto y registró la pérdida y recuperación de fluorescencia en el área irradiada empleando el láser de 561nm y la banda de detección de 595/50nm. El experimento de FRAP se reprodujo usando 5 tinciones independientes.

12. Micrografía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM).

Empleando el láser de diodo pulsado de 440nm al 4% de su potencia y el canal de detección de 500-550nm (*Channel 2*), se recolectaron durante 2 minutos los fotones emitidos por los píxeles de la región de interés (*time domain FLIM*). Para el ajuste de las curvas de decaimiento se supuso un modelo exponencial doble y se fijó el criterio $0,8 \leq \chi^2 \leq 1,3$ para la bondad de ajuste. Los datos crudos fueron almacenados en archivos ".sdt" y procesados con el software SPCImage NG Data Analysis (Becker & Hickl, Alemania) para obtener los diagramas de fasores interactivos.

13. Análisis de datos e imágenes

Los datos espectroscópicos y de intensidades de fluorescencia fueron procesados y graficados con R y Excel (Microsoft). Las imágenes de LSCM fueron adquiridas y eventualmente procesadas digitalmente con el software

ZEN 2.3 (Zeiss, Alemania). El análisis cuantitativo de intensidades sobre imágenes de LSCM fué realizado con FIJI (Image J-NCBI). Las imágenes de FLIM fueron adquiridas y procesadas con los softwares SPCM y SPCImage NG Data Analysis, respectivamente (Becker & Hickl, Alemania).

● **Resultados y discusión**

Un trabajo relativamente reciente propone la utilización del intercalante *Methyl Green* como una alternativa económica para teñir núcleos de células muertas o fijadas químicamente en los equipos modernos de LSCM equipados con láser de 633nm (Prieto *et al* 2014). Nuestros experimentos preliminares orientados a la adaptación de esta técnica a nuestro equipo con una mezcla comercial de *Methyl Green-Pyronin Y*, nos llevaron a apreciar accidentalmente ciertas propiedades espectroscópicas muy útiles en el segundo componente de la mezcla (Figura 1A). Con el fin de caracterizar sistemáticamente tales observaciones desarrollamos un sencillo método de extracción sólido-líquido basado en la extracción secuencial con cloroformo, acetona y PBS (Figura 1C) basado en el análisis sistemático del comportamiento de la mezcla frente a diferentes sistemas de solventes (Figura 1B, sección 2 de M&M). El método de extracción

sólido-líquido secuencial propuesto aquí (sección 3 de M&M) permite separar de manera reproducible y sistemática ambos componentes de interés (i.e: *Methyl green* y *Pyronin Y*) además de librarnos de un producto de descomposición espontánea del *Methyl Green* ampliamente conocido como cristal violeta, que tiene aparejado el problema de actuar como un quencher

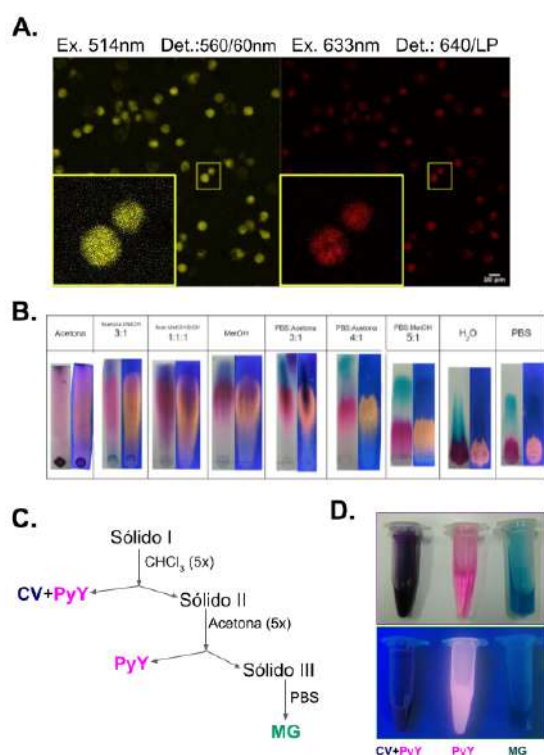


Figura 1: Obtención de *Pyronin Y* a partir de una mezcla comercial. **A.** Micrografías de barrido láser confocal (LSCM) de PMN humanos fijados (PFA 1%) y marcados con una dilución 1/1000 de la fracción acuosa de una extracción liq-liq ($H_2O:CHCl_3$ 1:1) del reactivo comercial. Se observa a la derecha, la fluorescencia característica del *Methyl Green* (Excitación 633nm, Detección 650/ long pass) y a la izquierda, una fluorescencia compatible con la de *Pyronin Y* (Excitación 514nm, Detección 560/60nm Band pass). **B.** Análisis del comportamiento cromatográfico del reactivo comercial (Gurr's Certistain, Lyon *et al.* 1987) frente a diferentes sistemas de solventes. **C.** Secuencia de extracción Sólido-Líquido empleada para obtener *Pyronin Y* (PyY) y *Methyl Green* (MG) en estado puro. **D.** Muestras de las fracciones de purificación iluminadas bajo luz blanca y luz negra.

de la fluorescencia del *Methyl Green*, además de una elevada citotoxicidad. Más aún, el método descrito se puede

escalar fácilmente para la obtención de cantidades mayores empleando la metodología de Soxhlet, permitiendo reducir el volumen de solvente de extracción por efecto del reflujo (resultados no presentados obtenidos recientemente). A partir del producto puro rediseñado en un sistema de solventes biocompatible y estéril (PBS autoclavado con menos de 0,05%v/v de DMSO de calidad Biología molecular, pH 7,2) caracterizamos la absorbancia en el espectro UV-visible. El producto obtenido presenta un espectro de absorción perfectamente compatible con *Pyronin Y* (Figura 2A y datos no presentados) con un pico de absorción máximo en el visible de 548 ± 2 nm y la ausencia de picos correspondientes a cristal violeta (585nm) y *Methyl Green* (631nm). El análisis espectrofotométrico de las restantes fracciones obtenidas corroboran la presencia de *Pyronin Y* junto a Cristal violeta en la fracción clorofórmica y de *Methyl Green* casi exclusivamente en la fracción de PBS (Figura 1C, 1D y datos no presentados). Coincidentemente con el espectro de absorción obtenido en solución, los PMN humanos periféricos teñidos con el producto purificado presentan mayor eficiencia en la recolección de señal fluorescente en la banda 610/90nm empleando la línea de excitación de DPSS 561-10nm (Figura 2B

y 2C) y no se detecta emisión por encima de 635nm al excitarlo con la línea 633nm a diferencia de la mezcla comercial (Mix) que contiene Methyl Green (Figura 3 y 1A).

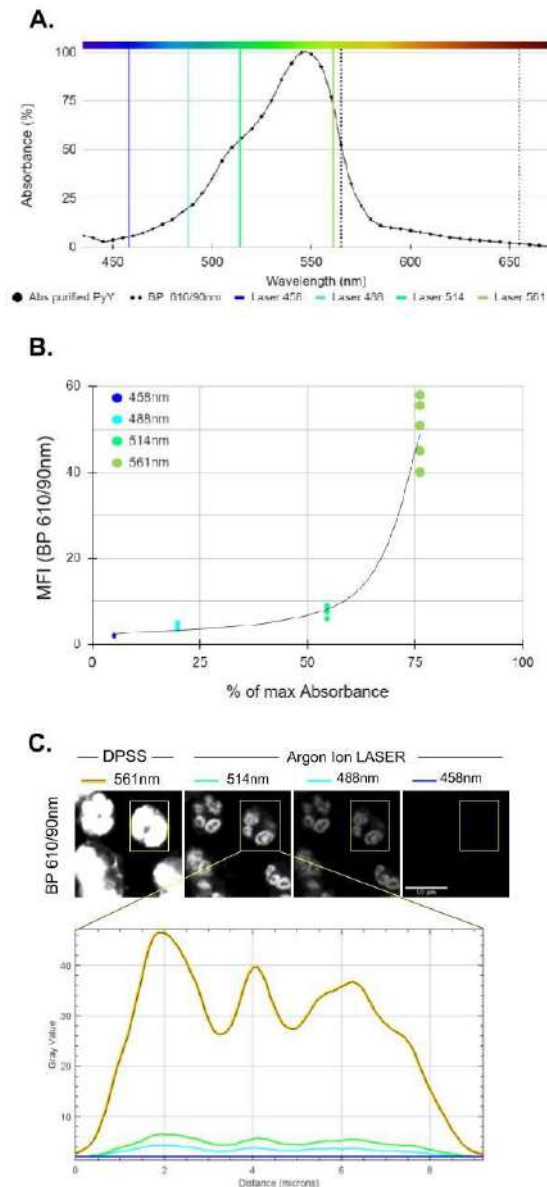


Figura 2: Propiedades espectroscópicas de Pyronin Y. A. Espectro de absorción en el visible del producto de purificación obtenido por extracción Sólido-Líquido (Acetona) disuelto en PBS-DMSO (0.01%v/v) ploteado junto a 4 líneas de excitación visible disponibles en el sistema LSM880 (Zeiss). B. Eficiencia de estas líneas de excitación fijadas a 0,2% de potencia sobre la emisión de PMN humanos marcados con Pyronin Y detectada en la banda 610/90(565-655)nm a ganancia fija (en función de la absorbancia relativa del producto de purificación disuelto en PBS-DMSO). C. Ejemplo representativo (n=5) de un análisis de intensidad de fluorescencia media de un núcleo de PMN humano (área rectangular destacada) teñido con Pyronin Y bajo las

condiciones de excitación indicadas en B. Con fines demostrativos, para que la señal sea perceptible en condiciones subóptimas de excitación (488 y 458nm), se aplicó el mismo incremento de contraste digital a todas las imágenes.

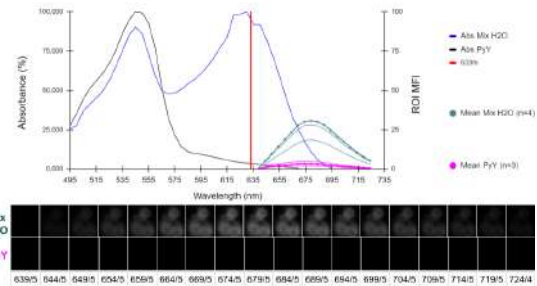


Figura 3: Emisión en el rojo del extracto acuoso de la mezcla comercial (Mix H2O) y del producto purificado (PyY). El gráfico muestra absorción en el visible (eje Y-izq., curva azul: MixH2O; curva negra: Py Y) junto a espectros de emisión (eje Y-der., curvas verdes: MixH2O; curvas magenta: Py Y) obtenidos bajo la modalidad λ -stack (rango de barrido 635-725nm, paso 5nm) para análisis espectral de la fluorescencia empleando el láser rojo HeNe 633nm al 0,2% de potencia como fuente de excitación (n=4).

Con el objeto de optimizar las condiciones de adquisición de imágenes de núcleos de PMN teñidos con Pyronin Y, se realizó un barrido espectral empleando el láser de 561nm como fuente de excitación y un arreglo de fotodetectores que permiten una adquisición discretizada de la señal en bandas de 5nm (modalidad λ -stack). En la figura 4A se observa el espectro de emisión con un pico situado a $579,0 \pm 2,5$ nm. A partir de estos resultados definimos una banda de detección óptima ($\approx 85\%$ área bajo la curva) comprendida entre los 570-620nm (*Band Pass* 595/50nm, coloquialmente “paso de banda centrado en una longitud de onda de 595nm con 50nm de ancho”) lo que abre la posibilidad de emplear el Pyronin Y en combinación con otros fluoróforos de

menor y mayor emisión como *DAPI*, *Methyl Green*, *FITC* y *Evan's Blue* (Figura 5) entre muchos otros.

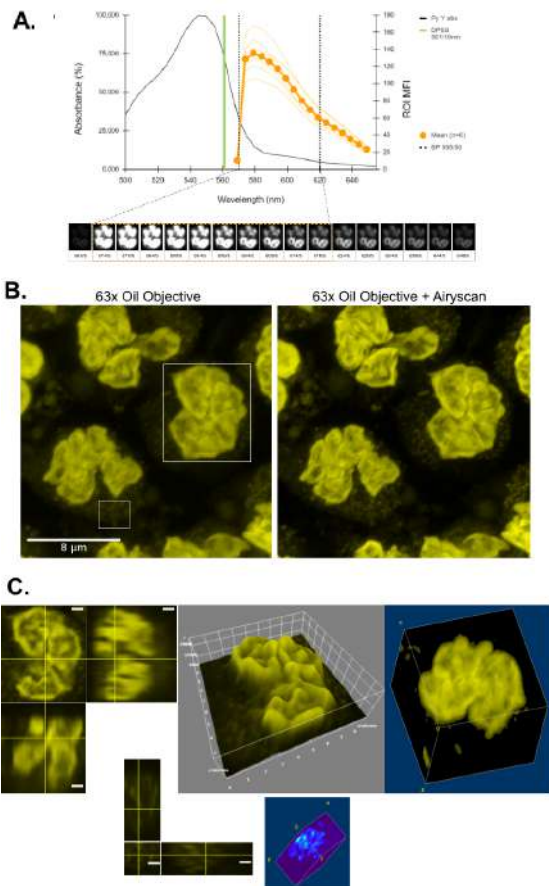


Figura 4: Condiciones y modalidades de adquisición de PMN humanos teñidos con *Pyronin Y*. A. Absorción en el visible de *Pyronin Y* junto al espectro de emisión obtenido bajo la modalidad λ -stack (rango de barrido 564-654nm, paso 5nm) para análisis espectral de la fluorescencia (n=6) empleando el láser DPSS 561-10nm al 0,2% de potencia como fuente de excitación. Esto permitió definir una banda de detección óptima (BP 595/50nm). B. Análisis morfológico de PMN fijados (PFA 2%) empleando las condiciones de adquisición establecidas en A. La micrografía de la izquierda es una proyección en eje z de intensidades máximas obtenida al límite de resolución óptica (Objetivo 63x, AN 1,4, inmersión en aceite). La micrografía de la derecha fue adquirida y procesada en modo de superresolución AiryScan[®](Zeiss) lo que se traduce en un aumento efectivo de 1,7X sobre la resolución óptica efectiva. C. La micrografía superior de la izquierda corresponde a una proyección ortogonal en el plano confocal medio del espacio recuadrado en B, y la micrografía inferior de la izquierda es una proyección ortogonal en el plano confocal medio del espacio granular recuadrado en B. Las barras blancas indican 1 μ m. A la derecha, la proyección tridimensional (fondo gris) y las reconstrucciones volumétricas (fondo azul) representadas en pseudocolor (amarillo) o mapas de calor (abajo) corresponden a las mismas áreas seleccionadas en B. Se presenta un ejemplo representativo de n=4 experimentos independientes realizados.

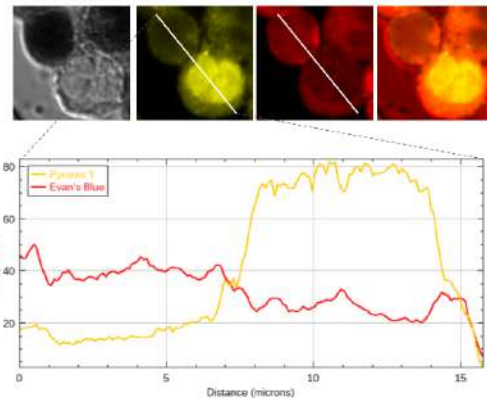


Figura 5: Tinción combinada de *Pyronin Y* con *Evan's Blue* en leucocitos humanos. Perfil de intensidad de emisión fluorescente de una transecta diagonal (línea blanca, 1pxl x 16 μ m) trazada sobre células teñidas simultáneamente con *Pyronin Y* (Ex. 561nm, Detección BP 595/50, canal “amarillo”) y *Evans Blue* (Ex. 633nm, Detección 650/LP, canal “rojo”). En el ejemplo se observa cualitativamente el efecto de *quenching* que tiene la sobrecarga de *Evans Blue* (área oscura en imagen de DIC) sobre la fluorescencia de *Pyronin Y* (célula pequeña) y viceversa (célula grande). Una caracterización formal de dicho fenómeno se encuentra en proceso con varios colorantes intercalantes y de contratinción.

Habiendo definido las condiciones óptimas de excitación y de adquisición de la señal de fluorescencia del *Pyronin Y*, lo siguiente que nos propusimos fue desarrollar estrategias de LSCM que nos permitan extraer información útil sobre alteraciones prematuras en la estructura del núcleo celular de los PMN indicativas del proceso de NETosis. Como los objetos de interés de nuestro estudio (subdominios de lóbulos nucleares) están en el orden del límite de resolución óptica ($\approx 0,2 \mu$ m), decidimos primero evaluar las prestaciones del módulo de detección *AiryScan* implementado en el sistema LSM 880 (Zeiss). En la figura 4B puede apreciarse un ejemplo del aspecto mejorado que tienen las imágenes de núcleos teñidos con *Pyronin Y* luego de la aplicación del procesamiento de superresolución. Más aún, sólo es

mediante esta modalidad de adquisición-procesamiento que se hacen evidentes en el citoplasma celular señales provenientes de los gránulos azurófilos (gránulos primarios) lo cual es un hallazgo interesante dado que no ha sido reportada previamente su afinidad por *Pyronin Y*. En tal sentido, un hecho que resulta sugestivo es la elevada similitud estructural que existe entre este colorante y *Azure A*, justamente el colorante que da el nombre a dichos gránulos (Figura 6).

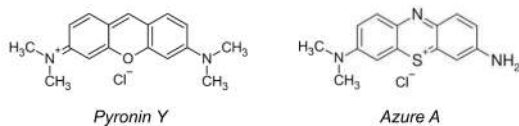


Figura 6: Similitud estructural entre *Pyronin Y* y *Azure A*. Estructuras de 2 colorantes xantenidos. La comparación resulta pertinente dada la aparente afinidad de *Pyronin Y* por los gránulos azurófilos de los PMN.

El siguiente paso fué evaluar la NETosis en las condiciones establecidas de adquisición-procesamiento de imágenes. La figura 6 demuestra que *Pyronin Y* es un reactivo útil para el monitoreo de NETosis. Más aún, el análisis de la intensidad de fluorescencia en proyecciones volumétricas de las células expuestas a GO por 2,5hs permite diferenciar núcleos que se encuentran en diferentes estadios del proceso NETótico.

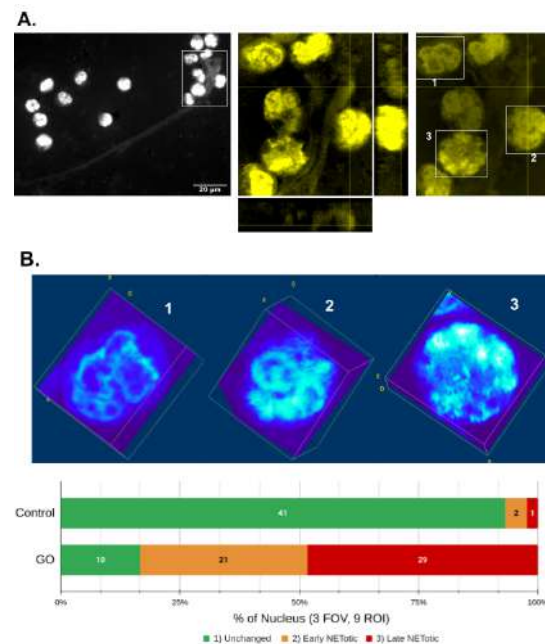


Figura 7: Análisis de PMN en NETosis teñidos con *Pyronin Y*. **A.** Análisis morfológico de PMN incubados en presencia de Glucosa Oxidasa (GO) por 150min. y luego fijados (PFA 2%), marcados con *Pyronin Y* y finalmente microfotografiados y analizados según figura 4B. A la derecha se presenta una región de interés (ROI) de un experimento representativo (n=4). Con el fin de resaltar la presencia de NETs, en la fotografía de la izquierda se intensificó el contraste de manera digital. Debajo y a la derecha de esta imagen se presenta la proyección ortogonal z-x y z-y de 2 planos centrados en una protrusión de una NET. En las áreas rectangulares delimitadas en la imagen de la derecha se muestran 3 ejemplos de núcleos con diferentes grados de alteración en respuesta al tratamiento con GO: 1) Núcleo sin cambios aparentes, 2) Núcleo con alteración en la morfología lobular y aumento de la descondensación de la cromatina (mayor incorporación de colorante), 3) Núcleo con pérdida total de la morfología lobular, descondensación de cromatina y/o vertido de material genético al medio extracelular. **B.** En la imagen superior se muestra la proyección volumétrica de un mapa de calor de la distribución de intensidad de fluorescencia de los espacios recuadrados en **A**. Debajo, se resumen los datos obtenidos a partir de 3 campos de observación (FOV) tomados al azar sobre los que se trazaron a su vez 3 ROI contabilizando 9 ROI por tratamiento (18 ROI por experimento). Los resultados presentados corresponden a 1 experimento independiente representativo de 4 realizados.

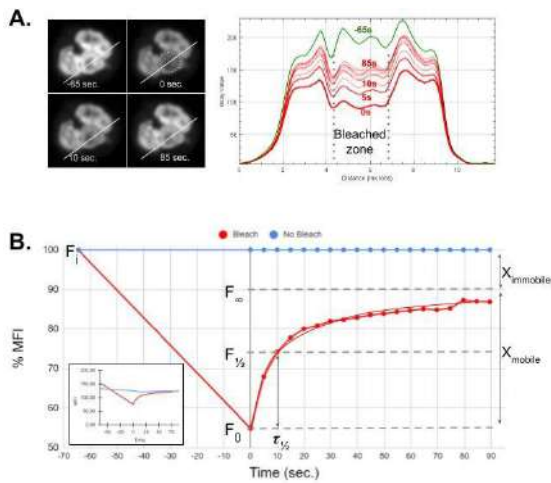


Figura 8: Fotoestabilidad y recuperación post-fotoblanqueo (FRAP) de Pyronin Y unido a núcleos de PMN humanos. A. Perfil de emisión de una transecta (línea blanca, 1pxl x 12 μ m) antes (-65 segundos, imagen superior izquierda, curva verde) y luego de irradiación (imagen sup. derecha, área dentro de circunferencia punteada \varnothing 2,5 μ m) con láser de diodo pulsado de 440nm a máxima potencia (curvas rojas). Al cabo del fotoblanqueo sólo se observa un 50% de reducción en la emisión inicial promedio del área irradiada ($F_i=200\pm 35$ a.u. vs $F_o=98\pm 18$ a.u.). **B.** Análisis FRAP de un experimento representativo. Inset, datos crudos. Los resultados demuestran una rápida tasa de recuperación post-fotoblanqueo ($\tau_{1/2}=10''$) lo que podría explicar la relativamente baja eficiencia de fotoblanqueo observada en A. Se presenta un experimento representativo de 5 realizados.

Otra propiedad de los fluorocromos intercalantes que podría ser explotada en bioensayos de NETosis podría ser su fotoestabilidad y vinculado a esta, la posibilidad de estudiar su afinidad de interacción con los ácidos nucleicos mediante estudios de FRAP (Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueo). Debido a que esta propiedad no ha sido reportada para Pyronin Y decidimos realizar una serie de determinaciones sobre PMN fijados y luego marcados con Pyronin Y. Sorprendentemente, el colorante mostró una elevada fotoestabilidad frente a una

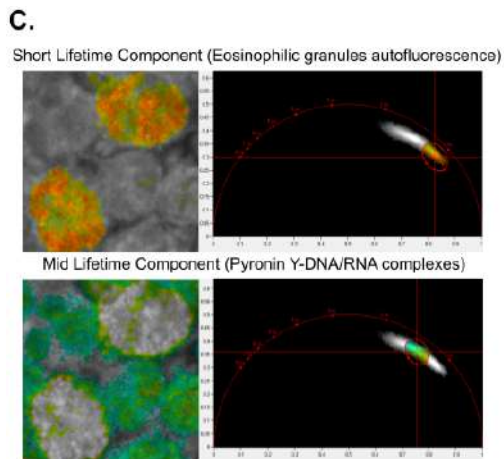
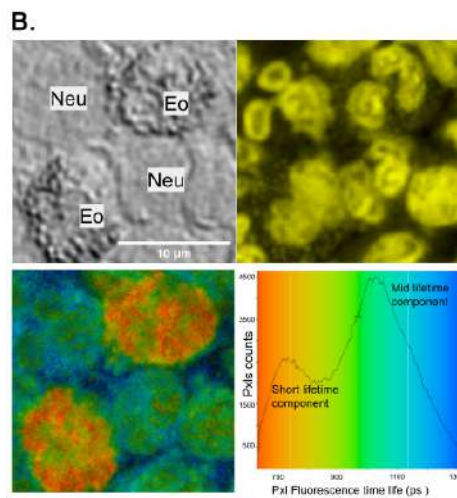
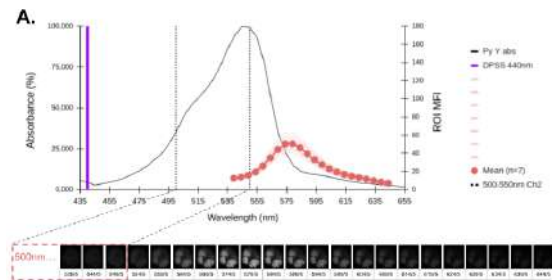


Figura 9: Condiciones de adquisición y análisis de leucocitos teñidos con Pyronin Y para estudios de FLIM en dominio temporal. A. Análisis espectral (λ -stack, ventanas de 5nm) de núcleos de PMN fijados (PFA 2%) teñidos con Pyronin Y y excitados con un Láser de Diodo pulsado 440nm 30mW al 4% de potencia para verificar la detección de señal en el intervalo 500-550nm (Channel 2) condición necesaria para realizar estudios de FLIM en el dominio temporal con el sistema Becker & Hickl implementado en la estación de trabajo LSM880 (Zeiss). **B.** Análisis de intensidad (imagen superior derecha) y de tiempo de vida media de fluorescencia FLIM (imagen inf. izq. e histograma) en PMN neutrófilos (Neu) y Eosinófilos (Eo) humanos periféricos fijados (PFA 2%) y teñidos con Pyronin Y. **C.** Análisis en el dominio temporal (time domain FLIM, Phasor plots) que permite diferenciar en el citoplasma de Eo un componente autofluorescente (C1) diferente de los complejos Pyronin Y-Ácido nucleico del núcleo celular (C2). Los tiempos de vida media observados son $\tau_{1/2}=730$ ps para C1 y de $\tau=1050$ ps para C2).

prolongada irradiación (≈ 1 min.) con luz violeta de 440nm de elevada intensidad (100% de potencia), presentando una reducción menor al 50% de la señal inicial y un tiempo de recuperación medio ($\tau_{1/2}$) de 10 segundos (Figura 8).

El siguiente objetivo fué evaluar la posibilidad de realizar determinaciones de FLIM con este colorante empleando la configuración disponible en nuestra estación de trabajo que cuenta con 2 líneas de excitación pulsada (405 y 440nm) y 2 canales de recolección de fotones (Ch1: 450-500 y Ch2:500-550nm) para este tal fin. En teoría, dada la fotoestabilidad del compuesto (Figura 8), si aumentamos lo suficiente la intensidad de iluminación podríamos obtener el nivel de señal necesaria ($\text{Chi}^2 > 1$) para realizar el ensayo empleando el Ch2 de detección. Para confirmar esta presunción se efectuó un barrido espectral (Figura 9A) y se observó que una pequeña cola de la gaussiana de emisión ($\approx 7\%$ del área bajo la curva) caía dentro del rango de detección. Otro problema que enfrentamos es que dentro de las poblaciones de granulocitos periféricos se encuentran los Eosinófilos (Eo) cuyos gránulos intracitoplasmáticos presentan elevada autofluorescencia en las condiciones de trabajo (Yakimov *et al.* 2019). En vistas de esto, realizamos una serie de experimentos exploratorios de

FLIM donde fijamos 3 variables de interés: i) Potencia mínima necesaria de la fuente de excitación; ii) tiempo mínimo de recolección de fotones emitidos por los complejos *Pyronin Y-DNA* y iii) Grado de interferencia de objetos autofluorescentes (i.e: gránulos de Eo). En la figura 9 se observa que el seteo del láser de 440nm al 4% de su intensidad permite el análisis FLIM en el dominio temporal. Más aún, éstas condiciones de adquisición-procesamiento de la imagen permiten resolver 2 componentes fluorescentes: un componente de corta vida media que se asocia a los gránulos de los Eo y otro de mayor vida media que se atribuye a *Pyronin Y* unido al DNA de los núcleos celulares.

Dada la gran diferencia entre la intensidad de fluorescencia del núcleo y de la NET, el registro microfotográfico de la NETosis plantea evidentes problemas en relación al ajuste de contraste: si se quieren evidenciar las NETs se hace necesario aumentar la ganancia de los fotodetectores lo que implica la saturación de los pixeles nucleares (Figura 7A). En función de esto, el análisis de FLIM se plantea como una alternativa potencialmente útil ya que las NETs -expuestas al medio extracelular-, proporcionan al colorante unido un entorno molecular diferente al encontrado en el núcleo celular lo cual podría afectar

su tiempo de vida media de fluorescencia característico. Para probar esto se repitieron los experimentos con GO de igual manera que en figura 7 pero en esta ocasión las imágenes se adquieren y procesan en la modalidad FILM (Becker & Hickl, Alemania).

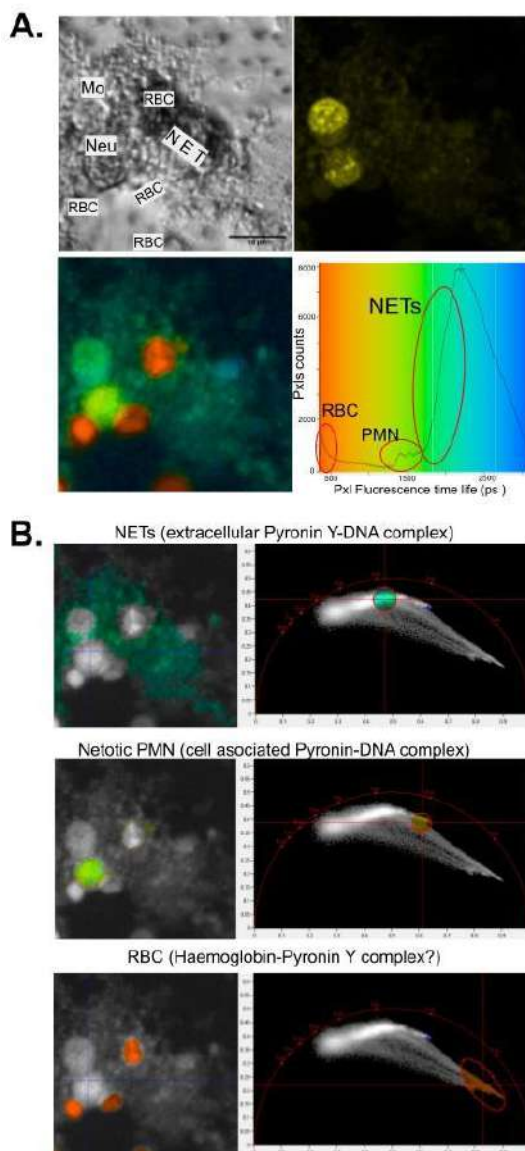


Figura 10: Aplicabilidad de Pyronin Y para estudios de NETosis mediante técnica FLIM. A. Análisis de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) en PMN neutrófilos humanos periféricos estimulados por 2,5hs con GO para inducir NETosis. Cumplido el cultivo las células fueron fijadas (PFA 2%) y teñidas con *Pyronin Y*. **B.** Gracias al análisis en el dominio temporal (*time domain FLIM-Phasor plot*) es posible diferenciar entre NETs, núcleos de células NETóticas, glóbulos rojos y células "viables" fijadas (Monocitos).

El análisis en el dominio temporal (nuestro equipamiento no permite el análisis en el dominio frecuencial) mediante diagramas de fasores permite demostrar claramente la aplicabilidad de esta técnica al ámbito de la NETosis ya que el colorante unido a las NETs presenta un aumento en el $\tau_{1/2}$ respecto de cuando se halla unido a los núcleos. Un hallazgo marginal interesante y frecuente fué la presencia de glóbulos rojos atrapados en las NETs. Resulta interesante notar que en éstas células anucleadas se evidencia una autofluorescencia con vida media muy corta que podría explicarse por la emisión del grupo Hemo de la hemoglobina y/o sus productos de oxidación Hemina y Hemoxina (Yakimov *et al.* 2019). Otra posibilidad que aún no podemos descartar es la formación de complejos o agregados entre *Pyronin Y* y hemoglobina de los glóbulos rojos, lo que no ha sido reportado previamente.

• Conclusiones

Se logró identificar, purificar y caracterizar *in vitro* un compuesto intercalante fluorescente con alto potencial tecnológico. La utilidad de *Pyronin Y* en la detección de NETosis temprana quedó claramente demostrada empleando métodos de microscopía multimodal de vanguardia. Encontrar nuevas



aplicaciones para este reactivo clásico de la histología permitirá el desarrollo de nuevos micrométodos automatizables y económicos para el *screening* de drogas que afecten las vías de transducción de señales vinculadas a diferentes tipos de muerte celular programada en leucocitos y otros tipos celulares.

• Bibliografía

- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., & Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 114(13), 2619–2622.
doi:10.1182/blood-2009-05-221606
- Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.
doi:10.1126/science.1092385
- Doring, Y., Weber, C., & Soehnlein, O. (2013). Footprints of Neutrophil Extracellular Traps as Predictors of Cardiovascular Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1735–1736.
doi:10.1161/atvbaha.113.301889
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., ... Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241.
doi:10.1083/jcb.200606027
- Fuchs, T. A., Brill, A., & Wagner, D. D. (2012). Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1777–1783.
doi: 10.1161/atvbaha.111.242859
- Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., ... Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9813–9818.
doi:10.1073/pnas.0909927107
- Hoppenbrouwers, T., Autar, A. S. A., Sultan, A. R., Abraham, T. E., van Cappellen, W. A., Houtsmuller, A. B., ... de Maat, M. P. M. (2017). In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLOS ONE*, 12(5), e0176472.
doi:10.1371/journal.pone.0176472
- Kraaij, T., Tengström, F. C., Kamerling, S. W. A., Pusey, C. D., Scherer, H. U., Toes, R. E. M., ... Teng, Y. K. O. (2016). A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil



- extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. *Autoimmunity Reviews*, 15(6), 577–584. doi:10.1016/j.autrev.2016.02.018
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönmarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., ... Jenne, D. E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*, 15(6), 623–625. doi:10.1038/nm.1959
- Lelliott, P. M., Momota, M., Lee, M. S. J., Kuroda, E., Iijima, N., Ishii, K. J., & Coban, C. (2019). Rapid Quantification of NETs *In Vitro* and in Whole Blood Samples by Imaging Flow Cytometry. *Cytometry Part A*. doi:10.1002/cyto.a.23767
- Lyon, H., Jakobsen, P., Høyer, P., & Andersen, A. P. (1987). An investigation of new commercial samples of Methyl Green and Pyronin Y. *The Histochemical Journal*, 19(6-7), 381–384. doi: 10.1007/bf01680456
- Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta*, 459, 89–93. doi:10.1016/j.cca.2016.05.029
- Masuda, S., Shimizu, S., Matsuo, J., Nishibata, Y., Kusunoki, Y., Hattanda, F., ... Ishizu, A. (2017). Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 91(8), 822–829. doi:10.1002/cyto.a.23169
- Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T., & Ishizu, A. (2014). Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 990–997. doi:10.1681/asn.2013060606
- Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30(11), 513–521. doi:10.1016/j.it.2009.07.011
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(3), 335–345. doi: 10.1007/s00418-014-1215-0
- Rochaël, N. C., Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., DeSouza-Vieira, T. S., Oliveira, M. P., Garcia e Souza, L. F., ... Saraiva, E. M. (2015). Classical



- ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Scientific Reports*, 5(1).
doi: 10.1038/srep18302
- Steinberg, B. E., & Grinstein, S. (2007). Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Science's STKE*, 2007(379), pe11–pe11.
doi: 10.1126/stke.3792007pe11
- Wong, S. L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A. B., ... Wagner, D. D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*, 21(7), 815–819.
doi: 10.1038/nm.3887
- Yakimov, B.P., Gogoleva, M.A., Semenov, A.N., Rodionov, S.A., Novoselova, M.V., Gayer, A.V., ... Shirshin, E.A. (2019) Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis. *Biomedical Optics Express* 10(8), 4220-4236.
doi: 10.1364/BOE.10.004220
- Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(16), 2784–2794.
doi:10.1182/blood-2013-04-457671
- **Financiamiento**
El trabajo experimental fué financiado por UNER (Proyectos PID6211 y Fortalecimiento-2019). CA fué becado por UNER (PID6211, 2021) y por el ministerio de Educación de la Nación Argentina (Beca Belgrano-2022). PS y EJ pertenecen a la carrera de CONICET en calidad de Investigador y personal de apoyo, respectivamente. MM es investigador de UNER. PS, EJ y MM son docentes de UNER. UNER cubre costos de traslado y estadía de CA para asistir a las XXIX JJI-2022.
 - **Agradecimiento**
Al Dr. Ing. Javier Adur, Ing. Fernando Balducci, Dra. Valeria Sigot, Dr. Victor Casco, Dr. César Gonzalez, Dr. Ing. Gastón Miño, Ing. Celina Bratovich, Dr. Ing. Martín Zalazar, Ing. Facundo Urteaga y al resto del *staff* del LAMAE y los laboratorios de Bioelectricidad, Fisiología y Biofísica de la FING y/o del IBB-UNER-CONICET.

Secuestro de Cu^{+2} en columnas de lecho fijo elaborado con alginato
pseudoplástico



C.25.Ciencia, Tecnología e Innovación.

Secuestro de Cu^{+2} en columnas de lecho fijo elaborado con alginato pseudoplástico

Autor: Rodríguez, Agustina Inés; e.mail: Agustinair_98@hotmail.com

Co-autor(es): Gómez, Franco Nicolás; e.mail: gomezfranco9508@gmail.com ;

Mendez, Fátima Carolina; e.mail: carolinamendez369@gmail.com

Profesor/a guía: González, Mariela; e.mail: magonzalez@herrera.unt.edu.ar

Tolay, Martín Maximiliano; e.mail: mtolay@herrera.unt.edu.ar

Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

La explotación del cobre a nivel industrial es una actividad económica relevante debido a sus prestaciones como conductor de energía. Por ello, el tratamiento de los efluentes que esta industria genera, resulta un desafío. Con este trabajo se buscó probar un método no convencional para la remoción de cobre de aguas residuales evaluando la eficacia de matrices esféricas de alginato secas y húmedas, en el secuestro de Cu^{+2} de soluciones diluidas a distintas concentraciones.

Para la producción de las esferas se trabajó con alginato de sodio al 4% (p/v) de características pseudoplásticas, sobre una solución de CaCl_2 . Luego de tiempo variable de *cross-linking* con intervalo de 15 minutos, desde 15 hasta 75, las matrices obtenidas se lavaron y se almacenaron a baja temperatura. Luego se deshidrataron en un secadero-balanza Brabender de flujo tangencial de aire a 32°C durante 1h 40 min.

Se prepararon soluciones patrón de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ $1 \cdot 10^{-2}$ M; $7,8 \cdot 10^{-3}$ M; $5,5 \cdot 10^{-3}$ M; $3,3 \cdot 10^{-3}$ M y $1,1 \cdot 10^{-3}$ M. Éstas eluyeron a través de columnas de lechos fijos de matrices secas y húmedas a volumen constante de 1 mL de columna, con un flujo constante de 4.5 mL/min.

Los eluentes de cada columna se evaluaron espectrofotométricamente en un equipo Hitachi 1.900 a una longitud de onda $\lambda=631,5$ para determinar la eficiencia de captación de Cu^{+2} en la operación continua establecida.

Se observa mayor secuestro de cobre en columnas empaquetadas con perlas secas y a concentraciones más diluidas del complejo, siendo más eficientes las perlas secas con *cross-linking* de 15 minutos para una solución de $3,3 \cdot 10^{-3}$ M con un rendimiento del 34%.

Palabras clave: perlas de alginato, metales pesados, cobre



Introducción

Los metales pesados son elementos de alta prioridad sanitaria (Salomons, 1995). La explotación del cobre a nivel industrial es una actividad económica relevante debido a sus prestaciones como conductor de la electricidad y calor y su elevada resistencia a la corrosión. Por ello, el tratamiento de los efluentes que esta industria genera, resulta un desafío. En este trabajo se probó un método no convencional para la remoción de cobre de aguas residuales, dado que otros procesos presentan alto costo (Barakat, 2011; Odum, 2016). Se ha planteado la utilización de geles de alginato (Avendaño-Romero, López-Malo, & Palou, 2013) en forma de esferas, en presencia de Ca^{+2} (Grant, 1973), para la remoción de metales pesados de aguas por intercambio iónico, con bajas concentraciones de aquellos (Bajpai & Sharma, 2004; Ouwerx, Velings, Mestdagh, & Axelos, 1998). El planteo de su aplicación para la remoción de metales pesados es consistente debido a que hablamos de un polímero biodegradable, no tóxico y de bajo costo, por lo cual resulta idóneo para su aplicación con este propósito industrial.

Objetivos

- Evaluar la eficiencia de absorción de Cu^{+2} utilizando matrices esféricas de alginato caracterizado reológicamente.
- Realizar ensayos de remoción de Cu^{+2} en columnas, con relleno de matrices secas y húmedas, a volumen constante, con flujo continuo de solución de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$, a escala laboratorio.
- Comparar la performance de matrices secas y húmedas para distintas concentraciones de solución de Cu^{+2} .
- Observar la influencia del tiempo de *cross-linking* en el rendimiento de remoción de iones.

Materiales y Métodos

Se escogió al Ca^{+2} como catión divalente para la formación de la estructura polimérica descrita por el modelo de “caja de huevos” de (Grant, 1973) debido a que resulta adecuado para la formación de matrices esféricas estables (Bajpai & Sharma, 2004; Ouwerx et al., 1998) y al mismo tiempo los efluentes resultantes de la producción no serían una preocupación mayor. Se usó alginato de sodio 4% (p/v), el que fue previamente caracterizado en el Laboratorio de Física de Fluidos y Electrorreología de la Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología – UNT. Se



utilizó un Reómetro Anton Paar MCR 301, geometría PP25 (placas paralelas) con separación de 2,00 mm entre las placas con Software Rheo Plus para control automático y adquisición de datos. El alginato presentó comportamiento pseudoplástico. Su viscosidad a velocidades de deformación bajas ($< 0,2 \text{ s}^{-1}$) fue $\eta_0 = (56,3 \pm 0,3) \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y su viscosidad a la máxima velocidad de deformación evaluada (100 s^{-1}) de $5,01 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Presentó comportamiento tixotrópico, viscoelástico y comportamiento lineal con la frecuencia angular $1,0 \text{ rad/s} < \omega < 30 \text{ rad/s}$ (Barrionuevo et al., 2021). La preparación de las perlas se realizó a $\text{pH}=7$ debido a que según (Ebisike, Okoronkwo, & Alaneme, 2021) en soluciones fuertemente ácidas, la mayor parte de los sitios de unión del hidrogel de alginato, se encuentran protonados por la presencia de un exceso de iones H^+ . Para la producción de las matrices esféricas de alginato de calcio se procedió según el método de (Santagapita, Mazzobre, & del Pilar Buera, 2012) con algunas modificaciones. La solución de alginato de sodio se incorporó desde una altura constante, al reactor de 15 mL conteniendo CaCl_2 . Pasado el tiempo de *cross-linking*, que varió desde 15 minutos hasta 75 minutos, con intervalos de 15

minutos, se procedió a lavar las matrices 3 obtenidas y se almacenaron en un recipiente cerrado a baja temperatura. Las perlas (Santagapita et al., 2012) se deshidrataron en un secadero-balanza Brabender, de operación discontinua de flujo tangencial de aire a temperatura constante de 32°C durante 1 h 40 min. Se pesaron aproximadamente 10 g de esferas húmedas de cada tiempo de gelificación y se colocaron uniformemente distribuidas sobre bandejas metálicas, las que se rotaron 60° cada 10 minutos para asegurar la uniformidad de las perlas secas. Por otro lado, se prepararon soluciones patrón de Cu^{+2} a distintas concentraciones como complejo de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ que absorbe en el espectro visible. Se determinó el pico de absorbancia máxima a 631.5 nm por espectrofotometría en un equipo Hitachi 1900. Se obtuvo la curva patrón de absorbancia en función de la concentración de complejo de Cu^{+2} . El empaquetamiento de las columnas con lechos fijos de matrices secas y húmedas de alginato de calcio se realizó a volumen constante de esferas y para cada tiempo de gelificación diferente, el volumen total de lecho fijo empacado fue de 1 mL. Durante la operación se estableció un flujo constante de 4.5 mL/min de las soluciones del ión complejo a través de las columnas.

Las soluciones eluyentes de cada columna empacada con esferas fueron evaluadas espectrofotométricamente para la determinación de la eficiencia del proceso de captación de iones Cu^{+2} en la operación continua establecida, la cual fue calculada mediante la ecuación:

$$\% \text{Abs} = \frac{\text{Abso} - \text{Absf}}{\text{Abso}} \cdot 100$$

Donde:

%Abs: porcentaje de absorción o rendimiento.

Abso: Absorbancia a la entrada del lecho.

Absf: Absorbancia a la salida del lecho.

Resultados y discusión

Se determinaron los rendimientos de absorción de las esferas, tanto húmedas como secas. En la Tabla 1 se presentan los valores de rendimiento de absorción según la concentración de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ y con distinto tiempo de *cross-linking*.

Tabla 1. Rendimiento de absorción para igual concentración de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ y a distintos tiempos de gelificado.

Tiempo de <i>cross-linking</i>	$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$			
	$1 \cdot 10^{-2}$ M		$7,8 \cdot 10^{-3}$ M	
	PERLAS HUMEDAS	PERLAS SECAS	PERLAS HUMEDAS	PERLAS SECAS
	REND%	REND%	REND%	REND%
15	0.00	0.00	10.61	13.56
30	7.03	1.93	10.61	13.16
45	7.03	0.14	14.55	8.58
60	8.00	0.14	10.81	16.31
75	6.45	0.13	10.07	7.46

Tiempo de <i>cross-linking</i>	$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$					
	$5,5 \cdot 10^{-3}$ M		$3,3 \cdot 10^{-3}$ M		$1,10^{-3}$ M	
	PERLAS HUMEDAS	PERLAS SECAS	PERLAS HUMEDAS	PERLAS SECAS	PERLAS HUMEDAS	PERLAS SECAS
	REND%	REND%	REND%	REND%	REND%	REND%
15	16.81	19.42	18.58	33.99	4.55	14.77
30	11.88	19.71	17.39	15.81	25.00	18.18
45	5.22	19.42	17.00	20.16	1.14	25.00
60	10.43	12.17	21.74	20.55	10.23	29.55
75	9.57	15.94	16.60	18.18	21.59	17.05

Discusión

En la Tabla 1 se observa que la capacidad de absorción es mayor para soluciones más diluidas de Cu^{+2} , lo que está de acuerdo con lo informado por (Bajpai & Sharma, 2004). En general, las esferas secas presentan un mejor rendimiento respecto a las húmedas, lo que está acorde a (Lagoa & Rodrigues, 2009) Podemos inferir que existe una tendencia



de mayor rendimiento en perlas secas, a concentraciones diluidas [1.10^{-3} , 3.10^{-3}].

Conclusión

Para soluciones diluidas se observan buenos rendimientos en perlas secas, siendo las mejores aquellas de 15 minutos de tiempo de *cross-linking* con 33,99% de remoción de ion Cu^{+2} . Hasta el momento, no se encontró una tendencia en el comportamiento de las perlas húmedas, debido a que muestran resultados aleatorios. El tiempo de *cross-linking* es una variable que afecta el rendimiento de absorción del ion Cu^{+2} . Las perlas secas presentan menores probabilidades de contaminación por parte de microorganismos externos, esto conlleva una ventaja para su almacenamiento y transporte. Este último punto facilitaría la logística de su uso en plantas industriales. En los próximos ensayos se evaluará el rendimiento en el secuestro de Cu^{+2} , a masa constante de esferas empaquetadas en las columnas.

Financiamiento

SCAIT Proyecto CIUNT E648/1

Bibliografía

Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., & Palou, E. (2013). Propiedades del 5 alginato y aplicaciones en alimentos.

Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 7(1), 87-96.

Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), 129-140. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>

Barakat, M. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian journal of chemistry*, 4(4), 361-377.

Barrionuevo, M. d. V., Tolay, M. M., Mendez, F. C., Albornoz, A. C., Gómez, F. N., Rodríguez, A. I., . . . González, M. (2021). Secuestro de Cu^{2+} por matrices poliméricas de alginato: propiedades reológicas y estudio de eficacia. In *CLICAP 2022: Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas* / (pp. 667-671).

Ebisike, K., Okoronkwo, A. E., & Alaneme, K. K. (2021). Nickel sorption onto chitosansilica hybrid aerogel from aqueous solution. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 18(9), 9454 (9416 pages)-9454 (9416 pages).

Grant, G. T. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent



cations: the egg-box model. *Febs Lett.*, 32, 195-198.

Lagoa, R., & Rodrigues, J. R. (2009). Kinetic analysis of metal uptake by dry and gel alginate particles. *Biochemical engineering journal*, 46(3), 320-326.

Odum, H. T. (2016). *Heavy metals in the environment: using wetlands for their removal*: CRC Press.

Ouwerx, C., Velings, N., Mestdagh, M. M., & Axelos, M. A. V. (1998). Physicochemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*, 6(5), 393-408.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00035-5)

Salomons, W. (1995). Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal of Geochemical exploration*, 52(1-2), 5-23.

Santagapita, P. R., Mazzobre, M. F., & del Pilar Buera, M. (2012). Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. *Food Research International*, 47(2), 321-330.

Transformando la evaluación científica en las políticas de Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI) de América Latina y el Caribe: un estudio desde la altimetría



C.25. Ciencia, Tecnología e Innovación
Transformando la evaluación científica en las políticas de Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI) de América Latina y el Caribe: un estudio desde la altmetría

Autor: Peña Pallauta, Paulina; paulina.pena@upla.cl

Co-autor(es): Calisto Breiding, Camila; camila.calisto@upla.cl

Profesor/a Tutor/a: Arellano, Paulina; paulina.arellano@upla.cl

Universidad de Playa Ancha (UPLA)

Resumen

Se estudian los significados que la comunidad científica internacional atribuye a las *altmetrics* como instrumentos de evaluación científica para fundamentar Políticas de Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI) de Latinoamérica. Se aplica una metodología cualitativa (descriptiva) y se recoge la información mediante entrevistas semiestructuradas realizadas a investigadores de Chile, Argentina, Perú, Colombia, España y Estados Unidos (expertos en altmetría, métricas de información y/o políticas de información). Los resultados indican que las *altmetrics* fortalecen su valor analizándose junto a otros indicadores y que aportan datos de rápida acumulación y amplio alcance disciplinar; además, promueven el uso de nuevos canales de comunicación científica y entre los indicadores más provechosos destacan las menciones en políticas públicas, patentes de invención y en plataformas sociales como Facebook, Wikipedia y Mendeley. Se recomienda integrar criterios cuantitativos y cualitativos en las políticas latinoamericanas, que se ajusten a las realidades y presupuestos locales.

Palabras clave: altmetrics, política científica, evaluación científica

Introducción:

La ciencia y la tecnología desempeñan son importantes en el desarrollo económico, político y cultural de un país, lo que demanda el fortalecimiento de lineamientos que permiten el avance, sostenibilidad y efectividad de la investigación científica. En este contexto, las disciplinas métricas de información desarrollan indicadores cuya función es clave en la gestión de políticas científicas y tecnológicas, en los procesos de toma de decisiones estratégicas y, por

consiguiente, en la evaluación científica (Arencibia y de Moya, 2008), permitiendo analizar toda actividad relativa al I+D+i (Investigación, Desarrollo e Innovación), incluyendo la generación, difusión, transmisión, aplicación y evaluación de conocimientos científicos y tecnológicos (Mas-Bleda y Aguilo, 2015).

La producción científica a nivel mundial se comunica a través de revistas científicas cuya visibilidad depende de los índices en que se encuentran aceptadas, teniendo



ventaja aquellas publicaciones indexadas en bases de datos de corriente principal, como Web of Science (WoS) y Scopus. Ambas plataformas conforman un duopolio que concentra el conocimiento científico y los indicadores principales de medición de la productividad científica que se utilizan para evaluar la calidad e impacto de la ciencia. Por lo mismo, han sido objeto de críticas bajo que apuntan a los altos sesgos que poseen, al lento proceso de recogida de datos, a su carácter privativo (limitaciones de acceso), a la priorización de la productividad científica por sobre la calidad del contenido de la investigación (Nassi-Caló, 2017) y al uso incorrecto de éstos mismos debido a sus errores de juicio (Seglen, 1997).

Además, los indicadores basados en el recuento de citas se consideran limitados por su alcance disciplinar e idiomático, por el valor de las autocitas y por las tipologías de artículos científicos existentes. Mismo caso sucede con el factor de impacto y el índice h , dónde su cálculo variable anualmente posibilita la manipulación de datos para aumentar un valor que no es relacional a la calidad científica, sino que posibilita sólo una mayor visibilidad en su valor final, influencia y repercusión (Corrales-Reyes, Fornaris-Cedeño, Reyes-Pérez y Valdés-Gamboa, 2017).

Sus valores absolutos alcanzan pleno significado sólo en comparación con otros valores, ya que por sí solos no son un aporte real y el uso excesivo de estos indicadores genera poca cobertura disciplinar en los índices de citación, una variación anual de los factores de impacto de revistas y una baja indexación de otras que no se encuentran visibles en los índices internacionales, como es el caso de las ciencias sociales y las humanidades (Pérez-Angón, 2006). Vélez-Cuartas, Uribe-Tirado, Restrepo-Quintero, Ochoa-Gutiérrez, Pallares, Gómez-Molina, Suárez-Tamayo y Calle (2019) agregan que el problema de los indicadores de evaluación científica no está asociado al grado de objetividad del resultado métrico, sino que recae en el procedimiento para determinar jerarquías y prestigios dentro de éstos instrumentos en función de la visibilidad científica. Advierten también que esta situación permea a los mecanismos de valoración del conocimiento, ya que la producción científica más válida no está basada en criterios de evaluación de la calidad del trabajo presentado, sino en indicadores condicionados por la cantidad de citas, la visibilidad y la cuantificación. Por lo tanto, la pertinencia, viabilidad e importancia de los resultados científicos deben cumplir con una función social, no limitándose a la difusión de sus productos



en revistas y publicaciones especializadas, sino que deben ser masificados y conocidos por otros profesionales a través de distintos medios de difusión (Ortiz, 2015).

En respuesta a estas discusiones, surge el Manifiesto de Leiden (2004) y la Declaración de San Francisco DORA (2012), documentos que entregan directrices para el uso transparente y abierto de los indicadores de evaluación científica y que promueven el uso de métricas alternativas o *altmetrics*, las cuales permiten analizar el impacto y la visibilidad de la actividad científica en la web social (Priem & Hemminger, 2010; De Volder, 2016).

Altmetrics y evaluación científica

Priem y Hemminger (2010) vinculan las herramientas de la web social con las disciplinas métricas de información y proponen en primera instancia el término *Scientometrics 2.0*, para denominar lo que se conoce hoy como *altmetrics*. Gouveia (2013) define a la altmetría como el uso de datos webométricos y cibernéricos en estudios cuantitativos, estableciendo una relación entre dichas áreas, tal como lo estipulan Priem, Groth & Taraborelli (2012), quienes aseguran que la altmetría puede considerarse un subconjunto de la

cienciometría y la webmetría, ya que ambas se centran en medir el impacto científico y académico utilizando insumos del entorno digital. Rousseau y Ye (2013), critican el término y proponen reemplazarlo por *influmetría*, ya que es una disciplina capaz de rastrear la influencia académica y científica para medirla y evaluarla en nuevos ambientes.

En resumen, las *altmetrics* vinculan la publicación, difusión y validación de la investigación científica en medios sociales y tecnológicos (Goncalves Do Nascimento y Oddone, 2016), ya que buscan estudiar y medir el impacto académico, basándose en la actividad que genera la ciencia en entornos en línea (Priem, Groth y Taraborelli, 2012). Alperin (2015) agrega que este tipo de métricas son una extensión de lo tradicional, cuyo propósito es detectar el impacto de los resultados de una investigación fuera de la academia, caracterizando, por ejemplo, el impacto de un trabajo influyente pero no citado y el impacto de fuentes que no han sido revisadas por pares. Según Barros (2015), las *altmetrics* buscan así conocer las características de la comunicación científica, a través de los datos de la web (volumen de tweets, me gusta, favoritos, comentarios en blogs, noticias, menciones en políticas y en redes sociales



académicas, etc.) y herramientas web (redes sociales, sistemas de marcadores sociales y gestores de referencias bibliográficas). Por tanto, la comunicación científica se configura entonces como el área principal de las *altmetrics* (Haustein, Bowman y Costas, 2015), ya que son métricas que capturan una noción de impacto más matizada en torno a productos académicos que se leen, discuten, guardan, recomiendan y citan, entre audiencias no limitantes a la academia (Piwowar, 2013).

Desde una óptica más taxonómica, Lin y Fenner (2013) clasifican las *altmetrics* en cinco categorías de acuerdo al grado de interés que presentan los usuarios: número de consultas (artículos científicos); número de descargas de artículos científicos en marcadores sociales (como CiteUlike) y en gestores de referencias bibliográficas (como Mendeley); número de comentarios en redes sociales (páginas web de revistas, blogs de contenidos científicos, Twitter, Facebook, etc.); número de recomendaciones en bases de datos (como Faculty of 1000); y citas en nuevos documentos (reflejan el impacto de un artículo en la comunidad científica). Sin embargo, Aguilló (2016), basándose en la naturaleza variable de las *altmetrics*, sus alcances y la importancia de la labor

investigativa para promover sus trabajos en la web, advierte que los índices compuestos (Researchgate score y Altmetric donut) y las variables de autopromoción (número de ítems publicados por autores: tweets, presentaciones, documentos indexados) deben ser descartados a favor de las métricas relacionadas con el impacto: lectores, citas en Researchgate, descargas, retweets y menciones.

Cabe mencionar que el desarrollo de las *altmetrics* no ha estado exento de críticas en torno a las ventajas y desventajas que presentan desde puntos de vista conceptuales y prácticos. Respecto a las ventajas, Priem y Hemminger (2010), Moreno (2016) y Borrego (2014) coinciden en que la velocidad de acumulación para evaluar la producción científica es una gran fortaleza, ya que éstas se acumulan inclusive en días o semanas, en lugar de los años que requieren las citas, lo que resulta útil para la comprensión de las audiencias, del aumento del ritmo investigativo, de la comunicación científica y del impacto (Gómez, 2007), que no solo proporciona un carácter científico, sino también uno social, en la medida en que ésta tenga una amplia repercusión en los nuevos medios sociales digitales (Alonso-Arévalo, 2016). También miden otros



productos de investigación como libros, presentaciones, capítulos y páginas web, lo que significa un campo de gran alcance en cuanto a la evaluación del impacto de la investigación en cualquier formato.

En cuanto a las desventajas, Melo y Lopes (2017) argumentan que plantear la altmetría como una alternativa es una estrategia incorrecta, ya que minimiza las contribuciones de ambas y niega sus desarrollos, por lo que una visión holística sería más efectiva para sus avances. Misma postura es reforzada por Donato (2014), quien estima que las *altmetrics* pueden ayudar a complementar brechas que no están dentro del alcance de los indicadores tradicionales, pero que no tiene sentido reemplazarlos por indicadores alternativos debido a su funcionalidad.

Por consiguiente, el significado conceptual y práctico de las *altmetrics* se relaciona mayormente con la complementariedad que éstas poseen al vincularse con los indicadores tradicionales de evaluación científica. Sin embargo, la relación con las disciplinas métricas de información es aún un debate crítico, ya que si bien poseen similitudes en principios disciplinares, contemplan diferencias en las herramientas utilizadas para la recolección y análisis de datos, la metodología de

trabajo, las tipologías de usuarios, los objetivos conceptuales y el impacto.

A pesar de esto, es nula la relación entre políticas de evaluación científica e indicadores alternativos de información, ya que las políticas en materia científica y tecnológica se encuentran mayormente relacionadas con los indicadores tradicionales de evaluación científica, lo que supone una deuda teórica y conceptual.

Políticas de evaluación científica

La ciencia, tecnología e innovación (CTI) se han constituido como motores de crecimiento y desarrollo, y a su vez, en pilares para un progreso social inclusivo y sostenible (Comisión Económica para América Latina y el Caribe - CEPAL, 2010). Lo anterior, supone un desafío para las instituciones, asociaciones científicas, para los investigadores y para el rol que cumplen las políticas públicas para hacer de estos objetivos una meta estratégica alcanzable a largo plazo, por medio de instrumentos como las políticas de ciencia, tecnología e innovación (Smith, Voss & Grin, 2010)

Las políticas de CTI son aquellas medidas y decisiones gubernamentales que fundamentan el desarrollo de la



investigación científica y tecnológica, destinando productos en beneficio de objetivos que emergen desde entornos políticos (Shapin, 1979). Esta conceptualización ha evolucionado, originando nuevos sistemas de políticas públicas que se complejizan, agregando distintos niveles de praxis (local, regional, nacional, global), relacionadas con la comprensión de qué y cómo la ciencia, la tecnología y la innovación conducen hacia un desarrollo sostenible e inclusivo (Bortagaray, 2016). Esto resulta difícil de resolver, considerando los aspectos sociales, políticos, institucionales, económicos y ambientales de cada lugar y de la presión que existe por forjar sistemas científicos, tecnológicos e innovativos que sean sostenibles para todas las sociedades (United Nations, 2012).

La vinculación entre las políticas de CTI y otras políticas económicas y sociales es un factor clave, ya que comprende toda acción gubernamental encaminada hacia los beneficiarios (consumidores, investigadores, empresas y otros actores del sector productivo y social) para influir en sus acciones y así establecer condiciones para crear, desarrollar y transferir conocimiento científico, tecnología e innovación a bajos costos y con amplios resultados en desempeño y

beneficios (Dutrénit, 2019). El rol gubernamental es relevante, pero la creación democrática de políticas de tecnociencia requiere participación de actores sociales (Kreimer y Zabala, 2006), como autoridades políticas y científicas, universidades, empresas e industrias, instituciones sin fines de lucro y la sociedad civil, favoreciendo el diálogo entre ciencia y sociedad y estrechando la relación entre el Estado y las demandas sociales (Viales, 2016).

Un fragmento dentro de las políticas de CTI es la evaluación científica, pues es preciso medir los nuevos conocimientos generados y sus resultados. López Yepes (2004), asegura que la evaluación de la ciencia implica la valoración de los autores, sus nuevas ideas, la difusión y principalmente el impacto de estas ideas, así como el valor de sus publicaciones, repercutiendo en el valor de la política científica de un país. No obstante, es un proceso complejo ya que la tarea científica está sometida a factores como el financiamiento, la existencia de medios materiales y humanos, las relaciones entre política y ciencia e incluso las relaciones entre los propios científicos e instituciones de investigación. La evaluación científica también es un instrumento tecnológico que contribuye directamente a la eficacia y eficiencia de



los sistemas de I+D+i, al disponer de una coherencia y visión estratégica en la toma de decisiones, sistemas de dirección y gestión de la investigación (Arencibia y de Moya, 2008).

Las políticas de evaluación científica vigentes han constituido nuevos aportes en las ciencias de la información desde sus herramientas métricas, las cuales han contribuido en la gestión de las políticas científicas y tecnológicas y en la creación de instrumentos de evaluación para el crecimiento de la producción científica. Este nuevo contexto dio paso a que en América Latina se proyectara la necesidad de originar nuevas herramientas de acceso, visibilidad e impacto científico y social de la investigación, bajo el modelo del Acceso Abierto (AA) impulsando la creación de plataformas digitales (Latindex, SciELO, Redalyc, AmeliCA), para indexar producción científica regional y también instancias de debate como el Foro Latinoamericano sobre Evaluación Científica (FOLEC), para difundir el conocimiento público del Sur Global (Aguado, Becerril y Brito, 2014).

Latinoamérica apuesta por el acceso abierto y el fortalecimiento de una red de difusión y visibilidad científica, iniciativas que requieren un marco de trabajo que

oriente a los gobiernos de cada país y a todos los actores vinculados en la creación de políticas, respecto a los nuevos mecanismos e indicadores métricos utilizados para realizar una evaluación científica integral y fuera de la lógica puramente académica. Tomando como base la importancia que tiene la participación de la sociedad en el proceso de creación de políticas científicas, la presente investigación tiene como objetivo conocer los significados que atribuye la comunidad científica a las *altmetrics* como instrumentos de evaluación científica dentro de una política regional. Son los mismos investigadores y expertos quienes caracterizarán las *altmetrics* como instrumentos de evaluación de la calidad científica dentro de una política de CTI, propondrán mecanismos de mejoramiento a las métricas alternativas y determinarán cuáles son los indicadores más adecuados para formar una política de CTI.

Objetivos

Objetivo General:

Conocer los significados que atribuye la comunidad de investigadores a las *Altmetrics* como instrumentos de **evaluación científica** dentro de una política de CTI.

Objetivos Específicos:

Identificar los significados que atribuye la comunidad de investigadores a las Altmetrics como instrumentos de evaluación de la **calidad científica** dentro de una política de CTI.

Identificar las propuestas de mejoramiento que la comunidad de investigadores realiza a las Altmetrics como instrumentos de evaluación de la calidad científica dentro de una política de CTI.

Determinar los indicadores alométricos que la comunidad de investigadores considera más adecuados como instrumentos de evaluación científica dentro de una política de CTI.

Materiales y métodos:

Se realiza un estudio cualitativo de tipo descriptivo que consta de tres fases: primero el proceso de recolección de datos a través de entrevistas semiestructuradas, cuyo alcance y flexibilidad aporta vasta información. Se elaboraron guiones de preguntas en base a los objetivos de investigación y se determinó la muestra, que — en función de recoger una visión global del tema — está compuesta por expertos de Chile, Argentina, Perú, Colombia, España y Estados Unidos. Todos fueron seleccionados bajo tres criterios de inclusión vinculados a su

experiencia calificada: ser profesionales del área de las Ciencias de la Información, poseer formación de postgrado (máster o doctorado) y contar con una o más publicaciones científicas sobre estudios métricos de información, *altmetrics*, o políticas de información.

En virtud de estos criterios de inclusión, la muestra quedó conformada por:

1) Cuatro expertos en *altmetrics* con formación académica de postgrado (máster o doctorado) y producción científica en el área.

2) Dos expertos en estudios métricos de información con formación académica de postgrado (máster o doctorado) y producción científica en el área.

3) Un experto en políticas de información, con formación académica de postgrado (máster o doctorado) y producción científica en el área.

Se utilizaron las siglas E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 para resguardar la identidad de los investigadores y sus contribuciones al objeto de estudio.

En una segunda fase, se estableció comunicación con cada informante a través



de correo electrónico, informando el propósito, los objetivos y alcances del estudio. Se realizaron las entrevistas durante los meses de agosto y septiembre del año 2020 mediante la plataforma de videollamada Google Meet y fueron transcritas durante el mes de octubre del mismo año. Asimismo, la información transcrita fue enviada a cada informante vía correo electrónico, junto a un consentimiento informado para transparentar la veracidad de los datos, sus usos y la rigurosidad investigativa.

Finalmente, se establecieron categorías para estructurar el análisis de contenido cualitativo y dar respuesta a los objetivos de investigación.

Resultados y discusión:

Los resultados de investigación responden al objetivo principal de investigación y exponen los significados que la comunidad de investigadores atribuye a las *altmetrics* como instrumentos de evaluación científica dentro de una política de CTI. Se puntualizan a continuación, las oportunidades, contribuciones, limitaciones y direcciones futuras de las *altmetrics* y su vínculo con los cambios que necesitan las políticas en la región.

Altmetrics como elemento de evaluación en una política de CTI.

Aunque el concepto de calidad científica es subjetivo y complejo de definir, los informantes plantean una aproximación al mismo a través del uso conjunto de métricas tradicionales, de vinculación con el entorno (Observatorio Iberoamericano de la Ciencia, la Tecnología y la Sociedad de la OEI (OCTS) y Red Iberoamericana de Indicadores de Ciencia y Tecnología (RICYT), 2017), de *altmetrics* y de la evaluación por pares.

Las *altmetrics* al interpretarse junto a otros indicadores, adquieren utilidad y permiten medir la visibilidad de los resultados de investigación en entornos web desde una óptica más abierta y social del comportamiento de la ciencia. No obstante, esto no garantiza una calidad completa de la investigación, ya que varían los contextos de aplicación, las interpretaciones y por tanto, el alcance del término. Los entrevistados coinciden en que la calidad de la investigación se relaciona con la validación científica del estudio, con la correcta aplicación del método científico para lograr hallazgos relevantes y también con la influencia que los resultados investigativos tienen en las comunidades académicas y no académicas. Las *altmetrics* al igual que el



resto de los indicadores no son suficientes en sí mismas ni responden de forma autónoma al propósito de medir la calidad científica, pero sí aportan indicadores de influencia y popularidad para determinar el impacto social en comunidades determinadas.

Para medir con mayor objetividad la calidad se requiere un análisis cualitativo de la ciencia, proceso que demanda tiempo para los países. Uno de los informantes menciona el caso australiano, país que posee un riguroso sistema de evaluación del impacto de la investigación: cada 3 años, un panel de expertos recopila, revisa y evalúa los resultados de investigación (artículos, capítulos de libros, etc.) y luego informa el veredicto a una administración nacional de investigación. Esto demuestra que es responsabilidad de cada país integrar estándares en sus políticas para visibilizar su producción científica.

Por lo mismo, surgen otros tipos de impacto potenciados por los nuevos contextos digitales y por las *altmetrics*, cuyo impacto social y alternativo trasciende los métodos tradicionales de la evaluación científica, generando la difusión de resultados de investigación a través de medios sociales, el análisis de otras tipologías documentales que no se remiten

únicamente al artículo científico, la incorporación de datos para visibilizar disciplinas sociales y políticas públicas, y nuevas vías de comunicación científica entre los investigadores y las universidades para posicionar su producción científica.

Finalmente, los informantes declaran que la comunicación de la ciencia se lleva a cabo a través de distintos canales; si bien predominan las transnacionales del conocimiento como Web of Science y Scopus, en Latinoamérica han proliferado las bases de datos Open Access. Respecto a los indicadores bibliométricos, declaran que estos afectan negativamente la comunicación entre pares, ya que centra el foco en las citas (quiénes, cómo y cuánto es citado cada investigador), proceso que se da en un contexto endogámico de la comunicación científica. En este sentido, las *altmetrics* configuran una apertura social de las dinámicas de comunicación de la ciencia.

Incorporación de las *altmetrics* como elemento de evaluación científica en una política de CTI: influencia, mejoras y recomendaciones

A nivel mundial, los informantes no conocen casos de aplicación, pero indican que cada vez se incorporan con mayor frecuencia estos indicadores en sus



estudios métricos. El entrevistado 4 (E4), afirma que el valor de las *altmetrics* en la elaboración de políticas públicas es vital, ya que uno de los objetivos de la ciencia es impactar – incluso comunicacionalmente – en la sociedad. Además, señala que las *altmetrics* son capaces de medir cómo se incorporan o referencian las investigaciones en documentos públicos, por lo que si la política pública no se preocupa de esto, sería casi contradictorio. Además, manifiesta que las redes sociales son el principal canal de consumo informativo de todas las personas y si los artículos no llegan donde la comunidad está consumiendo contenido, entonces se están perdiendo lectores. Sin embargo, para incorporar indicadores *altmétricos* como elementos de evaluación científica, es preciso clarificar sus funcionalidades y limitaciones, pero también priorizar sus metodologías por encima de la comercialización de las empresas proveedoras.

Con base en lo anterior, los procesos evaluativos, integrales y transparentes de la ciencia deben estar condicionados por las siguientes directrices:

Integración de indicadores disciplinares y participación universitaria

Un método de evaluación científica integral debe incorporar indicadores bibliométricos,

altmétricos y de vinculación con el entorno, ya que cada grupo posee funcionalidades para cada contexto; además, se debe fomentar el análisis y desarrollo de publicaciones asociadas a toda disciplina científica (especialmente las humanidades y ciencias sociales) y promover una mayor injerencia de las universidades en los procesos de toma de decisiones a nivel científico, ya que la investigación y conocimiento que se gesta a nivel universitario repercute en la producción científica nacional.

Fortalecimiento del proceso editorial

Los entrevistados declaran la necesidad de enriquecer este proceso a través del mejoramiento cualitativo de la revisión por pares como herramienta de evaluación científica. Proponen el fortalecimiento de la labor de los editores (mediante la adquisición de un mayor posicionamiento dentro del proceso evaluativo) y la reestructuración del enfoque cerrado hacia uno de carácter abierto, donde los investigadores puedan difundir sus avances de investigación para que profesionales de competencias similares aprueben o desaprueren los mismos y así, contribuir a una evaluación participativa y de aprendizaje colectivo.



Potenciación cualitativa de la labor investigadora

Actualmente, los investigadores se rigen por un impacto en común asociado al posicionamiento científico-jerárquico por medio de las mediciones cuantitativas de la ciencia, por lo que para establecer un proceso científico integral, es preciso considerar las ópticas cualitativas para ampliar los distintos tipos de impacto que se generan en la investigación. Para ello se deben evaluar todos los productos y actividades científicas, tecnológicas y de vinculación con el medio del investigador; productos y actividades realizadas dentro y fuera de la academia que reflejen la participación social en los procesos investigativos.

Fomento de la investigación a nivel local

La apertura de la ciencia debe convertirse en el eje central de la producción científica, principalmente a nivel latinoamericano, fortaleciendo iniciativas de Ciencia Abierta propuestas por el Consejo Latinoamericano de Ciencias Sociales (CLACSO), como FOLEC y AmeliCA, que visibilizan disciplinas tradicionalmente en desventaja. La inclusión de nuevas fuentes informativas como Google Scholar, Redalyc, Scielo, Microsoft Academic y de nuevas métricas como las *altmetrics*, permiten ampliar la cobertura de la ciencia

a nivel de trayectorias académicas, la producción científica y el alcance de los resultados de investigación en la región.

En Latinoamérica, la injerencia de organismos internacionales en la estructuración de las políticas científicas sigue siendo un obstáculo para alcanzar las propuestas planteadas; los *ránkings* de Web of Science y Scopus interfieren en la validación de la producción científica local y la solución no se limita al empleo de las *altmetrics* o de los indicadores en general, sino que apunta a establecer consensos que a nivel regional velen por el desarrollo de políticas de CTI que originen un modelo de evaluación científica adecuado y transparente a la realidad local, que respete las diferencias disciplinares y no busque comparar a la región con otras más desarrolladas, donde los presupuestos, problemáticas y realidades no son iguales.

Incorporación de las redes sociales

Los medios sociales son entornos de difusión de la ciencia y conceden a las *altmetrics* un espacio de comunicación y evaluación social. Los procesos evaluativos de la ciencia deben contemplar que la funcionalidad de las redes sociales fomenta un nuevo paradigma de comunicación y divulgación científica, permitiendo un mayor dinamismo,



consumo y generación de información y conocimiento.

Idoneidad de las *altmetrics* como elemento de evaluación en una política de CTI.

La comunidad investigadora destaca que las principales desventajas de las *altmetrics* son similares a las de los indicadores bibliométricos, ya que miden mayormente el alcance de la documentación científica por sobre otros productos que se generan desde las ciencias sociales y las humanidades, y que tienen un impacto en el entorno que no se ha logrado medir. Esto se vincula al uso del DOI (Digital Object Identifier), ya que los proveedores de servicios *altmétricos* lo utilizan para captar datos desde los artículos científicos generando sesgos en dos aspectos: el rastreo de otras tipologías documentales, priorizando al artículo científico dentro de un conjunto amplio de publicaciones y no respalda una representatividad general en todas las publicaciones generadas en regiones invisibilizadas como América Latina; y segundo, el costo asociado a su implementación, ya que adquirirlo significa una inversión económica.

En otra dirección, se establece que los datos *altmétricos* pueden ser manipulados desde las interfaces de los medios

sociales, pudiendo alterar sus datos finales. Sin embargo, es una labor compleja de realizar, debido al trabajo algorítmico y técnico que se requiere. A pesar que no existen indicadores *altmétricos* completamente precisos y confiables y que aún no existe una aceptación generalizada de su uso científico dentro de la comunidad (Torres-Salinas y Cabezas-Clavijo, 2013), las *altmetrics* pueden ser incorporadas en los procesos evaluativos de la ciencia, ya que permiten identificar cómo los resultados de investigación se comunican a través del entorno web y cómo la sociedad se vincula con ellos.

A continuación se especificarán los indicadores *altmétricos* mejor calificados por los expertos, para determinar la visibilidad de la investigación latinoamericana, considerando el nivel de impacto que poseen en medios sociales y su injerencia en otros públicos:

- Cantidad de lectores de Mendeley: plataforma que es capaz de influenciar el interés, lectura y descarga de los documentos, generando mayor impacto de uso y visibilidad.
- Cantidad de me gusta, difusiones y comentarios en Facebook: Es la red social de mayor impacto en



Latinoamérica. Es utilizada para compartir investigación, por lo que se configura como una buena fuente de datos en la región.

- Cantidad de citas de Wikipedia: una cita en esta enciclopedia virtual posee mayor impacto científico y social que un artículo de una revista indexada.
- Cantidad de menciones de Twitter: la fortaleza de esta plataforma es la posibilidad de identificar al público interesado en cada estudio.
- Menciones en políticas públicas: reflejan la utilidad e influencia directa de la ciencia en los programas gubernamentales, por lo que debe integrarse como indicador relevante en las políticas de evaluación científica.
- Menciones en patentes: Una cita de una patente indica que el documento citado puede tener algún valor comercial. Las bases de datos de patentes podrían utilizarse para el seguimiento de la investigación y no sólo para rastrear la evidencia del valor comercial de la investigación y la influencia de la ciencia en las tecnologías e innovaciones emergentes, sino también para medir la efectividad de la inversión que se está

haciendo en investigación (Thelwall, 2015).

Si bien se han utilizado numerosos indicadores para determinar el impacto económico, ningún indicador se ha adaptado ampliamente (Shaikh y Alhoori, 2019). Se requiere entonces, revisar los avances existentes respecto a los indicadores de patentes, sin dejar de considerar los obstáculos propios de estos documentos; si bien son registros de fácil y libre acceso, su recuperación es compleja debido a los grandes volúmenes de información que se deben navegar y el aumento de la competencia empresarial (Thelwall y Kousha 2015).

Conclusiones:

Las *altmetrics* como nuevas métricas de carácter social y científico deben ser consideradas como parte de un constructo métrico integral que sustente los procesos evaluativos de la ciencia, ajustándose a los lineamientos de una política científica regional e internacional de carácter holístico y transparente. Para determinar calidad científica, se requiere la integración de múltiples indicadores incluyendo la revisión por pares, la evaluación de todos los productos de la investigación y la detección del impacto social o científico.



Las métricas de la información deben integrar una óptica más social e inclusiva de la ciencia, re estructurando la comunicación científica en los entornos web. Desde esta perspectiva, las *altmetrics* favorecen los procesos evaluativos a través de la medición complementaria de distintos tipos de impacto que se alinean a los objetivos sociales y democráticos de la ciencia.

Cabe mencionar que, en los últimos veinte años, ha surgido interés por explorar la web y generar nuevos indicadores de impacto tecnológico desde la webmetría y la altmetría, propuestas que se basan en las citas de patentes como indicadores de relaciones recíprocas entre ciencia y tecnología. Aunque la información científica busca la divulgación de resultados y la información tecnológica procura secreto, el sigilo y las restricciones (Costa, Matias & Schwarz, 2017), son fuentes compatibles al momento del análisis de datos y permiten establecer un estado de la técnica global para elaborar una política de CTI.

A nivel regional, si bien las iniciativas latinoamericanas se inclinan hacia el fomento del acceso abierto de la labor investigadora, de la diversificación de las fuentes de información y de la gestión

transparente de los resultados de investigación, aún el panorama científico se estructura bajo una mirada internacional y comercial del conocimiento, que define principios universales para validación de la ciencia. Esto limita a los países latinoamericanos para el desarrollo e implementación de propuestas más democráticas y abiertas, alineadas con la finalidad de las políticas de CTI en relación a la evaluación científica.

En consecuencia, surge el desafío de establecer, regularizar e incluir estos procesos en las políticas desde el predominio de lo digital, a través de propuestas sustentadas en la difusión y transparencia de la producción científica, promoción de la labor investigadora, de la consolidación de los procesos evaluativos de la ciencia a través del fortalecimiento de la labor editorial y de la unificación de las métricas tradicionales, las métricas de vinculación y las *altmetrics* como foco de discusión científica. Para lograrlo, es importante considerar el trabajo y las iniciativas latinoamericanas e iberoamericanas como FOLEC, AmeliCA y la Red de Indicadores de Ciencia y Tecnología (RICYT), que aportan aproximaciones teóricas y prácticas sobre el contexto científico regional.



Respecto a las *altmetrics*, cabe destacar que al estar amparadas en la generación de datos, información y conocimiento en la web, adquieren un mayor protagonismo en el contexto digital e influyen en las políticas públicas. A partir de esto, se recomienda que la integración de las *altmetrics* en el ciclo de vida de una política de CTI se realice desde un Plan de Acción sobre la evaluación de la ciencia, que desarrolle programas y proyectos que establezcan durante un período de tiempo determinado, metas, objetivos y actividades amparadas en las capacidades institucionales de la evaluación científica. Solo así, los instrumentos de evaluación permitirán un crecimiento de la producción científica en concordancia con la política, y mejorará la visibilidad y posicionamiento de la región.

Referencias:

Aguado, Eduardo; Becerril, Arianna; Brito, Luis. (2014). *Indicadores alternativos para el análisis cuantitativo de la actividad científica y tecnológica a partir de Redalyc.org: el caso de México*. http://www.foroconsultivo.org.mx/libros_editados/taller_sobre_indicadores_en_ciencia_y_tecnologia_en_latinoamerica.pdf

Aguilló, Isidro. (2016). *Informetría para Bibliotecarios: Descripción de su papel clave en los procesos de evaluación*. *El*

profesional de la información, 25(1), 5-10.
<https://doi.org/10.3145/epi.2016.ene.01>

Alonso-Arévalo, Julio. (2016). *Altmetrics pueden no seguir siendo alternativa por mucho tiempo*. *ORL*, 7(3), 169-177.
<http://dx.doi.org/10.14201/orl201673.14190>

Alperin, Juan Pablo. (2015). *The Public Impact of Latin America's Approach to Open Access* (Tesis de Doctorado). Stanford University, Estados Unidos.
<https://stacks.stanford.edu/file/druid:jr256tk1194/AlperinDissertationFinalPublicImpact-augmented.pdf>

Arencibia, Ricardo y De Moya, Felix. (2008). *La evaluación de la investigación científica: una aproximación teórica desde la cuantificación*. *ACIMED*, 17(4).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352008000400004

Barros, Moreno. (2015). *Altmetrics: métricas alternativas de impacto científico com base em redes sociais*. *Perspectivas em Ciência da Informação*, 20(2).
<https://doi.org/10.1590/1981-5344/1782>

Borrego, Ángel. (2014). *Altmétricas para la evaluación de la investigación y el análisis de necesidades de información*. *El*



profesional de la información, 23(4), 352-357. <https://doi.org/10.3145/epi.2014.jul.02>

Bortagaray, Isabel. (2016). *Políticas de Ciencia, Tecnología, e Innovación Sustentable e Inclusiva en América Latina. París, Francia; Montevideo, Uruguay: UNESCO.*
<http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Montevideo/pdf/PolicyPapersCILAC-InnovacionEmpresarial.pdf>

Comisión Económica para América Latina y el Caribe - CEPAL. (2010). *Innovar para crecer. Desafíos y oportunidades para el desarrollo sostenible e inclusivo en Iberoamérica. Santiago, Chile.*
<https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/21494/lcq2443.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Corrales-Reyes, Ibraín; Fornaris-Cedeño, Yasmnay; Reyes-Pérez, Juan; Valdés-Gamboa, Leonardo. (2017). Aproximación cuantitativa a la producción científica de Medisur. *Medisur*, 15(5), 640-646.
<http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3554/2409>

Costa, Heloisa; Matias, Márcio; Schwarz, Rosângela. (2017). Institutos Nacionales de Ciencia y Tecnología del área de Ciencias Agrarias: estudio de la publicación

científica, técnica y tecnológica (2013-2015). *Biblios: Journal of Librarianship and Information Science*, 0(68), 1-20.
<https://doi.org/10.5195/biblios.2017.390>

De Volder, Carolina. (2016). Métricas alternativas: ¿Una nueva forma de medir el impacto científico?. *Épocas.*
<http://revistaepocas.com.ar/metricas-alternativas-una-nueva-forma-de-medir-el-impacto-cientifico/>

Donato, Helena. (2014). Traditional and alternative metrics: the full story of impact. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 20(1), 1-2.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rppneu.2013.11.001>

Dutrénit, Gabriela. (2019). La construcción de políticas públicas en ciencia, tecnología e innovación. *Ciencia*, 70(2), 48-57.
https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/imagenes/revista/70_2/PDF/09_70_2_1173_RepositorioPolíticasPublicas.pdf

Gómez, Isabel. (2007). The Hand of Science. Academic writing and its rewards. *Revista Española de Documentación Científica*, 30(1), 127-129.
<http://redc.revistas.csic.es/index.php/redc/article/view/373/378>



Gonçalves Do Nascimento, Andrea y Oddone, Nanci. (2016). *Métricas alternativas para a avaliação da produção científica: a altmetria e seu uso pelos bibliotecários*. Paper presentado en el XVII Encontro Nacional de Pesquisa em Ciência da Informação, Río de Janeiro.

Gouveia, Fabio. (2013). Altmtria: métricas de produção científica para além das citações. *Liinc em Revista*, 9(1), 214-227. <https://doi.org/10.18617/liinc.v9i1.569>

Haustein, Stefanie; Bowman, Timothy; Costas, Rodrigo. (2015). Interpreting "altmetrics": viewing acts on social media through the lens of citation and social theories. 1-24. <https://arxiv.org/pdf/1502.05701.pdf>

Kreimer, Pablo. y Zabala, Juan. (2006). ¿Qué conocimiento y para quién? Problemas sociales, producción y uso social de conocimientos científicos sobre la enfermedad de Chagas en Argentina. *Redes*, 12(23), 49-78. <https://ridaa.unq.edu.ar/bitstream/handle/20.500.11807/612/02R2006v12n23.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Lin, Jennifer y Fenner, Martin. (2013). Altmetrics in Evolution: Defining and Redefining the Ontology of Article-Level Metrics. *Information Standards Quarterly*,

25(2),

26. https://www.niso.org/sites/default/files/stories/2017-08/IP_Lin_Fenner_PLOS_altmetrics_isqv25no2.pdf

Lopez Yepes, José. (2004). Características de la Documentación y su reflejo en la formación de los profesionales e investigadores de la disciplina. *Actas do Congresso Nacional de Bibliotecários, Arquivistas e Documentalistas*, (8). <https://www.bad.pt/publicacoes/index.php/congressosbad/article/view/676>

Nassi-Caló, Lilian. (2017). Evaluation metrics in science: current status and prospects. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 25. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.0000.2865>

Mas-Bleda, Amalia y Aguillo, Isidro. (2017). *La web social como nuevo medio de comunicación y evaluación científica*. Editorial UOC. http://reader.digitalbooks.pro/book/preview/41040/WebSocial_EPUB-2?1597170304401

Melo, João y Lopes, Dalton. (2017). Altmtria: complexidades, desafios e novas formas de mensuração e compreensão da comunicação científica na web social.



Biblios, (68), 49-68.

<https://doi.org/10.5195/biblios.2017.358>

Moreno, Francisco. (2016). Contradicción y crisis en el capitalismo cognitivo. *Chasqui. Revista Latinoamericana de Comunicación*, (133), 101-11.

<https://revistachasqui.org/index.php/chasqui/article/view/3001/2824>

<https://revistachasqui.org/index.php/chasqui/article/view/3001/2824>

Observatorio Iberoamericano de la Ciencia, la Tecnología y la Sociedad de la OEI (OCTS) y Red Iberoamericana de Indicadores de Ciencia y Tecnología (RICYT). (2017). *Manual Iberoamericano de Indicadores de Vinculación de la Universidad con el Entorno Socioeconómico*. http://www.rieyt.org/wp-content/uploads/2017/06/files_manual_vinculacion.pdf

Ortiz, Emilio. (2015). La evaluación del impacto científico en las investigaciones educativas a través de un estudio de caso. *Revista Electrónica de Investigación Educativa*, 17(2), 89-100.

<http://redie.uabc.mx/vol17no2/contenido-ortizt.html>

<http://redie.uabc.mx/vol17no2/contenido-ortizt.html>

Pérez-Angón, Miguel. (2006). Usos y abusos de la ciencia métrica. *Cinvestav*, 29-33. <https://studylib.es/doc/7261998/usos-y-abusos-de-la-cienciometria>

<https://studylib.es/doc/7261998/usos-y-abusos-de-la-cienciometria>

Piwowar, Heather. (2013). Bulletin of the Association for Information Science and Technology. *Bulletin of the Association for Information Science and Technology*, 39(4), 8-9.

<https://doi.org/10.1002/bult.2013.1720390404>

Priem, Jason; Groth, Paul; Taraborelli, Dario. (2012). The Altmetrics Collection. *PLoS ONE*, 7(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048753>

Priem, Jason y Hemminger, Bradley. (2010). Scientometrics 2.0: Toward new metrics of scholarly impact on the social Web. *First Monday*, 15(7).

<https://firstmonday.org/ojs/index.php/fm/article/view/2874/2570>

Rousseau, Ronald y Ye, Fred. (2013). A multi-metric approach for research evaluation. *Chinese Science Bulletin*, 58(26), 3288-3290.

<https://doi.org/10.1007/s11434-013-5939-3>

Shapin, Steve. (1979). *General - Science, Technology and Society: A Cross-Disciplinary Perspective*. Edited by Ina Spiegel-Rösing and Derek de Solla Price. London and Beverly Hills: Sage, 1977. Pp.



xi 607. £20.00. *The British Journal for the History of Science*, 12(1), 90-91.
[doi:10.1017/S0007087400016861](https://doi.org/10.1017/S0007087400016861)

Seglen, Per. (1997). Why the impact factor of journals should not be used for evaluating research. *BMJ*, 314, 498-502.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2126010/pdf/9056804.pdf>

Shaikh, Abdul y Alhoori, Hamed. (2019). Predicting patent citations to measure economic impact of scholarly research. En *ACM/IEEE Joint Conference on Digital Libraries*, 400-401.
<https://arxiv.org/abs/1906.08244>

Smith, Adrian; Voss, Jan-Peter; Grin, John. (2010). Innovation studies and sustainability transitions: The allure of the multi-level perspective and its challenges. *Research Policy*, 39(4), 435-448.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048733310000375>

Thelwall, Mike y Kousha, Kayvan. (2015). Web indicators for research evaluation. Part 1: Citations and links to academic articles from the Web. *Profesional De La Información*, 24(5), 587-606.
<https://doi.org/10.3145/epi.2015.sep.08>

Torres-Salinas, Daniel y Cabezas-Clavijo, Álvaro. (2013). D.3. Altmetrics: no todo lo que se puede contar, cuenta. El profesional de la Información, 7, 114-117.
<https://recyt.fecyt.es/index.php/ThinkEPI/article/viewFile/30343/15939>

United Nations. (2012). *UN System Task Team on the Post-2015 UN Development Agenda*.
<https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/index.php?page=view&type=400&nr=843&menu=35>

Vélez-Cuartas, Gabriel; Uribe-Tirado, Alejandro; Restrepo-Quintero, Diego; Ochoa-Gutierrez, Jaider; Pallares, César; Gómez-Molina, Huber; Suárez-Tamayo, Marcela; Calle, Julián. (2019). Hacia un modelo de medición de la ciencia desde el Sur-Global: métricas responsables. *Palabra Clave*, 8(2).
<https://doi.org/10.24215/18539912e068>

Viales, Ronny. (2016). Los elementos básicos para la formulación de políticas científicas, tecnológicas y de innovación para la cohesión social. Una visión CTS. *Revista de Ciencias Sociales*, (153), 101-120.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5879688>

Efecto de bioestimulantes en la germinación y desarrollo de plantas mutantes de
Hibiscus sabdariffa L.



28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Efecto de bioestimulantes en la germinación y desarrollo de plantas mutantes de

Hibiscus sabdariffa L.

Autor: Caballero Romero, Pablo César; pabloc_333@hotmail.com

Co-autor(es): Samudio, Antonio; antosamud@gmail.com; Gonzales, María; macarigo50@gmail.com; Cantero, Isaura; isauracangar@gmail.com; Benítez, Juan; juanvenabe@gmail.com

Profesor/a Tutor/a: Nakayama, Héctor; hnakayama@rec.una.py

Universidad de Nacional de Asunción (UNA)

Resumen

La rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), es una planta que se adapta a climas tropicales y subtropicales. En Paraguay, es cultivado por su agradable sabor, siendo utilizado como cultivo alternativo por el pequeño productor. Sin embargo, se desconoce las tecnologías aplicadas a este cultivo. Debido a esto, fue realizado un experimento en el invernadero y en el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción, durante los meses de abril y mayo de 2022, con el objetivo de evaluar bioestimulantes químicos y naturales en la germinación y desarrollo de plantas mutantes de rosella. Para el experimento fue utilizado el Diseño Completo al Azar, con 4 tratamientos (Testigo, Extracto de bulbos de *Cyperus*, producto a base de anhídrido fosfórico y ácido indolbutírico (0,2%)), y 5 repeticiones, empleándose 5 plantas por repetición. Las variables evaluadas fueron: germinación de las semillas, altura de la planta, número de raíces, longitud de raíces, peso fresco y peso seco de las raíces. Los resultados fueron sometidos a ANAVA y test de Tukey al 5% de error. Entre las variables, el porcentaje de germinación, número de hojas, peso fresco y seco de raíces, se observaron diferencias significativas, obteniendo mejores resultados en las plantas tratadas con el extracto de *Cyperus rotundus* L, demostrando mejores resultados de este producto.

Palabras clave: Rosella, cultivares mutantes, bioestimulantes



Introducción

La rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), también conocida como rosa o flor de Jamaica, es una planta perteneciente a la familia de las malváceas, es un arbusto anual originario de Asia, específicamente de la región que va desde la India a Malasia. Se desarrolla adecuadamente en climas tropicales y subtropicales (González, 2014).

Según Meza (2012), la rosella es cultivada con el fin de aprovechar el cáliz que es la parte carnosa de color rojo claro y oscuro según la variedad; la misma es rica en ácido málico. Además del cáliz, se aprovecha la semilla, hojas y tallos. La cosecha de los cálices se realiza de manera tradicional los que se consumen principalmente en infusiones, bebidas, dulces y vinos.

La rosella tiene varios efectos benéficos sobre la salud humana. Es rica en compuestos nutraceuticos como las antocianinas y procianidinas, un contenido significativo de las vitaminas A y C, gran cantidad de minerales, ácido cítrico y málico entre muchos otros componentes (Sumaya et al. 2014).

Gilbert citado por Vera y Aragón y Gavilán (2014), menciona que en Paraguay, este cultivo es conocido comúnmente como rosella o grosella, la misma tiene muchas

variedades pero en nuestro país se cultiva la *Hibiscus sabdariffa* L.

El mismo autor menciona que este cultivo es producido en el departamento de Misiones y Paraguari, utilizada fundamentalmente para preparar mermeladas; contiene abundante cantidad de ácidos vegetales que le dan un sabor muy agradable a los preparados de rosella, considerándose así, un cultivo alternativo para el pequeño productor.

Sin embargo, este cultivo aún se desconoce en gran manera en el país, por esta razón el uso de tecnologías para la producción de la misma es escaso. Actualmente existen variedades regionales producidas en el país, con el uso de tecnologías tradicionales, la introducción de nuevas técnicas podría favorecer a la producción de este rubro, como el caso de las variedades de rosella mejoradas genéticamente por mutación.

González (2015), menciona que la variedad de rosella Benito, es obtenido de parentales de variedad Yerzy, esta variedad mutante presenta ciertas características como un alto potencial productivo en condiciones de bajo suministros de agua.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

La misma autora menciona que esta variedad puede desarrollarse en ciclo más corto en comparación a la variedad parental, además de obtener mejor cantidad de frutos por planta y por ende, mayor producción.

Por otra parte, para mejorar la producción agrícola, existen los bioestimulantes que promueven el desarrollo fisiológico de las plantas, favoreciendo así la expresión del potencial genético y la productividad, a través del crecimiento y desarrollo de los órganos radiculares y aéreos (Calero et al.,

Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo en el invernadero de la sección de Fruticultura y Silvicultura de la Escuela Agrícola de Villarrica, dependiente del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Las variables fueron evaluadas en el laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) dependiente de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción, ubicado en la ciudad de San Lorenzo, departamento Central. El mismo se realizó en el periodo comprendido entre los meses de abril y mayo de 2022.

2019), y de esta forma mejorar la producción y la productividad del cultivo.

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes bioestimulantes en la germinación y desarrollo de plantas mutantes de rosella.

Los objetivos específicos del presente trabajo fueron la evaluación de la germinación de las semillas de rosella, la altura de la planta, número de raíces, longitud de raíz, peso fresco y peso seco de las mismas.

Los materiales biológicos utilizados fueron: Semillas de rosella mutantes (*Hibiscus sabdariffa* L.) variedad Benito, proveídas por laboratorio de Biotecnología del CEMIT, generadas por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); bulbos de *Cyperus* (*Cyperus rotundus* L.); los materiales químicos utilizados fueron: Producto a base de Anhídrido fosfórico, compuesto por anhídrido fosfórico y óxido de potasio; ácido indolbutírico (0,2%). Fue empleado el Diseño Completos al Azar (DCA), con 4 tratamientos y 5 repeticiones (Cuadro 1). Cada repetición estuvo compuesta por 5 plantas.



Cuadro 1. Tratamientos y descripción de los mismos aplicados en los experimentos. EAV-DEA-MAG, CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2022.

Tratamiento	Descripción
1	Testigo
2	Extracto de bulbos de Cyperus
3	Producto a base de Anhídrido fosfórico
4	Ácido indolbutirico (0,2%)

Para la obtención del extracto de Cyperus fueron recolectados, lavados y secados en temperatura ambiente por un periodo de 96 horas. Posteriormente se procedió a desinfectar con hipoclorito de sodio por un periodo de 5 minutos. Luego se pesaron 35 gr de bulbos y se mezclaron con 200 mL de agua destilada, posteriormente esto fue liofilizado por un periodo de 72 horas a fin de obtener una masa seca.

Una vez obtenido el producto liofilizado, se pesó 7 gr y se mezclaron con 40 mL de agua destilada, la solución se dejó reposar por un periodo de 48 horas. (Salustriano et al. 2020; Laynez, 2007). Posteriormente se filtró sobre un paño de algodón y filtro de papel para su posterior uso (Sarubbi 2002).

Para los tratamientos a base de anhídrido fosfórico y oxido de potasio, se preparó la solución a una concentración del 2% respectivamente; mientras que para el producto a base de ácido indolbutírico con un concentrado del 0,2% se mezcló con agua destilada. En cuanto al testigo, se utilizó agua corriente para su uso (Dago et al. 2021; Laynez, 2007).

Fueron seleccionadas 100 semillas totales empleando 25 semillas por tratamiento. Las semillas fueron introducidas en los tratamientos previamente seleccionados, los mismos fueron dejados en inmersión por un periodo de 2 horas. Trascurrido este tiempo, las semillas fueron colocadas sobre papel de filtro para su secado, a temperatura ambiente y sin la incidencia de radiación solar por un periodo de 15 minutos (Dago et al. 2021).

Las semillas fueron almacenadas en recipientes de plástico previamente desinfectados, las mismas estaban compuestas con papel previamente humedecidas con agua destilada a fin de proveer las condiciones adecuadas para las semillas.

En los recipientes fueron evaluadas la cantidad de semillas germinadas cada doce horas por un periodo de tres días, realizando evaluaciones a las 24, 48 y 72



horas, con lo cual se determinó el porcentaje de germinación.

Pasada las 72 horas y realizando las evaluaciones de germinación, se procedió a trasplantarlas en macetas de polietileno, compuestas por sustrato comercial estéril, a fin de verificar el desarrollo de las plántulas (Cabeza et al. 2010). Las evaluaciones fueron realizadas a los 30 días luego del trasplante.

Las variables evaluadas fueron: altura de la planta, determinándose en cm a los 30 días luego del trasplante; número de hojas; números de raíces; longitud radical el cual se registró en cm desde el cuello del tallo hasta el ápice de la cabellera radical, midiéndose con la ayuda de una regla; peso fresco y peso seco de raíces medidas en gramos.

Resultados y Discusión

Germinación de semillas

En los resultados relacionados a la germinación, presentan diferencias significativas en los porcentajes obtenidos a las 24, 48 y 72 horas, se puede observar en el Cuadro 2.

Para la medición del peso fresco y peso seco de las raíces, se utilizó la metodología descrita por Lobo et al. (2020), consistente en separar las raíces de la parte aérea, posteriormente se pesaron las raíces por separado en una balanza analítica y luego fueron almacenadas en bolsas de papel para su posterior uso; finalmente para el peso seco, se evaluaron las raíces almacenadas a temperatura ambiente (25 °C durante 10 días), pesando nuevamente las raíces por separado en una balanza analítica para luego analizarlos.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a ANAVA y test de Tukey al 5% de probabilidad de error, empleándose el Software Infostat.

Los resultados obtenidos a las 24 horas, el mayor porcentaje de germinación se registró con el testigo (36%), mientras que no se observaron germinaciones en las semillas tratadas con extracto de Cyperus y con el ácido indolbutírico (0,2%).



Cuadro 2. Porcentaje de germinación de semillas de rosella evaluadas a las 24, 48 y 72 horas. EAV-DEA-MAG, CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2022.

Tratamientos	Germinación 24 hrs	Germinación 48 hrs	Germinación 72 hrs
T1 (Testigo)	36 a*	61 b	61 b
T2 (Extracto de Cyperus)	0 c	36 c	36 d
T3 (Prod. Anhídrido fosfórico)	25 b	53 b	53 c
T4 (Ácido indolbutírico (0,2%))	0 c	78 a	78 a

*Test de Tukey las medias con letras diferentes en las columnas, indican diferencia significativa al 5% de probabilidad de error

En las 48 horas luego de la siembra, el mayor porcentaje de germinación se observó con las semillas tratadas con el ácido indolbutírico (0,2%) con (78%) seguidas por las semillas tratadas con agua corriente (61%) y con el producto químico a base de anhídrido fosfórico (53%), y el menor porcentaje se registró en el extracto de Cyperus con 36%.

A las 72 horas después de la siembra, ya no se observaron diferencias entre las germinaciones a las 48 horas, obteniendo el mayor porcentaje de germinación en las semillas tratadas con el ácido indolbutírico (0,2%), con 78% y el menor porcentaje se presentó en el extracto de Cyperus con 36%.

Estos resultados concuerdan con lo expuesto Baños et al. (2009), quienes mencionan efectos positivos de semillas de (*Murraya paniculata* L.) tratadas con bajas concentraciones de ácido indolbutírico (0,5 mg.L-1), difirieron significativamente del resto de los tratamientos y el testigo.

Los mismos autores mencionan que no se encontraron informaciones del uso del ácido indolbutírico para estimular la germinación de semillas de ciertas especies, tal como el caso de la rosella; solo se encontraron informaciones sobre el uso de este producto en la propagación asexual, relacionado con el aumento de la cantidad de raíces en estacas, resultando así novedosos en el cultivo de esta especie.



De la misma manera, Dago et al. (2021) mencionan que al realizar la aplicación de bioestimulantes en semillas de poroto (*Vigna unguiculata* L.), se observaron efectos positivos con las semillas tratadas con los bioestimulantes químicos, concluyendo que se pueden lograr una mayor velocidad y porcentaje de germinación, relacionando con el hecho de que estos productos contienen niveles de triptófano y otros aminoácidos.

Báez et al. (2015), mencionan que el uso del ácido indolbutírico en el desarrollo de plantas de trigo, es beneficioso, debido a que este producto es un promotor para el crecimiento de las raíces laterales de las plantas, sin embargo, la dosis y la época de aplicación son críticas para estimular el enraizamiento de las plantas.

Número de hojas y Altura de planta (cm)

Cuadro 3. Medias obtenidas para las variables número de hojas y altura de planta (cm).

EAV-DEA-MAG, CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2022.

Tratamientos	Número de hojas	Altura (cm)
T1 (Testigo)	5,50 a*	19,83 a
T2 (Extracto de bulbos de Cyperus)	5,30 a b	15,61 a
T3 (Prod. Anhidrido fosfórico)	4,63 b	18,75 a
T4 (Ácido indolbutírico (0,2%))	3,30 c	17,10 a

*Test de Tukey las medias con letras diferentes en las columnas, indican diferencia significativa al 5% de probabilidad de error

En cuanto a la variable de número de hojas por plantas, el análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3), el mayor número de hojas se registró en el testigo con 5,50 hojas que estadísticamente son similares con el extracto de Cyperus (5,30 hojas). Sin embargo, las plantas tratadas con ácido indolbutírico (0,2%), presentaron menor número de hojas (3,30).

Con relación a la altura de plantas, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos propuestos, varía entre 15,61 a 19,83 cm.

Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Laynez et al. (2007), quienes al aplicar el extracto de Cyperus en semillas de sésamo (*Sesamum indicum* L.), no se vieron afectados el crecimiento de las plantas de sésamo.



Número y longitud de raíz

Conforme a las variables número de raíces y longitud de las mismas, no se observaron diferencias estadísticas entre sí; sin embargo, los mejores resultados se observan en las plantas testigos (Cuadro 4).

Estos resultados no coinciden por lo expuesto por Hamilton et al. (2016),

Cuadro 4. Medias obtenidas para las variables número y longitud de raíces (cm). EAV-DEA-MAG, CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2022.

Tratamientos	Número de raíces (cm)	Longitud de raíz (cm)
T1 (Testigo)	10,53 a*	19,83 a
T2 (Extracto de bulbos de Cyperus)	10,27 a	15,61 a
T3 (Prod. Anhidrido fosfórico)	11,10 a	18,75 a
T4 (Ácido indolbutírico (0,2%))	9,73 a	17,10 a

*Test de Tukey las medias con letras diferentes en las columnas, indican diferencia significativa al 5% de probabilidad de error

Días, et al. (2012), en evaluaciones realizadas no encontró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con las concentraciones de extracto de tubérculos de Cyperus no mejoró el enraizamiento de esquejes café Conilon, entre los factores (concentración versus tiempo).

Estas diferencias de resultados se podrían deber a la concentración del regulador de

quienes mencionan que al aplicar el extracto de Cyperus en estacas de (*Jatropha curcas* L.) en dilución de 25 gr por 1,5 L de agua destilada, proporcionó un mayor porcentaje de enraizamiento de las estacas (30%) en comparación a las estacas tratadas por el AIB (20%), sin embargo, las raíces de las estacas tratadas por el AIB presentaron mejor vigorosidad.

crecimiento, tal como expresa Sandoval et al. (2021), quienes mencionan que es de extrema importancia la correcta concentración de los reguladores de crecimiento y la duración de inmersión de la parte de la planta a ser tratado, ya que esto se ve afectado con la especie a ser utilizada.

Ruiz y Mesen (2010); Ruiz et al. (2005), mencionan que el uso del AIB se mantiene



constante conforme a la dosificación a ser utilizada y al tipo de material vegetativo utilizado para la obtención de respuestas del enraizamiento.

Peso fresco y seco de raíces

Los resultados del promedio del peso fresco y peso seco de las raíces de rosella en los diferentes tratamientos, se observa en el Cuadro 5. Los mismos presentaron

diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Al comparar las medias entre los tratamientos, del peso fresco y seco, los mejores resultados se presentan en las plantas tratadas con el extracto de *Cyperus*, obteniendo resultados de 7,10 gr y 0,63 gr respectivamente y el menor valor se obtuvo en el ácido indolbutírico (0,2%) con 4,60 y 0,37 gr.

Cuadro 5. Medias obtenidas para las variables peso fresco y peso seco de raíces (gr). EAV-DEA-MAG, CEMIT-UNA, San Lorenzo, Paraguay. 2022.

Tratamientos	Peso fresco de raíces	Peso seco de raíces
T1 (Testigo)	5,30 b c*	0,50 a b
T2 (Extracto de bulbos de <i>Cyperus</i>)	7,10 a	0,63 a
T3 (Prod. Anhidrido fosfórico)	6,43 a b	0,43 a b
T4 (Ácido indolbutírico (0,2%))	4,60 b c	0,37 b

*Test de Tukey las medias con letras diferentes en las columnas, indican diferencia significativa al 5% de probabilidad de error

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Laynez et al. (2007), los mismos mencionan que al aplicar el extracto acuoso de *Cyperus* en semillas de maíz (*Zea mays* L.) se observó un incremento de peso de raíces, utilizando bajas cantidades del extracto.

Los mismos autores mencionan que este efecto se debería a que el *Cyperus*

presenta una sustancia química alelopática. Este producto está clasificado como metabolito secundario de la planta, compuesto principalmente de alcaloides, isoprenoides, fenoles, flavoides, terpenoides entre otros.

Estas sustancias están presentes en el tejido vegetal de la planta que pueden ser liberados al ambiente mediante procesos



ecológicos, es por esta razón que el uso de los extractos en vez de afectar a la formación de raíces, produjeron un estímulo del peso de la radícula,

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir:

- Los bioestimulantes empleados en el experimento favorecieron en un 78 % en la germinación de las semillas de rosella dentro de las 72 horas luego de la aplicación del producto.
- El extracto de bulbos de *Cyperus* presentó mayor cantidad de hojas

Bibliografía

Báez, A; González, L; Solís, E; Bautista, A; Bernal, M. (2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (3), 523- 537

Baños, H; Aleman, J; Martinez, M; Ravelo, J; Suris, M; Miranda, I; Rodriguez, H. (2009). Efecto de bioestimulantes sobre la germinación y el crecimiento de *Murraya*

manifestándose el fenómeno de hormesis, es decir, las bajas concentraciones no fueron tóxicas sino más bien beneficiosas.

en las plantas al igual que en el peso fresco y peso seco de las raíces.

- En base a los resultados obtenidos, se ofrece a los productores productos naturales de acción bioestimulante a bajo costo, a fin de incrementar la producción y la productividad del cultivo de la rosella en el país, fortaleciendo así, la agricultura familiar.

paniculata L. *Cultivos Tropicales*, 30 (1), 83-86

Cabeza, H; Balaguera, H; Useche, D. (2010). Alelopatía del extracto de *Campomanesia lineatifolia* sobre *Taraxacum officinale*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(3), doi:10.21930/rcta.vol22_num3_art:2010.

Calero, A; Quintero, E; Pérez, Y; Oliveira, D; Peña, K; Jimenez, J. (2019). Efecto entre microorganismos eficientes y fitomas-e en el incremento agroproductivo



del frijol. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 17 (1), 25-33

Dago, Y; Santana, Y; Hernández L. (2021). Efecto de los bioestimulantes sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Vigna unguiculata* subsp. *Sesquipedalis* L. Cv. Cantón 1. *Revista Científica Agroecosistemas*, 9(1), 11-17.

Dias, J. R. M., Silva, E. D., Gonçalves, G. S., Silva, J. F. D., Souza, E. F. M. D., Ferreira, E., & Stachiw, R. (2012). Enraizamiento de estacas de cafeeiro imersas em extrato aquoso de tiririca.

González, M. (2015). Informe de nuevo cultivar Benito, nuevo mutante de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.) de alto potencial productivo en condiciones de bajos suministros de agua. *Cultivos tropicales*, 36, 130

Hamilton, L. H., Calandrelli, L. L., & Gonzales, J. L. S. (2016). Efecto del extracto acuoso de tubérculos de *Cyperus rotundus* L. en la propagación por esquejes de *Jatropha curcas* L. *Revista de Investigaciones Altoandinas-Journal of High Andean Research*, 18(1), 09-18.

Layne, J; Mendez, J. (2007). Efectos de extractos acuosos de la maleza *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) cv.

Pioneer 3031. *Revista Peruana de Biología*, 14 (1),55-60

Lobo, M; Ruiz, J; Cogolludo, E; Mancho, C. (2020). Comportamiento, caracterización y producción de biomasa de las especies autóctonas aladierno, aligustre y majuelo en revegetación y producción agraria años después de su implantación. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario. Madrid, España. <http://www.conama11.vsf.es>

Meza, P. (2012). Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) e (*Hibiscus cruentus* Bertol). Asociación para el Desarrollo Eco-Sostenible ADEES. Nicaragua. <http://www.adeesnic.org>

Salustriano, R; Furtado, M; Barros, M. (2020). Extrato de *Cyperus rotundus* L. no enraizamiento de estacas semilenhosas de frutíferas. *Tecnología de Producción de Fruticultura* 2 (pp. 131-142). Atenas Editorial

Sandoval, M; Miranda, G; Resende, A; Cazaroto, G; Pena, H. (2021). Enraizamiento de estacas de roseira imersas em extrato aquoso de tiririca (*Cyperus rotundus* L.). *Conjecturas*, 21 (1), 299-307

Sarubbi, H. 2002. Control alternativo de *Rhizoctonia solani* en petunia (*Petunia x hybrida*). Tesis (Maestría) San Lorenzo, PY. Carrera de Ingeniería Agronómica,



Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. 36 p.

Sumaya, M; Medina R; Machuca, M; Jimenez, E; Balois, R; Sanchez, L. (2014). Potencial de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) En la elaboración de alimentos funcionales con actividad antioxidante. Revista Mexicana de Agronegocios, 25 (2), 1082-1088

Ruiz, H; Mesen, F. (2010). Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia*

volubilis L.). Agronomía Costarricense, 34(2), 259- 267

Ruiz, R; Vargas, J; Cetina, V; Villegas, A. (2005). Efecto del ácido indolbutírico (aib) y tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina arborea* Roxb. Revista Fitotecnia Mexicana, 28 (4), 319 – 326

Vera y Aragón, D; Gavilán, M. (2014). Determinación de la vida útil de rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante la aplicación de diferentes métodos de conservación. III Congreso de Ciencias Agrarias, 3 539-540

Actividad antifúngica de R-citronellal, componente mayoritario del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) frente *Sporothrix brasiliensis*



C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Actividad antifúngica de R-citronellal, componente mayoritario del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) frente *Sporothrix brasiliensis*

Autor: Sosa Medina, Noemí; noe97sos@gmail.com

Co-autor(es): Arrua, Andrea Alejandra; andrea.arrua@cemit.una.py; Cazal Martínez, Cinthia Carolina; ccazal@rec.una.py; Patiño, Soledad; sole.gonza98@gmail.com; Sarmiento Guerra,

Felipe Queiroga; fqsq@academico.ufpb.br; Villalba Fariña, Domitila;

domivillalba10@gmail.com

Profesor/a Tutor/a: Moura-Mendes, Juliana; jmendes@rec.una.py

Universidad Nacional de Asunción (UNA)

Resumen

La esporotricosis es una infección fúngica causada principalmente por *Sporothrix brasiliensis* y ha causado mucha preocupación en los últimos dos años por los crecientes casos en humanos y animales en Brasil y en países limítrofes, como Paraguay, Argentina y Bolivia. Desde el 2014 según la literatura científica se han presentado casos de cepas con resistencia al Itraconazol, teniendo presente que no se cuenta con demasiadas opciones para el tratamiento nace la necesidad de encontrar una alternativa para combatir esta infección fúngica, buscando en fuentes naturales que aún no han muy estudiadas y que poseen gran potencial. Partiendo de lo expuesto, se analizó la composición fitoquímica del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas y se evaluó la actividad antifúngica del R-citronellal frente *Sporothrix brasiliensis*. Para la obtención de la concentración inhibitoria mínima y la concentración fungicida mínima se realizó la técnica de microdilución en caldo RPMI. Además, la anfotericina B se usó como control de la inhibición del crecimiento del hongo. La concentración inhibitoria mínima para las cepas CF-0051 y LM-264/20 fue de 128 µg/mL y 64 µg/mL, respectivamente. No se logró determinar valores de concentración fungicida mínima porque las concentraciones deben ser mayores a las utilizadas. Se puede concluir que R-citronellal tiene actividad antifúngica y se presenta como un prometedor producto antifúngico en el tratamiento de la esporotricosis, aunque es necesario dar continuidad a los ensayos para asegurar un futuro uso.

Palabras clave. esporotricosis, metabolitos secundarios, zoonosis



Introducción

Las infecciones micóticas pueden provocar daños superficiales, pero también diseminarse a niveles más profundos de la piel y desarrollar enfermedades sistémicas que inclusive afecten los huesos (García, 2017). La esporotricosis es una micosis subcutánea cuyo microorganismo causal pertenece al complejo *Sporothrix schenckii* (Lopes-Bezerra et al., 2018).

La esporotricosis está ampliamente distribuida por el mundo y representa una de las micosis subcutáneas más frecuente, principalmente en áreas tropicales y subtropicales, estos hongos viven en el suelo, plantas, materia orgánica, paja, ramas y musgos. Por mucho tiempo fue considerada una enfermedad ocupacional, propia de agricultores, campesinos y jardineros debido a que el agente causal ingresa al organismo a través de traumas en la piel provocados por el material vegetal contaminado con el hongo (Gaviria-Giraldo & Cardona-Castro, 2017).

A principios del siglo XXI se pensaba que esta enfermedad era causada por una sola especie, pero con ayuda de la biología molecular y otras técnicas genéticas se logró dilucidar que en realidad eran varias especies las que formaban parte de *S. schenckii* como *S. globosa*, *S. mexicana* y *S.*

brasiliensis, esta última de gran importancia en Brasil. *Sporothrix* spp exhibe una característica de dimorfismo térmico, a 25°C predomina la fase filamentosa y a 37°C la forma levaduriforme coincidiendo con la temperatura corporal y expresando su patogenicidad, todo esto es regulado a través de la transducción de señales intracelulares que le permite adaptarse a cambios ambientales, por lo tanto, la fosfolipasa citosólica A2 es necesaria para su conversión a fase patógena (Mendoza et al., 2019).

El desarrollo de los países con zonas endémicas de esporotricosis hizo que las personas y sus mascotas domésticas se acercaran más a su ambiente natural, por ende, las infecciones micóticas de gatos y perros fueron en aumento y con ellas las de los seres humanos por transmisión zoonótica mediante arañazos y mordeduras de animales infectados, principalmente la especie *S. brasiliensis* relacionada con los gatos, siendo una zoonosis difusa y difícil de controlar (Rivera Barquero, 2021).

El uso excesivo del Itraconazol, un antifúngico de primera elección utilizado para el tratamiento de humanos y felinos con esporotricosis ha permitido la aparición



de resistencia, por lo tanto, el aumento de casos en humanos y felinos se torna cada vez un problema mayor y con tratamiento cada vez más limitado (Ferreira, 2019). Además, el elevado costo y la duración prolongada del tratamiento es un factor importante para realizar una búsqueda de nuevas alternativas (Hernández Chacón et al., 2021).

Paraguay cuenta con algunos antecedentes de casos de esporotricosis transmitidos por felinos y otros animales (Aguilar Fernández & Araújo López, 2020).

Actualmente Brasil, país con el que se tiene una estrecha relación fronteriza, se encuentra con brotes epidémicos de transmisión zoonótica (felinos principalmente) con predominancia casi en su totalidad de la especie *S. brasiliensis* es de gran relevancia el estudio de este hongo por su fácil propagación y difícil control de los animales domésticos y la transmisión al ser humano. Una alternativa que desde la antigüedad ha sido muy utilizada, son las plantas medicinales como fuente de tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las infecciosas. Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales se han demostrado eficientes en combatir diferentes enfermedades infecciosas,

incluyendo las de la piel (Pereira et al., 2011).

Cymbopogon winterianus Jowitt ex Bor (Poaceae) conocida popularmente como "citronela" es ampliamente utilizada por su actividad repelente, antifúngico y acaricida (De Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2011).

Ante este contexto se buscó analizar la composición química del aceite esencial de citronela (*C. winterianus* Jowitt ex Bor) por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y evaluar la actividad antifúngica del principal fitoconstituyente, R-citronellal frente *Sporothrix brasiliensis*

Materiales y Métodos

Aceites esenciales

El aceite esencial de Citronela (*C. winterianus* Jowitt ex Bor) fue proveído por la Dra. Edeltrudes Oliveira Lima – Laboratorio Atividade Antibacteriana e Antifúngico de Produtos de Naturais e/ou Sintético Bioativos Universidade Federal da Paraíba.

R-citronellal y anfotericina B fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® (Brasil).



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

Análisis por Cromatografía gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas

El aceite de citronela fue sometido al análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS BRUKER 436-GC). Columna capilar de Crossbond 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane de 30 m por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor, marca Restek Rtx-5. El helio se utilizó como gas portador a 0,9 mL/min, con presión de entrada 48,9 psi. La temperatura inicial de la columna fue de 60°C por 1 minuto con una rampa de temperatura de 120°C por 5 minutos y una temperatura final de 280°C por 20 minutos con un total de 21 minutos de inyección. El sistema de energía de ionización para la detección utilizado fue de 70 eV. La muestra se diluyó 1/1000 (v/v) con hexano y se inyectó 1 μL en el modo split/less (Adams RP, 2001; Moura Mendes et al., 2012). Los compuestos se identificaron por comparación de los patrones de fragmentación reportados en los espectros de masas con la biblioteca NIST MS Search 2.3 y según la literatura. La cuantificación se realizó considerando el área bajo de la curva de cada pico correspondiente a cada componente en relación con la totalidad de las áreas de los picos estandarizados en el cromatograma.

Cepas fúngicas y preparación de inóculo

Las cepas fúngicas seleccionadas para el estudio son *Sporothrix brasiliensis* CF-0051 y LM-264/20 y fueron proveídas por el Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra (Laboratorio de Micología - Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidade Federal da Paraíba) y actualmente se encuentran preservadas en la Colección de Cultivos de Microorganismos de la Universidad Nacional de Asunción CCM-UNA (FELACC, SI-70).

Para la preparación de los inóculos se sembraron las cepas de *Sporothrix brasiliensis* CF-0051 y LM-264/20 en placas con medio de cultivo agar de papa y dextrosa y se incubó a $25\pm 2^\circ\text{C}$ por 7-10 días. Posterior, se adiciona aproximadamente 1mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%) a las placas con los cultivos fúngicos, se dejó escurrir por toda la placa para asegurar que las esporas fueran arrastradas y posteriormente se transfirieron aproximadamente 0,5 mL con micropipetas a tubos de vidrios que contienen 8 mL de solución salina estéril, las suspensiones se agitaron en vórtex durante 10 segundos. Se contaron las esporas con cámara de Neubauer ajustándose a concentración de 4×10^5



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La concentración inhibitoria mínima fue determinada con la técnica de microdilución con microplacas de 96 pocillos (NCCLS, 2002).

Se adicionaron 100 μ L de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®-Brasil) en todos los pocillos y se procedió con la microdilución de las drogas testeadas. La concentración de R-citronellal varió de 2048-16 μ g/mL y de la anfotericina B de 25 - 0,2 μ g/mL. Por último se adicionó el inóculo fúngico y se procedió con la incubación de las microplacas por 5 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se realizó un control solo con el inóculo fúngico (control de crecimiento) y un control de esterilidad, utilizando únicamente el medio de cultivo, sin el inóculo.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue definida como la mínima concentración

capaz de inhibir el crecimiento fúngico visible en los pocillos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)

Una alícuota de 10 μ L de los pocillos correspondientes a CIM y CIMx2 fue incubada en placas de petri con agar PDA, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 días. La CFM fue considerada como la menor concentración sembrada en PDA donde hubo un crecimiento menor o igual de 3 unidades formadoras de colonias (UFC) (Klepser et al., 1998).

Resultados y Discusión

El cromatograma del análisis del aceite esencial de citronela (*C. winterianus* Jowitt ex Bor) obtenido por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas se muestra en la figura 1. Los compuestos identificados de acuerdo con la biblioteca del espectrómetro de masas se muestran en la tabla 1.

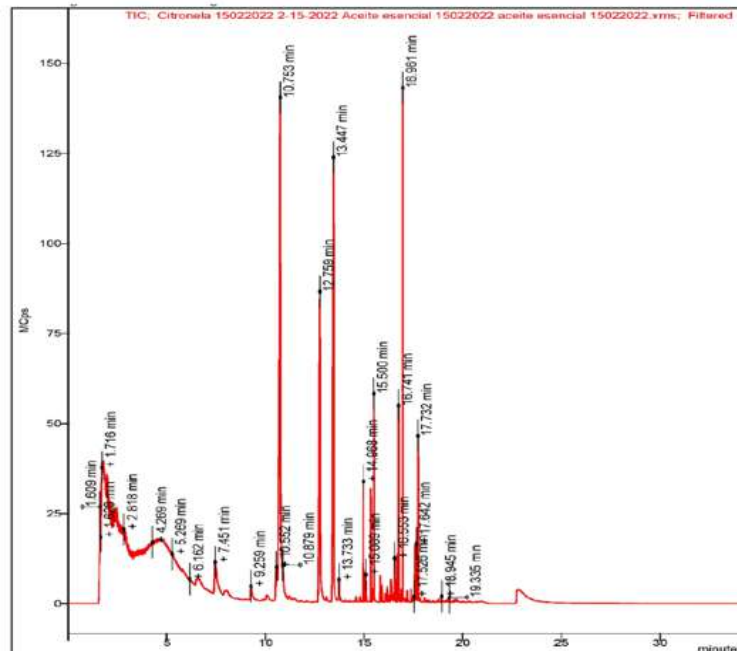


Figura 1. Cromatograma obtenido del análisis del aceite esencial de *C. winterianus* Jowitt ex Bor (Citronela) por CG-EM.

En el presente trabajo se encontró que el R-citronellal, Geraniol y R-citronellol son los compuestos mayoritarios constituyentes del aceite esencial de citronela (*C. winterianus* Jowitt ex Bor) coincidiendo con el reportado por Verma et al., 2020 y Oliveira et al., 2011.

La actividad antibacteriana (Verma et al., 2020, De Oliveira et al., 2015) y antifúngica (Li et al., 2013; Verma et al., 2020; Wu et al., 2016; Pereira et al., 2011) de citronela ha sido ampliamente reportada, lo que nos indujo a investigar la

actividad antifúngica del citronellal frente cepas de *Sporothrix brasiliensis*, considerando la actual relevancia de mencionada micosis zoonótica (CDC, 2020; Andrade EHP et al., 2022).

En la evaluación de la actividad antifúngica, R-citronellal presentó valores promedios de Concentración Inhibitoria Mínima de 128 µg/mL y 64 µg/mL para las cepas de *S. brasiliensis* CF0051 y LM-264/20, respectivamente, como puede observarse en la tabla 2.

Tabla 1. Compuestos identificados del aceite esencial de citronela (*C. winterianus* Jowitt ex Bor) utilizando CG-EM.

Picos	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Abundancia (%)	Área	Concentración (%)
1	10.752	(R)-(+)-Citronellal	72.86	6.15x10 ⁸	34.36
2	12.76	(R)-Citronellol	47.78	3.01x10 ⁸	16.84
3	13.448	Geraniol	67.39	3.81x10 ⁸	21.30
4	14.969	Citronellol acetate	24.42	4.53x10 ⁷	2.53
5	15.338	Geranyl acetate	21.98	3.78x10 ⁷	2.11
6	15.501	β-Elemene	23.7	7.37x10 ⁷	4.12
7	16.554	α-Murolene	14.39	1.91x10 ⁷	1.07
8	16.684	γ-Amorphene	14.31	1.45x10 ⁷	0.81
9	16.741	δ-Cadinene	29.02	5.71x10 ⁷	3.19
10	16.96	Elemol	25.81	1.58x10 ⁸	8.81
11	17.585	α-Gurjunene	5.78	1.51x10 ⁷	0.84
12	17.642	T-Cadinol	42.18	1.96x10 ⁷	1.10
13	17.733	(-)-α-Cadinol	53.52	5.21x10 ⁷	2.91

No se pudo determinar la CFM, considerando que en la concentración CIMx2 hubo un crecimiento superior a 3 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se puede concluir parcialmente que en la CIM y CIMx2 R-citronellal presenta actividad fungistática, sin embargo, es necesario ensayar con mayores concentraciones.

Es importante mencionar que no se encuentra en la literatura estudios anteriores realizados con el R-citronellal frente *S. brasiliensis*.

Conclusiones

De acuerdo con el estudio realizado, R-citronellal, principal constituyente del aceite esencial de citronela posee actividad antifúngica frente cepas de *S. brasiliensis*

sin embargo es necesario realizar más estudios para considerar como una alternativa terapéutica.

Tabla 2. Valores promedios de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de R-citronellal frente cepas de *Sporothrix brasiliensis* por microdilución seriada.

[R-citronellal]	<i>S. brasiliensis</i> CF0051	<i>S. brasiliensis</i> LM-264/20	Control positivo	Control negativo	<i>S. brasiliensis</i> CF0051	<i>S. brasiliensis</i> LM-264/20	[Anfotericina B]
2048 ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	+	-	-	-	25 ($\mu\text{g/mL}$)
1024 ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	+	-	-	-	12,5 ($\mu\text{g/mL}$)
512 ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	+	-	-	-	6,3 ($\mu\text{g/mL}$)
256 ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	+	-	-	-	3,1 ($\mu\text{g/mL}$)
128 ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	+	-	+	-	1,6 ($\mu\text{g/mL}$)
64 ($\mu\text{g/mL}$)	+	-	+	-	+	+	0,7 ($\mu\text{g/mL}$)
32 ($\mu\text{g/mL}$)	+	±	+	-	+	+	0,4 ($\mu\text{g/mL}$)
16 ($\mu\text{g/mL}$)	+	+	+	-	+	+	0,2 ($\mu\text{g/mL}$)

(±) indeterminado

(+) presencia de crecimiento

(-) ausencia de crecimiento



Bibliografía

Adams RP. 2001. Identification of essential oils components by gas chromatogram-phy/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.

Aguilar Fernández, G., & Araújo López, P. V. (2020). Micosis y nocardiosis de implantación: esporotricosis, cromoblastomicosis, micetomas y nocardiosis. Casuística del Laboratorio Central de Salud Pública, Paraguay, período 1997-2019. Rev. Nac. (Itauguá), 12(1), 1-13.

Andrade, E. H. P. (2022). Surto Doméstico de Esporotricose: Rumo a uma Abordagem de Saúde Única - SBMT. <https://www.sbmt.org.br/portal/surto-domestico-de-esporotricose-rumo-a-uma-abordagem-de-saude-unica>.

De Oliveira Pereira, F., Mendes, J. M., Lima, I. O., De Lira Mota, K. S., De Oliveira, W. A., & De Oliveira Lima, E. (2015). Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 228-234. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913299>.

FERREIRA, P. G. (2019). Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da esporotricose.

García, J. (2017). 1.1- Esporotricosis transmitida por un gato. Paraguay.pdf. <https://doi.org/10.18004/rdn2017.009.02.086-095>.

Gaviria-Giraldo, C. M., & Cardona-Castro, N. (2017). Esporotricosis y cromoblastomicosis: revisión de la literatura TT - Sporotrichosis and chromoblastomycosis: literature review. *CES Medicina*, 31(1), 79-91. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052017000100079&lang=pt%0A <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v31n1/0120-8705-cesm-31-01-00079.pdf>.



Hernández Chacón, J. R., Torres Morales, S. A., & Hernández Chacón, E. M. (2021). Esporotricosis: la micosis subcutánea más distribuida en el mundo. *Revista Medica Sinergia*, 6(9), e714. <https://doi.org/10.31434/rms.v6i9.714>.

Kume, J. É. P., Andreani Junior, R., Vazquez, G. H., & Kozusny-Andreani, D. I. (2021). Atividade antifúngica de óleos essenciais in natura e ozonizados sobre o agente etiológico da esporotricose. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(3), 126-135. <https://doi.org/10.6008/cbpc2179-6858.2021.003.0012>.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jun;42(6):1387-91. doi: 10.1128/AAC.42.6.1387. PMID: 9624481; PMCID: PMC105609.

Li, W. R., Shi, Q. S., Ouyang, Y. S., Chen, Y. Ben, & Duan, S. S. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(16), 7483-7492. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4460-Y>.

Lopes-Bezerra, L. M., Mora-Montes, H. M., Zhang, Y., Nino-Vega, G., Rodrigues, A. M., De Camargo, Z. P., & De Hoog, S. (2018). Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *En Medical Mycology* (Vol. 56, pp. S126-S143). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx103>.

Mendoza, D., Milagros, M., Quispe, S., Carrasco, E., Soto, R., & Carlos, M. (2019). Análisis del aceite esencial de muña (*Mintosthachys acris* Schmidt-Leb.) y evaluación de su actividad antimicótica sobre *Sporothrix schenckii*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa>.



Moura Mendes, Juliana, Felipe Queiroga, Sarmiento Guerra, Fillipe De, Oliveira Pereira, Janiere Pereira De Sousa, y Vinicius Nogueira Trajano. 2012. «Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos». *Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(3):208-17.

NCCLS. 2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. Vol. 22.

Oliveira, Wyly Araújo de, Fillipe de Oliveira Pereira, Giliara Carol Diniz Gomes de Luna, Igara Oliveira Lima, Paulo Alves Wanderley, Rita Baltazar de Lima, y Edeltrudes de Oliveira Lima. 2011. «Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*». *Brazilian Journal of Microbiology* 42(2):433-41. doi: 10.1590/S1517-83822011000200004.

Pereira, Fillipe de Oliveira, Paulo Alves Wanderley, Fernando Antônio Cavalcanti Viana, Rita Baltazar de Lima, Frederico Barbosa de Sousa, y Edeltrudes de Oliveira Lima. 2011. «Growth Inhibition and Morphological Alterations of *Trichophyton Rubrum* Induced By». *Brazilian Journal of Microbiology* 42:233-42. doi: 10.1590/S1517-83822011000100029.

Rivera Barquero, Á. (2021). Universidad de costa rica (UCR) sistema de estudios de posgrado esporotricosis: estado actual del conocimiento.

Surto Doméstico de Esporotricose: Rumo a uma Abordagem de Saúde Única - SBMT. (s. f.). Recuperado 13 de junio de 2022, de <https://www.sbmt.org.br/portal/surto-domestico-de-esporotricose-rumo-a-uma-abordagem-de-saude-unica>.

Sporothrix brasiliensis | Fungal Diseases | CDC. (2020). <https://www.cdc.gov/fungal/es/sporotrichosis/brasiliensis.html>.



Surto Doméstico de Esporotricose: Rumo a uma Abordagem de Saúde Única - SBMT. (s. f.). Recuperado 13 de junio de 2022, de <https://www.sbmt.org.br/portal/surto-domestico-de-esporotricose-rumo-a-uma-abordagem-de-saude-unica/>

Verma, R. S., Verma, S. K., Tandon, S., Padalia, R. C., & Darokar, M. P. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) essential oil extracted by different methods. *Journal of Essential Oil Research*, 00(00), 449-455. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1787885>.

Wu, Y., OuYang, Q., & Tao, N. (2016). Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. *Journal of Food Science*

and Technology, 53(10), 3853-3858.

<https://doi.org/10.1007/s13197-016-2358-x>.

Agradecimientos

Primeramente, muchas gracias a la Dra. Edeltrudes Oliveira y al Dr. Felipe Queiroga por proveernos el aceite esencial de citronela y las cepas de *S. brasiliensis*, respectivamente, que permitieron la realización del trabajo.

También un agradecimiento especial a la Dra. Juliana Moura por la paciencia y la guía durante todo el proceso de elaboración del trabajo, por brindar su conocimiento sin reservas e impulsar al crecimiento en el área de investigación.

Por último, gracias a todas las personas del laboratorio de biotecnología del CEMIT que colaboraron y ayudaron en gran manera durante los experimentos realizados, en especial a Soledad Patiño y Domitila Villalba.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA BIOMASSA DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Glomerella cingulata*



C.28. Produtos Naturais Bioativos e suas Aplicações

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA BIOMASSA DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Glomerella cingulata***

Autora: Gomes, Nayara de Freitas, email: nayaragomes@estudante.ufscar.br

Orientador: Rodrigues-Filho, Edson, email: edinho.labiommi@gmail.com

Co-autor: Cantanhede Filho, Antônio José, email: prof.antoniofilho@ifma.edu.br

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Resumo

É notório que a busca por novas substâncias de origem natural que possuam atividade biológica impulsiona os estudos de novas fontes de metabólitos. Desta forma, o estudo de fungos endofíticos ganha espaço na comunidade científica, uma vez que eles apresentam atividades biológicas diversas potencialmente promissoras. Este trabalho descreve a investigação química e biológica da biomassa produzida pelo fungo *Glomerella cingulata*. O endófito foi cultivado em arroz com subsequente obtenção da biomassa fúngica seguida da obtenção do extrato etanólico que apresentou distintas fases, incluindo um precipitado e uma fase oleosa. O precipitado foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , o que permitiu a elucidação estrutural do composto como dulcitol. A fase oleosa foi submetida a reações de derivatização e analisada via Cromatografia a Gás acoplada com Espectrometria de Massas (CG-EM), o que permitiu identificar dois ácidos graxos fúngicos, os ácidos margárico e pentadecanoico. Além disso, foram realizados ensaios biológicos com a fase oleosa, que apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em uma concentração inibitória mínima de $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Fungo Endofítico, Fase Oleosa, Atividade Antibacteriana



INTRODUÇÃO

A comunidade científica busca através dos produtos naturais novas formas de combater a resistência bacteriana. Nesse sentido, os compostos produzidos pelo metabolismo secundário dos fungos endofíticos podem servir de precursores para o desenvolvimento de biofármacos antibacterianos (SPECIAN, 2014, p. 345) devido a produção de compostos bioativos com estruturas químicas únicas e complexas (GUNATILAKA, 2006, p. 509; ZHAO et al., 2010, p. 7961). Entre as possibilidades de desenvolver fármacos mais eficazes, pesquisadores buscam aumentar a potência antimicrobiana de uma substância sintética a partir da combinação de metabólitos secundários de fungos (KIM et al., 2018, p. 642; TIWARI, MEENA, TIWARI, 2018, p. 57).

O fungo endofítico *Glomerella cingulata* é um possível candidato ao fornecimento de novos compostos bioativos, uma vez que ele apresenta uma diversidade química de substâncias com atividade antimicrobiana, antiinflamatória e anticancerígena (LIU et al., 2017, p.2609; GUIMARÃES, 2006, p.). Neste trabalho, estudamos o fungo endofítico *G. cingulata* isolado da *Virola surinamensis* a fim de conhecer o seu potencial químico e biológico.

OBJETIVOS

Visando ampliar o arsenal de novas substâncias, o presente trabalho apresenta entre seus objetivos a caracterização química do extrato etanólico do fungo endofítico *G. cingulata* por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , e por Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas. Ademais, foram realizados testes da atividade antibacteriana do óleo frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

Reativação do microrganismo

O fungo endofítico *G. cingulata* armazenado na micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMi), na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob o código LaBioMMi 1394, foi reativado em placas de Petri estéreis com meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA).

Cultivo do fungo e preparo do extrato etanólico

O cultivo do fungo foi realizado em 3 kg de arroz parboilizado, divididos igualmente em 30 erlenmeyers de 500



mL, acrescentando 85 mL de água destilada. O arroz foi autoclavado duas vezes em um intervalo de 24 horas durante 15 minutos com temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. O inóculo foi realizado adicionando três fatias do micélio com 5 mm de diâmetro. O cultivo ocorreu de forma estática e duração de 14 dias.

A extração dos metabólitos foi realizada adicionando 150 mL etanol P.A 99,5% em cada erlenmeyer. O material contido nos erlenmeyeres foram triturados e levados para o ultrassom durante 1 hora. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida.

Caracterização química do precipitado por Ressonância Magnética Nuclear

O precipitado formado no extrato etanólico foi purificado através do processo de recristalização com metanol P.A. Para a caracterização química por RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais foram usadas 10 mg de precipitado e 600 μL de D_2O .

Caracterização química da fase oleosa por Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas

O óleo obtido a partir do extrato etanólico foi submetido a reação de

saponificação seguida de derivatização com piridina, hexametildisilano e cloreto de trimetilsilano.

A análise por CG-EM foi realizada em um cromatógrafo a gás (CG-2010) acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM QP2010 Plus) da Shimadzu, coluna capilar Rxi-5ms (10m x 0,10mm x 0,10 μm). O fluxo de hélio empregado foi 41,9 cm/seg e fluxo da coluna 0,41 mL/min. O aquecimento do forno ocorreu com rampa de temperatura de 150°C até 290°C com taxa de aquecimento de 20°C/min durante 13 min. Ao final do método foi empregada uma nova rampa com taxa de aquecimento de 5°C/min até alcançar a temperatura de 320°C permanecendo por 2 min. A temperatura do injetor e da fonte de íons foram de 250°C e 245°C, respectivamente. O modo de injeção aplicado foi *splitless* com razão de 20. Para a identificação dos picos foi utilizada a biblioteca de dados NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*).

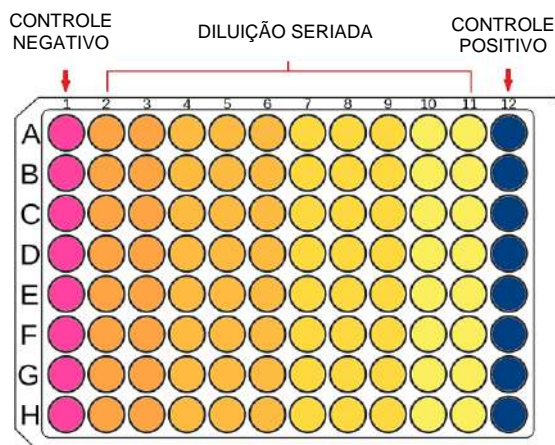
Atividade antibacteriana

Para os ensaios antibacterianos foi utilizada a metodologia da concentração inibitória mínima (CIM). Neste ensaio foi preparada uma solução da fase oleosa e dimetilsulfóxido (DMSO) com concentração de 10 mg.mL⁻¹. A partir de

cálculos de diluição seriada, obteve-se os valores das concentrações correspondentes a cada poço da placa de Elisa.

Na coluna 1 da placa de Elisa foi feito o controle do meio, e a coluna 12 o controle do meio mais a bactéria (Figura 1). Para as colunas 2-11 foi realizada a adição de 50 μ L de MH e 50 μ L dos extratos a fim de obter-se um volume final de 200 μ L (OLIVEIRA et al., 2011).

Figura 1: Placa de Elisa.



Após a diluição seriada, foi adicionado 10 μ L da suspensão padrão de *S. aureus* ATCC 6538, *S. enterica*, *L. monocytogenes* e *E. coli* 042 com turbidez equivalente a 0.5 da escala de McFarland.

As placas foram incubadas em estufa com temperatura constante em 37°C por 24 horas. Depois desse período foi adicionado 10 μ L de resazurina, e incubado novamente por mais 24 horas.

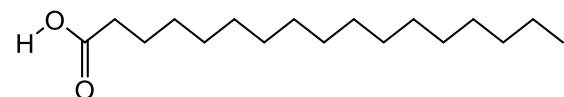
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análise cromatográfica da fase oleosa obtida no extrato etanólico

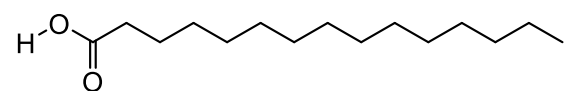
A partir do cromatograma de íons totais foi possível observar a presença dos ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados na fase oleosa do extrato etanólico.

Ao comparar os metabólitos do meio de cultivo com os metabólitos da fase oleosa do extrato etanólico, observou-se que houve produção de dois ácidos distintos, o ácido margárico e o ácido pentadecanoico.

Figura 2: Estruturas dos ácidos graxos identificados na fase oleosa.



Ácido Margárico



Ácido Pentadecanoico

Os ácidos identificados no óleo são encontrados em outras espécies de fungos endofíticos, como o *Penicillium citrinum* (RIPARDO FILHO, 2015).

O resultado obtido contribui para o conhecimento dos constituintes químicos do *G. cingulata*.

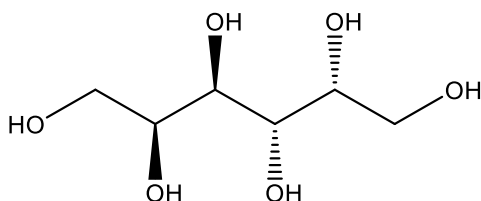
Análise do precipitado por RMN

O precipitado apresentou-se na forma de um sólido branco cristalino (8 g), solúvel apenas em água.

Os dados do espectro de RMN de ^1H mostraram deslocamentos químicos entre δ_{H} 3,50 a 3,65 característicos de hidrogênios ligados a carbonos hidroxilados, comuns em unidades de açúcar. Além disso, a ausência de um duplete em δ_{H} 5,10, característico de hidrogênios anoméricos, indica que o composto possui uma cadeia aberta.

Com os dados do espectro de RMN de ^{13}C , observamos a presença de três sinais, que comparados com os dados obtidos com os da literatura, conclui-se que os sinais do RMN de ^1H e de ^{13}C do precipitado são compatíveis com os sinais do dulcitol.

Figura 3: Estrutura química do dulcitol.



Concentração inibitória mínima (CIM) da fase oleosa

Nos ensaios antibacterianos, o óleo apresentou uma CIM de 1,250 mg.mL⁻¹ frente às todas bactérias testadas. Este resultado mostra que o

óleo apresenta atividade antimicrobiana, entretanto em concentrações superiores. Isto implica que deve ser realizado um processo de purificação ou isolamento dos metabólitos responsáveis por essa atividade a fim de acentuar e melhorar o resultado da atividade antimicrobiana.

CONCLUSÃO

A caracterização química da fase oleosa do extrato etanólico por CG-EM possibilitou a identificação de dois ácidos graxos produzidos pelo metabolismo do próprio fungo endofítico. Com relação ao dulcitol, sua identificação foi realizada apenas por meio de RMN de ^1H e de ^{13}C , pois trata-se de um metabólito conhecido dos fungos e já registrado na literatura.

A atividade antibacteriana da fase oleosa, apresentou um resultado não desprezível (1,250 mg.mL⁻¹) frente aos micro-organismos utilizados, principalmente contra a *E. coli* e a *S. aureus*, que são bactérias de grande resistência.

AGRADECIMENTOS

Ao PPGQ-UFSCar, Procad-Amazônia – CAPES, IFMA, Fapema.

REFERÊNCIAS

GUIMARÃES, D. O. (2006). *Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a Vigueira arenaria*



(*Asteraceae*). (Dissertação de Mestrado).
Ribeirão Preto – São Paulo. Brasil.

GUNATILAKA, L.A.A. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence (2006). *Journal Natural Products*, 69, 509-526.

KIM, C. HESEK, D. LEE, M. MOBASHERY, S. (2018). Potentiation of the activity of β -lactam antibiotics by farnesol and its derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 28, 642–645.

Liu, Y.; Li, Y.; Liu, Z.; Li, L.; Qu, J.; Ma, S.; Chen, R.; Dai, J.; Yu, S.. Ma, R. Chen, J. Dai and S. Yu (2017). Sesquiterpenes from the endophyte *Glomerella cingulata*, *Journal Natural Products*, 80, 2609-2614.

Oliveira Júnior, R. S.; Constantin, J.; INOUE, M. H. (2011). *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. 1. ed. Curitiba: Omnipax

Ripardo Filho, H. S. (2015). *Estudo químico e de atividade antioxidante e antimicrobiana de Moutabea guianensis Aubl. e da biomassa produzida pelo fungo endofítico Penicillium citrinum associado à espécie*. (Tese Doutorado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará. Brasil

SPECIAN, V. (2014). Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 16, 345-351.

Tiwari, V.; Meena, K.; Tiwari, M. (2018). Differential anti-microbial secondary metabolites in different ESKAPE pathogens explain their adaptation in the hospital setup. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 57– 65.

Zhao, J.; Mou, Y.; Shan, T.; Li, Y.; Zhou, L., Wang, M.; Wang, J. (2010). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, 15, 7961–7970.

Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas



C. 28 Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas

Tannat: importancia enológica y valor como componentes funcionales del vino Autor:

Curbelo, Romina. rominacurbelo12@gmail.com

Profesor guía: Dellacassa, Eduardo. edellac@fq.edu.uy

Universidad de la República (UdelaR)

Resumen

Los fenoles son responsables de algunas de las principales propiedades organolépticas del vino, provienen de diversas partes de la uva y se extraen durante la fase de fermentación/maceración. Su concentración en el vino depende de la variedad, madurez, manejo del viñedo y proceso de vinificación. Los fenoles están relacionados con beneficios para la salud. Las uvas de la variedad *Vitis vinífera* cv Tannat presentan concentraciones elevadas de antocianinas en la cáscara con valores que aumentan durante la maduración y donde el contenido de flavan-3-oles en sus semillas es superior al reportado para otras variedades de uva. Actualmente se desarrolla un proyecto que se propone estudiar la evolución de los flavan-3-oles galoileados presentes en las semillas durante la maduración de las uvas Tannat y su impacto en cuanto a su presencia y contenido en los vinos producidos. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la puesta a punto de los protocolos de extracción de polifenoles para semillas utilizando muestras de uvas obtenidas durante las diferentes etapas de maduración, el estudio del perfil fenólico (antocianinas, flavonoles y sus monómeros y oligómeros) mediante HPLC-DAD-MS/MS y la interpretación de los resultados mediante análisis quimiométrico. Para superar la ausencia de estándares comerciales los análisis se interpretaron en modalidad untargeted. En resumen, este trabajo proporciona una amplia caracterización de compuestos polifenólicos individuales en extractos de semillas de uvas de la variedad Tannat durante la maduración.

Palabras clave: *Vitis*, uva, semillas, polifenoles galoileados



Introducción

Los fenoles son responsables de algunas de las principales propiedades organolépticas del vino, provienen de diversas partes de la uva y se extraen durante la fase de fermentación/maceración. Su concentración en el vino depende de la variedad, madurez, manejo del viñedo y proceso de vinificación. Los fenoles están relacionados con beneficios para la salud (CORDER y COL., 2006; DE PASCUAL y COL., 2010; FERNÁNDEZ y COL., 2019). Las uvas de la variedad *Vitis vinifera* cv Tannat presentan concentraciones elevadas de antocianinas en la cáscara con valores que aumentan durante la maduración mientras que el contenido de flavan-3-oles en las semillas de esta variedad es superior al reportado para otras variedades de uva (BOIDO y COL., 2011).

En este trabajo se presentan resultados obtenidos en el desarrollo de un proyecto que se propone estudiar la evolución de los flavan-3-oles galoileados presentes en las semillas durante la maduración de las uvas Tannat y su impacto en cuanto a su presencia y contenido en los vinos producidos (CSIC 2125, 2021). El estudio toma como

antecedentes el hecho de disponer de la información relacionada con la elucidación del genoma de la variedad Tannat (DA SILVA y COL., 2013; DA SILVA, 2016) y, por lo tanto, con el conocimiento de las enzimas involucradas en el proceso de galoileado. Sin embargo, se carece de la información que indique el momento en que se produce la expresión de esas enzimas y la consecuente formación de los polifenoles galoileados.

Objetivos

Puesta a punto de los protocolos de extracción de fenoles para semillas utilizando uvas de la variedad Tannat en diferentes fases de maduración de la uva, el estudio del perfil fenólico (antocianinas, flavonoles y sus monómeros y oligómeros) mediante HPLC-DAD-MS/MS e interpretación de los resultados utilizando análisis quimiométrico.

Materiales y métodos

El desarrollo y la maduración de las bayas de uva es un proceso dinámico que involucra una cascada de cambios bioquímicos. Durante este desarrollo hay dos periodos de crecimiento rápido separados por un periodo de crecimiento sustancialmente menor. Si bien la biosíntesis de muchos compuestos volátiles, responsables de los aromas



varietales, es inducida durante la fase III, no ocurre lo mismo con los taninos en semillas que disminuyen por procesos oxidativos durante esta fase. Esto determina que los taninos se unan a la cubierta de la semilla reduciendo los componentes astringentes dentro de la baya. Los taninos de la piel comienzan a interactuar y unirse con los antocianos y así aumenta el tamaño y la complejidad de los polímeros de taninos.

Al igual que para el trabajo de secuenciación del genoma Tannat, para el caso del estudio de la evolución de los flavan-3-oles galoileados se realizaron 5 muestreos de bayas a lo largo de su desarrollo:

- a 5 semanas de la floración (la fruta está verde y sus partes no están desarrolladas)
- al comienzo del envero (muestreando solo bayas verdes)
- al final del envero (muestreando bayas coloreadas)
- a las 20 semanas de la floración (entre el envero y la madurez total)
- en la cosecha.

Se tomaron como referencia los viñedos experimentales del clon 717 (portainjerto 1103 paulsen) variedad

Tannat implantados y cultivados en un viñedo comercial en Montevideo, Uruguay. Brevemente, los protocolos aplicados implican:

-las semillas y las cáscaras se separaron manualmente. Las semillas se liofilizaron y se calculó su humedad por diferencia de peso antes y después de la liofilización. La extracción de semillas se realizó adaptando el método propuesto por GARCÍA-MARINO y COL. (2010).

-para el análisis por HPLC-DAD-MS se utilizó un cromatógrafo HPLC acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Shimadzu LCMS-8040. El sistema LC se conectó a la sonda del espectrómetro de masas a través de la celda UV. El espectrómetro de masas estaba equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica, utilizando una interfase de ionización por electrospray (ESI). Para las condiciones de análisis por HPLC-DAD-MS se trabajó utilizando como información de partida el método publicado por BOIDO y COL. (2011), con modificaciones (fase estacionaria y solventes de corrida) que se desarrollaron en este periodo. Los espectros de masas se registraron en modo de iones positivos.



Sin embargo, la información disponible sobre la composición de los flavan-3-oles en semillas, especialmente en sus formas galoileadas, es muy escasa por lo que necesariamente se trabaja en la modalidad no dirigida (untargeted) ya que no se dispone de todos los estándares necesarios. En este sentido, el grupo italiano con el que se trabaja en colaboración (Chimica degli Alimenti del laboratorio dell'Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare de la Fondazione Mach, San Michele a'Adige, Trento, Italia) ha recibido muestras de extractos que les fueron enviados para confirmar algunas estructuras por espectrometría de masa de alta resolución (UHPLC-MS/Orbitrap).

Resultados y discusión

El trabajo realizado permite disponer de información acerca de los perfiles polifenólicos (HPLC-DAD-MS/MS) presentes en cáscaras y semillas provenientes de muestreos realizados durante dos vendimias (2020-2021 y 2021-2022). A partir de información previa publicada por integrantes del grupo de investigación y disponible en la literatura, se ha logrado ordenar una base de datos (ordenes de elución, longitudes de onda para los máximos característicos de los espectros UV-Vis, espectrometría de masas) para este tipo de compuestos. La

que resulta ser específica para su aplicación en uvas y vinos, y genérica para parte de algunos componentes presentes en otras matrices (frutas, flores, otras partes de plantas). En esta etapa, los análisis se presentan en modalidad untargeted. La cuantificación, mediante estándares comerciales, se encuentra en procesamiento.

La diversidad de compuestos polifenólicos que pueden ser encontrados en las uvas de diferentes variedades de Vitis representa un número muy elevado y difícil de considerar globalmente (ALLEGRO y COL., 2021) (Figura 1). Estos aspectos se pueden verificar también para la variedad Tannat (CURBELO y COL., 2021, 2022).

Por otra parte, la información disponible enfatiza la importancia de una clase de polifenoles, el galato de epigallocatequina, que es capaz de inhibir competitivamente una neurotoxina conocida por inducir una enfermedad similar al Parkinson (AQUILANO y COL., 2008). El galato de epigallocatequina también puede proteger las neuronas al activar las vías de señalización de supervivencia celular (ROSSI y COL., 2008). Por lo tanto, y en consideración de la importancia enológica y, en relación con el concepto de “vino y salud”,

enfocaremos aquí los resultados sobre la información obtenida para los compuestos galoileados en particular. A su vez, y en tanto se verifican las proporciones relativas de cada uno de los compuestos de interés (mediante el uso de estándares), se ha tomado como referencia resultados previos que indican que la uva de *Vitis vinifera* cv Tannat presenta los contenidos más elevados de compuestos galoileados se encuentran presentes en las semillas (BOIDo y COL., 2011).

De este modo, y como ejemplo, en el Anexo, Figura 2, se muestra la dinámica de formación de compuestos galoileados para semillas de uvas de la variedad Tannat durante su maduración.

La Figura 2a muestra la frecuencia con que los diferentes derivados galoileados se presentan en la uva durante su maduración. Claramente los dímeros, trímeros y tetrámeros son las formas en que se produce con más frecuencia el proceso de galoileado de las procianidinas.

En paralelo, la Figura 2b permite estimar que los valores más elevados de los derivados galoileados más frecuentes se presentan durante el preverano y envero de la uva para la variedad Tannat.

CONCLUSIONES

En resumen, este trabajo proporciona una amplia caracterización de compuestos polifenólicos individuales en extractos de cáscaras y semillas de uvas maduras. Las variaciones en la concentración de monómeros no fueron significativas durante la maduración, pero se observó un aumento en las formas de dímeros y oligómeros. Los compuestos galoileados disminuyen durante la maduración probablemente debido a una disminución del galato de epicatequina.

La información obtenida será utilizada en la vendimia 2022-2023 para dar soporte al trabajo de caracterización de la expresión de los dos genes candidatos codificantes para la enzima Epicatequin Galoil Transferasa (ECGT) (VIT_03s0088g00260 y VIT_03s0091g01290) en momento de maduración que presente el mayor contenido de compuestos galoileados. Con la correlación entre los resultados de niveles de expresión relativa y análisis metabólicos se evaluará cuál de los dos genes es el responsable de los altos contenidos de compuestos galoileados.

Por otra parte, el hecho de que ya se disponga de evidencia que indica que



los contenidos más elevados de compuestos polifenólicos galoileados no coinciden con el momento de cosecha (maduración de la uva) plantea un problema a resolver para intentar mejorar su presencia en el vino

Bibliografía

ALLEGRO G., PASTORE C., VALENTINI G., FILIPPETTI I. (2021). *The evolution of phenolic compounds in vitis vinifera l. Red berries during ripening: analysis and role on wine sensory-a review*. Agronomy v. 11, n. 999.

<https://doi.org/10.3390/agronomy110>

50999

AQUILANO K., BALDELLI S., ROTILIO G., CIRIOLO M.R. (2008). *Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and antiinflammatory activity of polyphenols*. Neurochemical Research v. 33, pp. 2416-2426.

BOIDO E, GARCÍA MARINO M, DELLACASSA E, CARRAU F, RIVAS GONZALO JC, ESCRIBANO BAILÓN MT. (2011). *Characterization and evolution of grape polyphenol profiles of Vitis vinifera L. cv. Tannat during ripening and vinification*. Australian Journal of Grape and Wine Research, v17, pp. 383-393.

CORDER R., MULLEN W., KHAN N.Q., MARKS S.C., WOOD E.G., CARRIER M.J., CROZIER A. (2006). *Red wine procyanidins and vascular health*. Nature v. 444, pp. 556.

CORY H., PASSARELLI S., SZETO J., TAMEZ M., MATTEI J. (2018) *The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review*. Frontiers in Nutrition v. 5, n. 87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>

CSIC 2125. (2021). *Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas Tannat: importancia enológica y valor como componentes funcionales en el vino*. Proyecto I+D. UdelaR.

CURBELO R., RODRIGUEZ L., DAVYT D., CARRAU F., FARIÑA L., BOIDO E., DELLACASSA E. (2021). *Estudio de fenoles en Vitis: un modelo de trabajo para estudiar la metabolómica de V. vinifera cv. Tannat*. Séptimo Encuentro Nacional de Química (ENACUI 7). Montevideo, Uruguay.

CURBELO R., DAVYT D., NARDIN T., LARCHER R., CARRAU F., CONIBERTI A., FARIÑA L., DA SILVA C., BOIDO E., DELLACASSA E. (2022). *Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas Tannat:*



importancia enológica y valor como componentes funcionales en el vino. 43^o Congreso Mundial de la Viña y el Vino (OIV). Ensenada, México.

DA SILVA C. (2016). *Secuenciación masiva del genoma y transcriptomas de Vitis vinifera cv. Tannat: polifenoles durante el desarrollo del grano de uva.* Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias-UdelaR. Montevideo, Uruguay.

DA SILVA C., ZAMPERIN G., FERRARINI A., MINIO A., DAL MOLIN A., VENTURINI L., BUSON G., TONONI P., AVANZATO C., ZAGO E., BOIDO E., DELLACASSA E., GAGGERO C., PEZZOTTI M., CARRAU F., DELLEDONNE M. (2013). *The high polyphenol content of Vitis vinifera cv. Tannat berries is conferred mostly by genes that are not shared with the reference genome.* Plant Cell v. 25, pp. 4777-4788.

DE PASCUAL T.S., MORENO DA, GARCÍA VIGUERA C. (2010). *Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence.* International Journal of Molecular Science v. 11, pp. 1679-1703.

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ A.M., IRIONDO DEHOND A., DELLACASSA E., MEDRANO FERNANDEZ A., DEL CASTILLO M.D. (2019). *Assessment of*

antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and antiinflammatory properties of a Tannat winemaking by-product. European Food Research and Technology v. 245, pp. 1539-1551.

GARCÍA MARINO M., BOIDO E., DELLACASSA E., CARRAU F., RIVAS GONZALO J.C., ESCRIBANO BAILÓN M.T. (2010). *Evolution of the polyphenolic profile of grapes Vitis vinifera L. cv. Tannat during fruit ripening.* Polyphenols Communications. Montpellier, Francia.

ROSSI L., MAZZITELLI S., ARCIELLO M., CAPO C.R., ROTILIO G. 2008. *Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease.* Neurochemical Research v- 33, pp. 2390-2400.

Financiamiento

Proyecto CSIC I +D 2125, Dinámica biosintética de polifenoles galoileados en la maduración de uvas Tannat: importancia enológica y valor como componentes funcionales en el vino.

Agradecimiento

Agradezco a la CSIC y a los componentes del eje temático "C", Ciencias Exactas, número "28", Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones, de las XXIX Jornadas Jóvenes Investigadores de la Asociación de



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022

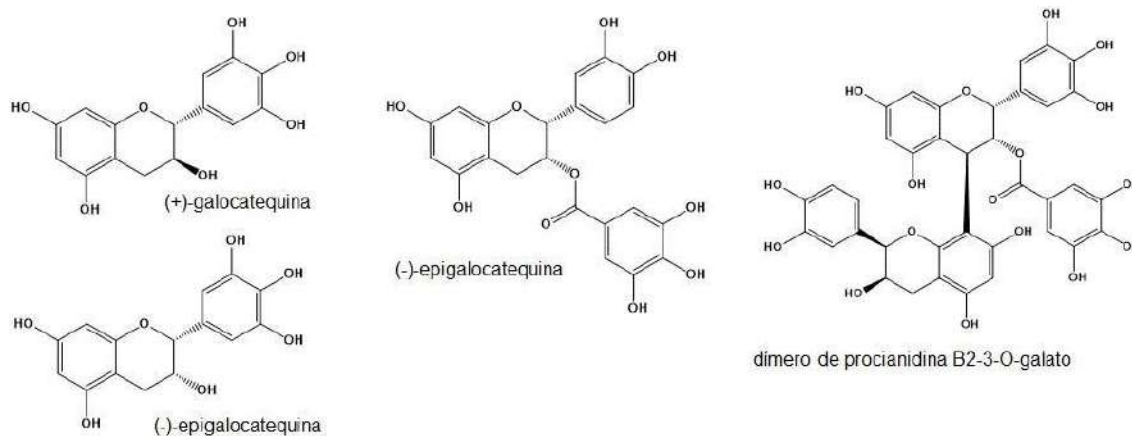


UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA

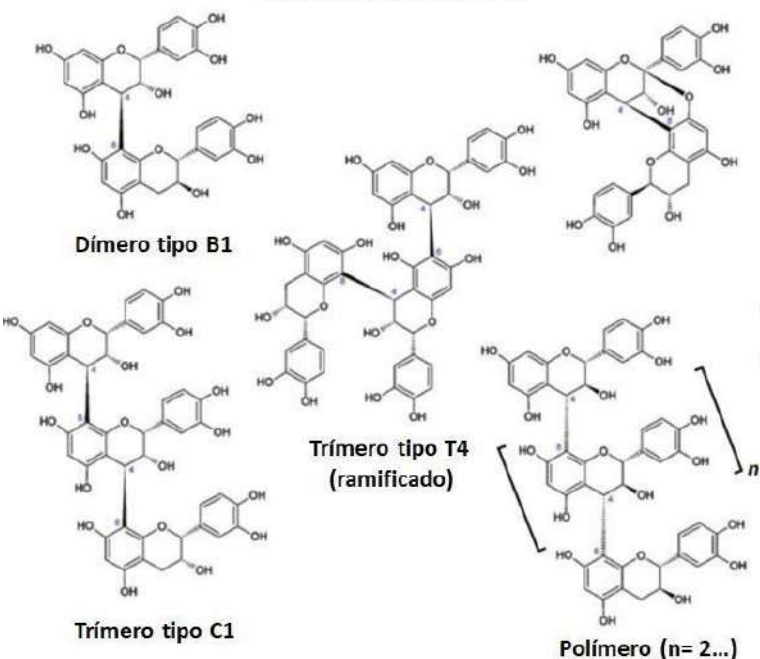


Universidades Grupo Montevideo
(AUGM).

Figura 1. Principales grupos de compuestos polifenólicos estudiados



PROANTOCIANIDINAS



**PIGMENTOS
POLIMERICOS**

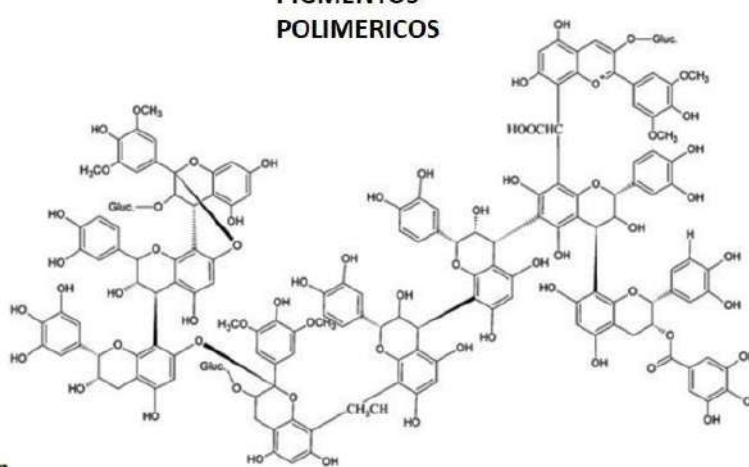
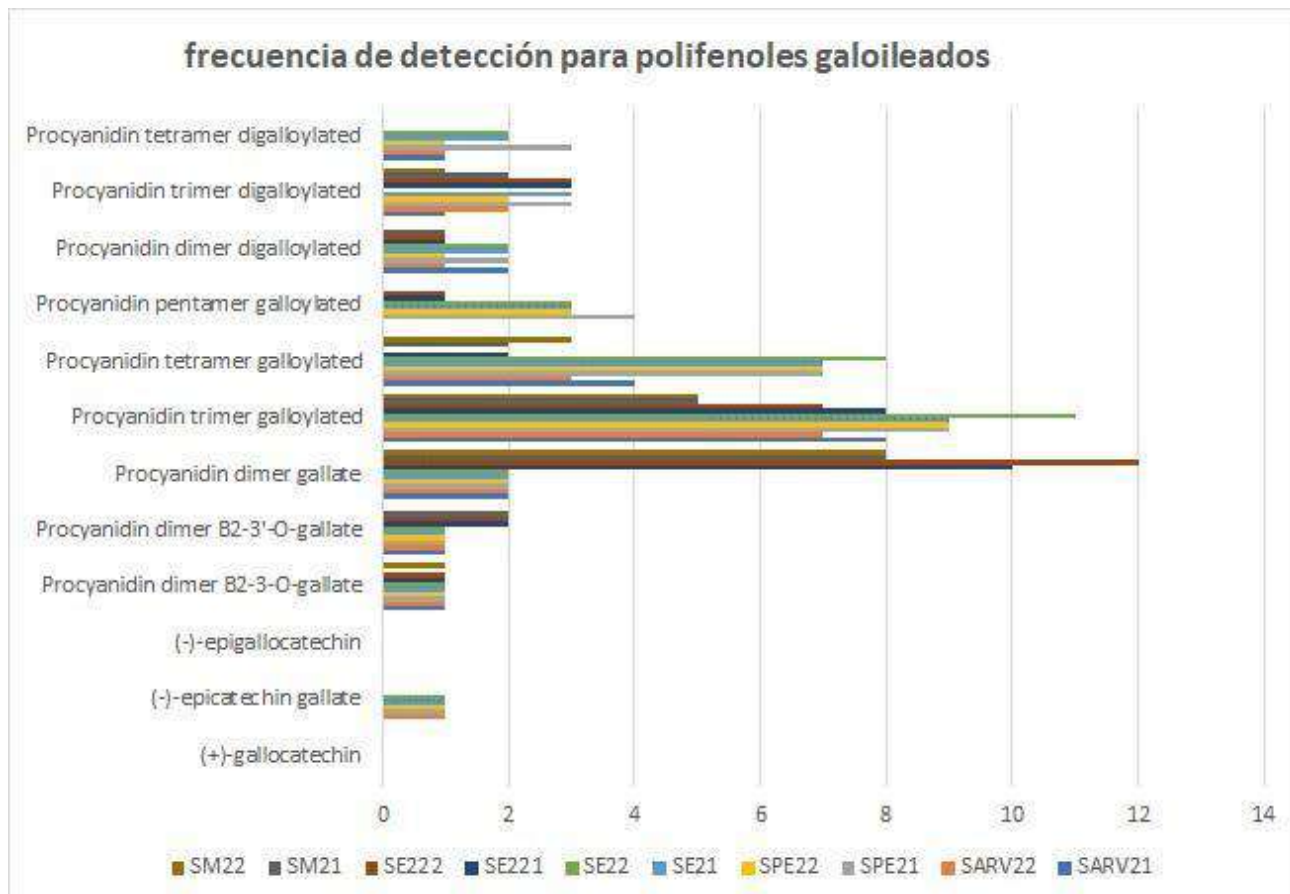


Figura 2. Importancia relativa de los polifenoles galoileados presentes en las semillas de uva de *Vitis vinifera* cv Tannat durante el proceso de maduración

Figura 2a.



SARV21, semillas colecta uvas tamaño arveja 2021

SARV22, semillas colecta uvas tamaño arveja 2022

SPE21, semillas colecta uvas pre-verano 2021

SPE22, semillas colecta uvas pre-verano 2022

SE21, semillas colecta uvas verano 2021

SE22, semillas colecta uvas verano 2022

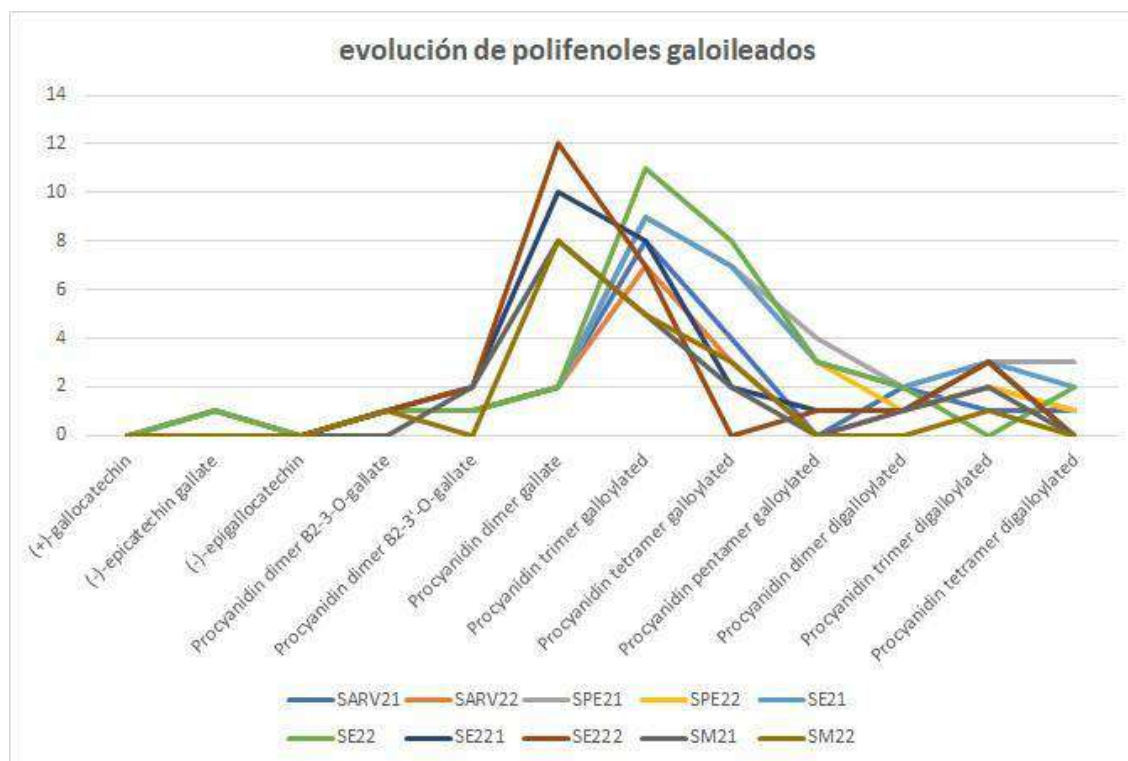
SE221, semillas colecta uvas a las 20 semanas de la floración (entre el verano y la madurez total) 2021

SE222, semillas colecta uvas a las 20 semanas de la floración (entre el verano y la madurez total) 2022

SM21, semillas colecta uvas maduras (vendimia) 2021

SM22, semillas colecta uvas maduras (vendimia) 2022

Figura 2b.



Síntesis de Derivados Esteroidales Bioactivos vía Reacciones Multicomponente de Ugi- Smiles.
Nueva Ruta Sintética hacia 3-aminonitroestronas N,N-disustituídas con Potencial Actividad
Antiproliferativa y Antiviral.



C.28. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Síntesis de Derivados Esteroidales Bioactivos vía Reacciones Multicomponente de Ugi-Smiles. Nueva Ruta Sintética hacia 3-aminonitroestronas N,N-disustituídas con Potencial Actividad Antiproliferativa y Antiviral.

Autor: Attorresi, Cecilia Inés; cecilia.attorresi@gmail.com

Co-autores: Barquero, Andrea Alejandra; abarquer1970@gmail.com; Bonifazi, Evelyn; ebonifazi@qo.fcen.uba.ar; Falcone, Bruno Nicolás; bnfalcone@gmail.com; Gola, Gabriel Francisco; ggola@qo.fcen.uba.ar.

Profesor Tutor: Ramírez, Javier Alberto; jar@qo.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires (UBA)

Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar la reacción multicomponente de Ugi-Smiles (US) en esteroides aromáticos derivados de la estrona. En esta reacción un fenol ácido, una amina, un carbonilo y un isonitrilo se incorporan en un único paso de reacción para dar derivados N-arilcarboxiamidas. Hasta el momento no hay registro de su aplicación en productos naturales de origen esteroide, por lo que es una alternativa para la obtención de 3-aminoestronas N,N-disustituídas, compuestos con propiedades biológicas como estrogénicos, antiangiogénicos y antitumorales pero cuya síntesis por otras vías acarrea varios pasos de reacción y la utilización de materiales de partida poco disponibles.

Se utilizó estrona para obtener los derivados nitrados sobre los que ensayar la reacción de US. El estudio de las condiciones de reacción implicó pruebas con distintos solventes variando la temperatura y el número de equivalentes de reactivos. Se observó que en etanol absoluto a 70°C y con 2 eq. de cada reactivo, se obtenían eficientemente los productos US para el caso de la 2-nitroestrona. Se generó una biblioteca de trece derivados sobre los cuales se realizaron ensayos antivirales y antiproliferativos, donde dos compuestos mostraron potencial actividad. Sin embargo, no se obtuvo los análogos de US para la 4-nitroestrona en ninguna de las condiciones estudiadas por lo cual se realizaron estudios teóricos preliminares para explicar la diferencia de reactividad.

Palabras clave: Esteroides Aromáticos, Ugi-Smiles, Antiproliferativos-Antivirales.



Introducción

Los esteroides son una clase de biomoléculas lipídicas ampliamente presentes en organismos vivos y que desempeñan importantes funciones biológicas, como por ejemplo reguladores hormonales o componentes estructurales de las células de los tejidos (Manuel, 2016, y Bohl et al., 2018). Todos los esteroides tienen un esqueleto común de 3 anillos de 6 miembros y un anillo de 5 miembros fusionados. Este esqueleto rígido de 4 anillos fusionados se puede utilizar como plataforma sobre la cual incorporar diversidad química y quiralidad con el objetivo de generar nuevos compuestos bioactivos.

Desde el punto de vista sintético, en las últimas décadas se desarrollaron diversas metodologías para la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas novedosas. Dado que los factores químicos estructurales necesarios para obtener compuestos con una actividad biológica potente y específica aún no se comprenden en su totalidad, en los últimos años se desarrolló una metodología alternativa a la tradicional "síntesis orientada a objetivo biológico" y es el screening fenotípico de bibliotecas de compuestos (Chen et al., 2012 y Lee et al., 2013). Esta metodología está basada en

ensayos celulares o en organismos modelos utilizando colecciones de familias de compuestos con relevancia biológica (por ej. esteroides) pero con una gran diversidad química estructural. En este contexto, las reacciones multicomponente (RMC) aparecen como herramientas versátiles para explorar de forma más eficiente el espacio químico realizando pequeños cambios en los sustratos que generan una gran diversidad química.

En las RMC tres o más reactivos reaccionan juntos bajo las mismas condiciones de reacción para dar productos complejos y diversos desde el punto de vista estructural. Como todos los átomos se incorporan en un único paso de reacción, las RMC se consideran una herramienta eficaz y altamente convergente que puede ayudar a superar los costos sintéticos asociados con la introducción de diversidad estructural.

Existen muchos ejemplos de RMC sobre esteroides alifáticos, siendo la reacción de Ugi de cuatro componentes (U-4CR) una de las más utilizadas (Reguera et al., 2019). Esta es probablemente la RMC más conocida e implica la reacción entre un compuesto carbonílico, una amina, un ácido carboxílico y un isonitrilo para dar en un único paso de reacción una α -aminoacilamida (Dömling et al., 2012).

Pero más allá de estas aplicaciones, la herramienta RMC no ha sido muy explorada en esteroides aromáticos en particular (Reguera et al., 2019), los cuales son una fuente interesante para la generación de diversidad química en la búsqueda de nuevos derivados bioactivos. Por ejemplo, la estrona, uno de los pocos esteroides aromáticos de origen natural, donde la aromatización es en el anillo A, es un excelente material de partida para generar diversidad química ya que se conocen algunos derivados de 3-N-estrona (como 3-amina o 3-amida de estrona) con actividad estrogénica, antiangiogénica y antitumoral (Suwandi et al., 2009 y Radu et al., 2002). En la actualidad, la síntesis de estos derivados acarrea varios pasos de reacción y la utilización de materiales de partida poco disponibles o costosos. Esto se demuestra con la escasa literatura disponible sobre el tema, la cual incluye catálisis foto-redox (Dagousset et al., 2017), acoplamientos CH/NH electrooxidativos (Liu et al., 2019), catálisis de Pd (Taeufer et al., 2020) ó reacciones radicalarias (Lardy et al., 2019).

A partir de nuestro interés en el uso de las RMC como paso clave en la diversificación estructural de esteroides, pensamos que la reacción multicomponente de Ugi-Smiles (US) podría utilizarse como una vía

alternativa para la síntesis de 3-aminoestronas.

Esta reacción reportada por primera vez por El Kaïm et al. (2005) es una variante de la reacción de Ugi, donde el componente carboxílico se reemplaza por un fenol ácido (por. ej. nitrofenol) generando N-aril-carboxiamidas (Figura 1).

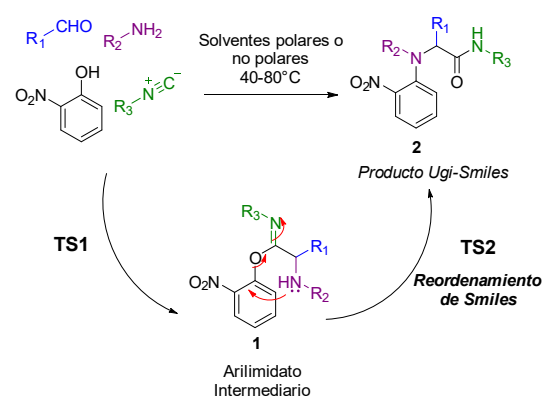


Figura 1. Reacción de Ugi-Smiles

En la reacción de US los cuatro componentes reaccionan en una primera etapa para dar un derivado tipo O-arilo imidato (1) que sufre, en una segunda etapa, un reordenamiento de Smiles que conduce al producto N-aril-carboxiamida 2. Esta reacción funciona bien para una amplia variedad de sustratos, especialmente en lo que respecta al componente ácido. Además de los o- y p-nitrofenoles con diferentes sustituyentes (El Kaïm et al., 2010), también se han utilizado otros componentes ácidos como

fenoles heteroatómicos (El Kaïm et al., 2007), tiofenos (Abdessalem et al., 2017), así como otros sustratos azufrados (Sidhoum et al., 2018 y Ramezanpour et al., 2018), pero nunca ha sido reportada en esteroides aromáticos. Debido a esto, la aplicación de la RMC de US se manifiesta como una implementación original para generar derivados de 3-N-aril carboxamida-estrona con grupos funcionales amina y amida incorporados en un solo paso de reacción y a partir de un material de partida de fácil preparación.

En este trabajo describimos el primer uso de la reacción multicomponente de Ugi-Smiles para la síntesis de 3-aminonitroestronas N,N-disustituidas en el cual hemos explorado las condiciones óptimas de reacción, el alcance del procedimiento sintético y hemos discutido los efectos particulares del esqueleto esteroideal sobre el desarrollo de la reacción (Figura 2). Además, a partir de una evaluación fenotípica preliminar de los compuestos sintetizados, se observó que algunos de ellos ejercen actividades biológicas in vitro prometedoras como agentes antiproliferativos y antivirales.

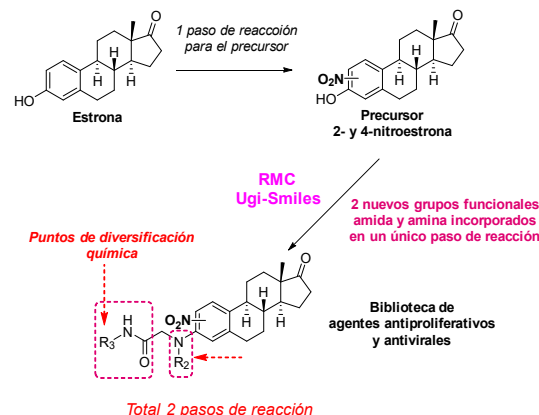


Figura 2. Síntesis de 3-N-estronas disustituídas vía reacción de Ugi-Smiles en esteroides aromáticos.

Objetivos

- 1- Estudiar la aplicabilidad de la reacción multicomponente de Ugi-Smiles (US) en esteroides aromáticos derivados de la estrona (2- y 4-nitroestrone) en lo que respecta al alcance químico y la optimización de las condiciones de reacción.
- 2- Obtención de una biblioteca de 3-amino-nitroestronas N,N-disustituidas para su estudio biológico como potenciales agentes antiproliferativos y antivirales.

Materiales y métodos

Todos los reactivos son de calidad analítica y se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. Los solventes se adquirieron de proveedores locales y se destilaron previo a su uso. La cromatografía de capa



delgada (TLC) se llevó a cabo utilizando placas pre-revestidas de sílica gel 60 F254 de Merck y los compuestos se visualizaron mediante detección al UV (254 nm) y revelado con ácido sulfúrico en etanol. La purificación de todos los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 0,040-0,063 mm de Merck.

Para la caracterización estructural de los productos obtenidos se midieron los espectros de RMN en un Bruker AM-500 (500 MHz para ^1H y 125,1 MHz para ^{13}C) y los espectros de masa (ESI-HRMS) en un Bruker micrOTOF-Q II. Las asignaciones estructurales se confirmaron mediante espectros de RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC y ROESY).

Síntesis de los materiales de partida/sustratos iniciales

Los nitroesteroides se sintetizaron a partir de estrona comercial siguiendo el protocolo de Tomson y Horwitz (1959). Etilisocianoacetato, ciclohexilisonitrilo, t-butylisonitrilo y las aminas utilizadas son de origen comercial mientras que el resto de los isonitrilos fueron sintetizadas a partir de la amina correspondiente según un procedimiento ya establecido (Rivera y Wessjohann, 2006).

Protocolo general para la reacción de US

Se disolvieron la amina seleccionada (0,50 mmoles) y formaldehído (0,50 mmol, 88 μl , solución acuosa al 37%) en 0,3 ml de etanol absoluto y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Esta mezcla se vertió sobre una suspensión del derivado de nitroestrone (0,25 mmol en 0,5 ml de etanol). Luego, se añadió el isonitrilo (0,5 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó a 70°C durante 48 h. Finalmente, la mezcla de reacción se concentró al vacío para dar un crudo que luego se purificó por cromatografía en columna con gradiente de éter de petróleo/acetato de etilo obteniéndose los productos **5a-5m**.

Métodos computacionales

Los cálculos de DFT fueron realizados con el programa Gaussian 09 (Frisch et al., 2013) utilizando los funcionales M06-2X (Zhao y Truhlar, 2008). Se utilizó una cuadrícula de integración ultrafina para todos los cálculos. Las optimizaciones se llevaron a cabo con la base 6-31G (d) fijada en etanol utilizando el modelo de solvente IEFPCM (Scalmani y Frisch, 2010). Las energías single point (Simón y Goodman, 2011) de las estructuras optimizadas se obtuvieron utilizando el funcional M06-2X con el conjunto de bases de valencia triple zeta polarizada def2-TZVPP36 (Weigend y Ahlrichs, 2005).



Ensayos antiproliferativos

Las células HT29 y A549 se obtuvieron de ATCC (Rockville, MD, EE.UU.). Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.), al cual se le agregó suplemento de suero bovino fetal al 10% (Gibco) y 50 µg / ml de gentamicina. Las células de cultivo se mantuvieron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C.

La viabilidad celular se determinó mediante ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich Co). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1 x 10⁴ células / pocillo y se añadieron soluciones que contenían diferentes concentraciones del compuesto a ensayar. Cada ensayo se realizó por triplicado. Después de 72 h de incubación, se añadió solución de MTT (5 mg / mL en agua destilada) a las células en el medio de cultivo y las placas se incubaron durante 2 hs. a 37 °C. Luego, el formazán producido se solubilizó mediante el agregado de 0,2 ml de etanol y los valores de absorbancia se midieron inmediatamente usando un lector de placas ELISA (Eurogenetics MPR-A 4i) a una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Los resultados para cada cultivo celular tratado se normalizaron como un porcentaje de absorbancia respecto a los

controles no tratados. Las desviaciones estándar (SDs) de los datos normalizados se calcularon a partir de las SDs de las células tratadas y los controles y los valores medios de las absorbancias correspondientes (usando datos de tres experimentos independientes).

Ensayos antivirales

Se infectaron células Vero cultivadas en placas de 96 pocillos con HSV-1 (cepas KOS o B2006) o VSV. Después de 1 hora de adsorción a 37 °C, se eliminó el inóculo y se añadió medio que contenía diferentes concentraciones de los compuestos 5a-m, por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta que se observó microscópicamente una muerte celular del 100% en las células del control infectadas sin tratar. Los sobrenadantes correspondientes a esos triplicados se recogieron después de la lisis celular, llevada a cabo mediante tres ciclos de congelación y descongelación, y se combinaron. Los rendimientos de virus se valoraron mediante ensayo de placa. Con fines comparativos, se probó el ACV como control positivo contra HSV-1.

Ensayo virucida

A una suspensión del virus HSV-1 se lo incubó previamente con el compuesto "hit" 5b (100 µM) durante 1 h a 37°C. Luego se

titula la infectividad restante como se comentó previamente.

Ensayo a diferentes etapas de infección:
Método de plaqueo directo

Células Vero crecidas en monocapa fueron expuesta al compuesto "hit" **5b** a una concentración de 5 y 10 μM en diferentes estas: antes de la adsorción viral, durante la adsorción viral y luego de la infección tanto con HSV-1 como con HSV-2.

Etapa pre-adsorción: las células se incuban con el compuesto "hit" durante 1 h a 37°C. Luego, se agrega el inóculo de virus y se incuba 1 h a 37°C. Finalmente, se realiza un ensayo de placa directo.

Durante la adsorción: las células se incuban con el inóculo de virus y el compuesto "hit" durante 1 h a 37°C. Finalmente, se realiza un ensayo de placa directo.

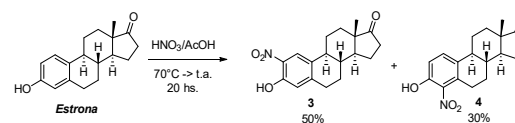
Etapa postratamiento: las células se incuban junto con el inóculo del virus durante 1h a 37°C. Finalmente, se realiza un ensayo de placa directo junto con el compuesto "hit" disuelto en el medio.

Para determinar la cantidad y el área de placa promedio en las distintas etapas en comparación con el control se analizaron las imágenes con el software Image-Pro Plus 6.0.

Resultados y Discusión

Estudio de la reacción de Ugi-Smiles en derivados de nitroestronea y síntesis de biblioteca de 3-aminonitroestronea N, N-disustituídas.

Los compuestos ácidos de partida, 2-nitroestronea (**3**) y 4-nitroestronea (**4**), se obtuvieron mediante nitración de la estronea (disponible comercialmente) siguiendo un protocolo de literatura (Tomson y Horwitz, 1959).



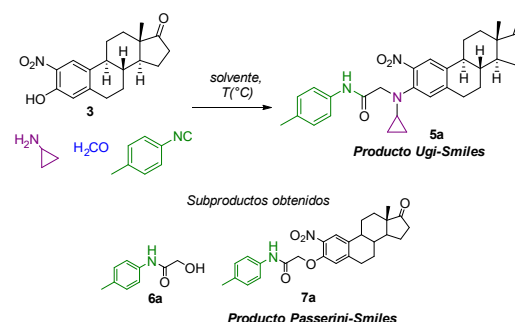
Esquema 1. Síntesis de nitroestroneas.

En un primer ensayo, el compuesto **3** se hizo reaccionar con formaldehído, ciclopropilamina y p-metilbencil isonitrilo en diferentes condiciones. Se sabe que la reacción de Ugi-Smiles puede realizarse tanto en solventes próticos como apróticos con un amplio rango de polaridad (El Kaïm et al., 2007). Sin embargo, en este caso la solubilidad del componente esteroideal generó una restricción adicional al momento de la elección del solvente lo que llevó a excluir del análisis a solventes tradicionales de la reacción de Ugi-Smiles, como es el metanol, por la dificultosa solubilidad en este del material de partida.

Siguiendo este criterio se estudiaron las condiciones óptimas de reacción en etanol y tolueno, solventes que no presentaron dificultad al momento de solubilizar el esteroide.

Por otro lado, generalmente se necesitan temperaturas que oscilan entre los 40 y 80°C, ya que el reordenamiento de Smiles es un paso demandante energéticamente (El Kaïm et al., 2007). Esto se demuestra en el hecho de que cuando la reacción se llevó a cabo en tolueno y etanol a baja temperatura (Tabla 1, filas 1 y 5) no se formó el producto de Ugi-Smiles. Sin embargo, cuando la temperatura se aumentó a 70°C (filas 2 y 6) se observó el compuesto **5a** deseado en ambos solventes. El rendimiento de **5a** se mejoró utilizando dos equivalentes de formaldehído, amina e isonitrilo, pero esto llevó a la formación concomitante del subproducto **6a** (filas 3 y 7), que probablemente se forma a partir de una reacción entre el isonitrilo y el formaldehído (Oaksmith et al., 2004). El mayor incremento en el número de equivalentes también condujo a la formación del compuesto **7a** (Esquema 2) que proviene de la reacción competitiva de Passerini-Smiles donde el componente amina no se incorpora al producto (El Kaïm y Grimaud, 2014). Esta reacción multicomponente compite por los sustratos acídicos y

carbonílicos con la reacción de Ugi-Smiles. Además, se observó la misma tendencia cuando la reacción fue llevada a cabo a temperaturas más altas (Tabla 1, fila 9).



Esquema 2. Reacción de Ugi-Smiles sobre **3** y estructuras de los subproductos **6a** y **7a** obtenidos.

La Tabla 1 resume los resultados de los distintos experimentos y muestra que las mejores condiciones de reacción se dan cuando la misma se realiza en etanol a 70°C, mientras que la formación de subproductos parece estar más favorecida cuando la reacción se realiza en tolueno.

Tabla 1. Optimización de las condiciones de reacción ^a.

Solvente	T (°C)	Eq.	5a ^c	6a ^c	7a ^c
Etanol	40	1	-	-	-
Etanol	70	1	36%	-	-
Etanol	70	2	60%	7%	-

Etolol	70	3	66%	11%	5%
Tolueno	40	1	-	-	-
Tolueno	70	1	15%	-	-
Tolueno	70	2	22%	3%	-
Tolueno	70	3	31%	23%	-
Tolueno	110	2	50%	26%	9%

a. Valores promedios de tres experimentos independientes. b. Relativo al esteroide. c. Rendimiento luego de purificación cromatográfica.

Con las condiciones de reacción optimizadas, y con el fin de explorar el alcance de esta, el compuesto **3** se trató con diferentes aminos, isonitrilos y compuestos carbonílicos obteniéndose una familia de 13 compuestos con una amplia diversidad química (Figura 3).

En términos generales, cuando se usó formaldehído la reacción procedió dando los productos deseados con rendimientos moderados a buenos, lográndose incorporar una variedad de fragmentos provenientes de alquilaminas simples y con grupos funcionales adicionales. Sin embargo, aminos menos nucleofílicos, como las anilinas, no generaron el producto. Se observa un compromiso entre la nucleofilicidad de las aminos y su impedimento estérico, como se puede ver

en los casos **5j**, **5k** y **5l**, donde al aumentar la cadena alifática el rendimiento disminuye por debajo del 50%.

Por otro lado, el componente isonitrilo demostró tolerar una diversidad estructural más amplia (Compuestos **5b** - **5m**, Figura 3) ya que no está implicado en el reordenamiento de Smiles, paso limitante en términos energéticos de la reacción. Esto se condice con lo reportado por Cherón et al. (2013) acerca de la poca influencia del isonitrilo durante el reordenamiento de Smiles por estar alejado de los átomos involucrados. Sin embargo, en los casos de isonitrilos altamente impedidos estéricamente como t-butil isocianida y dodecil isocianida, la reacción no procedió. La baja reactividad de estos componentes también fue reportada por El Kaim et al., (2012). Probablemente, el impedimento estérico de estos isonitrilos influencia la formación del intermediario aril-imidato (**1**- Figura 1), único paso donde el isonitrilo está involucrado en el centro de reacción (Cherón et al., 2013).

Finalmente, encontramos que la reacción no procede cuando se emplean otros compuestos carbonílicos como alquil- y arilaldehídos o cetonas, en contraste con lo observado cuando otros investigadores usaron nitrofenoles más simples en la

condensación de Ugi-Smiles (El Kaïm et al., 2005). Estos resultados sugieren que el progreso de la reacción de Ugi-Smiles está influenciada en gran medida por el sistema policíclico del esteroide. Esto se condice con el hecho experimental de que la reacción no procedió cuando se cambió el componente ácido 2-nitroestróna (**3**) por la 4-nitroestróna (**4**).

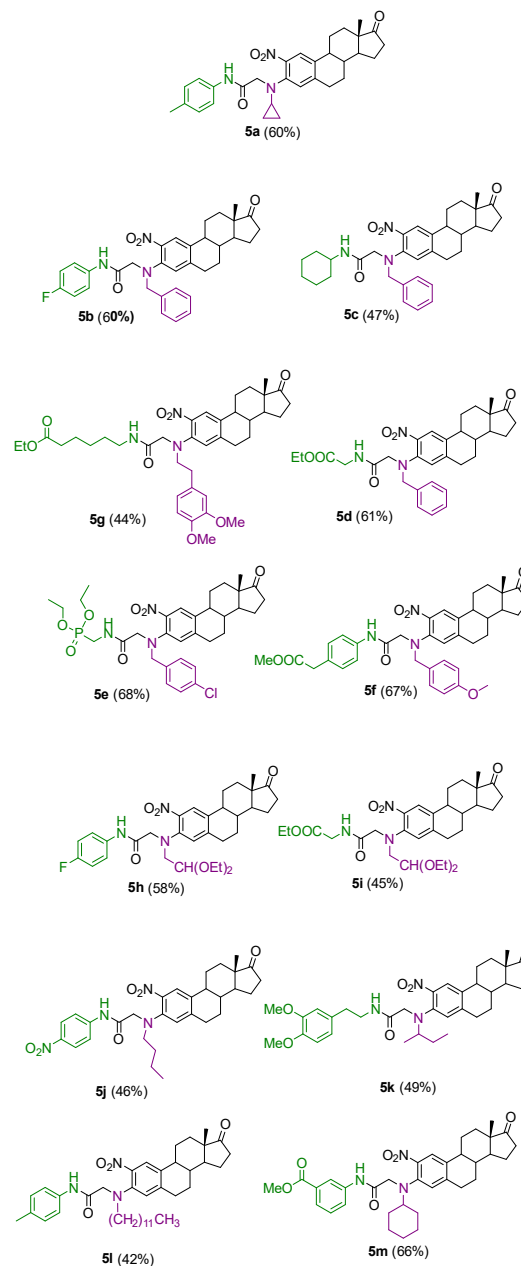


Figura 3. Productos obtenidos a partir de 2-nitroestróna **3** y diferentes aminas e isonitrilos utilizando la reacción de Ugi-Smiles en las condiciones optimizadas. (Rendimientos obtenidos luego de la purificación por columna).

En términos del alcance de la reacción para el componente ácido, hallamos que la 4-nitroestrona (**4**) no resultó reactiva en ninguna de las condiciones estudiadas, sin lograr obtener los productos Ugi-Smiles deseados cuando se usaban formaldehído y las aminas e isonitrilos antes mencionados. Este resultado inesperado sugiere que el entorno altamente asimétrico generado por el esqueleto esteroideal podría ser responsable de la diferente reactividad entre las dos nitroestronas isoméricas.

Con el fin de comprender más profundamente este resultado inesperado, realizamos un estudio teórico preliminar sobre la reacción. Para ello se construyeron modelos para los intermediarios de reacción y para los estados de transición provenientes de cada nitroestróna isomérica (por simplicidad, se seleccionaron metilamina y metilisocianida como componentes amina e isonitrilo), y se calcularon las barreras energéticas mediante métodos DFT ab initio. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cálculos teóricos para las barreras de activación TS1 y TS2a.

Sustrato	Barrera de activación TS1 (kcal/mol)	Barrera de activación TS2 (kcal/mol)
3	22.8	22.2
4	25.2	28.1

a. Cálculos realizados a nivel nivel M06-2X / 6-31G * usando un modelo de solvente continuo.

Los cálculos realizados sugieren que la diferencia principal de reactividad entre **3** y **4** se da durante el reordenamiento de Smiles (TS2) y no durante la formación del imidato 1 (TS1), donde para este último la diferencia entre las barreras de activación de **3** y **4** es pequeña (2,4 kcal/mol). Esto tiene sentido ya que se sabe que el primer paso (TS1) depende de la acidez del componente ácido para protonar a la imina de modo de quedar activada para el ataque por el isonitrilo. Dado que en este caso ambos sustratos tienen pKas semejantes (Chau-Minh et al., 2011), la diferencia entre ambos estados de transición TS1 es depreciable.

Como se puede observar en la Tabla 2 la barrera de activación para el reordenamiento de Smiles (TS2) que conecta el intermediario imidato **1** (Figura

1) con el producto correspondiente **2** es considerablemente mayor para 4-nitroestróna **4** que para la 2-nitroestróna **3** (28,1 frente a 22,2 kcal / mol, respectivamente).

Un análisis preliminar muestra que esta diferencia podría atribuirse a la disposición geométrica del grupo nitro en relación con el anillo aromático en el estado de transición TS₂, lo que podría afectar la estabilización de este.

Es bien conocido el hecho de que la eficiencia de una reacción de sustitución nucleofílica aromática (como es el reordenamiento de Smiles) está correlacionada con la capacidad de formación de puentes de hidrógeno entre el sustituyente en posición -orto (en este caso el grupo nitro) y el nucleófilo involucrado (en este caso el grupo amino en el imidato **1**). La disposición del grupo -nitro en **4** aparentemente dificulta la formación del puente de hidrógeno entre el grupo amino y el grupo nitro, condición necesaria para alcanzar la estructura de transición de menor energía de activación durante el reordenamiento de Smiles (Cherón et al., 2011). Mientras que, por otro lado, el grupo -NO₂ en **3** estabiliza mejor este puente de hidrógeno, dando un estado de transición de menor energía.

Esto se comprobó teóricamente, al estudiar el ángulo diedro en las nitroestrónas **3** y **4**. Se observó para la primera un ángulo cercano a 180°, mientras que para **4**, este ángulo es de alrededor de 25°, desviándose del plano, lo que genera una menor tendencia a formar puentes de H que son necesarios para el reordenamiento de Smiles. Esta rotación del grupo -NO₂ fuera del plano para evitar interacciones estéricas con el C-6 del esqueleto esteroideal también fue reportada por Mostafa et al. (2015) y genera una baja interacción intramolecular del grupo -NO₂ en la 4-nitroestróna (**4**) como fue reportado por Kovács et al. (2021). Así, la tendencia a formar puentes de H está menos favorecida para **4**, generando una barrera de activación mucho mayor durante el reordenamiento de Smiles en comparación con **3**.

Análisis Biológicos de los derivados de 3-aminonitroestróna N, N-disustituída

Dado que la diversificación estructural del esqueleto esteroideal mediante reacciones multicomponente basadas en isonitrilos es una estrategia poderosa para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos (Dávola et al., 2015 y Alonso et al., 2010), estudiamos el conjunto de compuestos descritos anteriormente en dos ensayos fenotípicos in vitro.

En primer lugar, realizamos un screening de viabilidad celular en la línea HT29 de adenocarcinoma colorrectal humano utilizando el ensayo MTT (Kepp et al., 2011) después del tratamiento de las células con cada compuesto durante 48 h. La mayoría de los compuestos no ejercieron ningún efecto por debajo de una concentración de 50 μM (Figura 4a), excepto el compuesto **5e**, que provocó una inhibición significativa de la viabilidad celular con un valor de IC_{50} (concentración necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad celular en comparación con el control) de 15 μM (Figura 4b). De manera consistente, este compuesto también mostró un efecto antiproliferativo interesante sobre células cancerígenas A549 del epitelio pulmonar ($\text{IC}_{50} = 18 \mu\text{M}$).

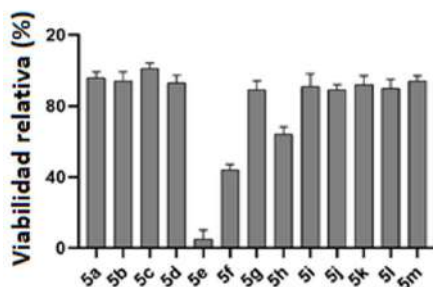


Figura 4. a. Efecto antiproliferativo de los productos Ugi-Smiles en células cancerígenas HT29.

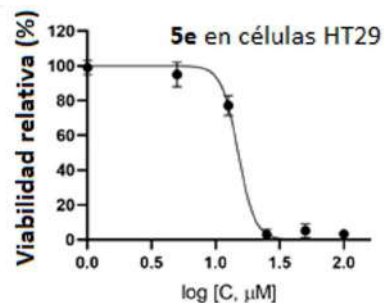


Figura 4. b. Screening a diferentes concentraciones de **5e** sobre células HT29. $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$.

Actualmente, se están realizando ensayos para el estudio del mecanismo de acción del compuesto **5e**.

Por otro lado, probamos los compuestos sintetizados en un ensayo antiviral. Para cubrir un espectro de acción más amplio, los ensayos se dirigieron contra dos virus de mamíferos: HSV-1 y VSV, virus de ADN y ARN, respectivamente. La actividad antiviral se expresó como la concentración de compuesto requerida para reducir el rendimiento del virus en un 50% (CE_{50}). También se calculó la concentración citotóxica requerida para reducir la viabilidad de las células Vero en un 50% (CC_{50}). Este screening mostró que el compuesto **5b** tiene un potente efecto antiviral contra HSV-1 (cepa KOS) ($\text{CE}_{50} = 520 \text{ nM}$), sin citotoxicidad (Figura 5).

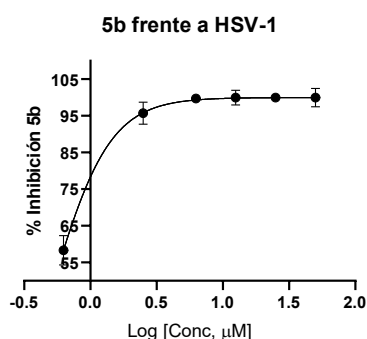


Figura 5. Screening antiviral a diferentes concentraciones de **5b** sobre células Vero infectadas con HSV-1. $CE_{50} = 520$ nM.

Curiosamente, este compuesto no ejerció ningún efecto sobre la propagación de VSV.

Con este resultado prometedor que presenta a **5b** como un agente antiviral potente frente a HSV-1, se realizó un ensayo virucida para determinar si la acción antiviral observada es causada por una inactivación directa del virus por **5b**. Para ello es que se tituló la cantidad de virus remanente luego de haber sido incubado (previo a la infección en las células) junto con **5b** por 1 h a 37°C. Como resultado, el rendimiento viral no se vio disminuido en comparación con el virus sin tratar (Figura 6). Esto demuestra que el compuesto **5b** puede considerarse un agente antiviral que tiene la capacidad de interferir con algún evento intracelular durante el ciclo de replicación del HSV-1 en células Vero.

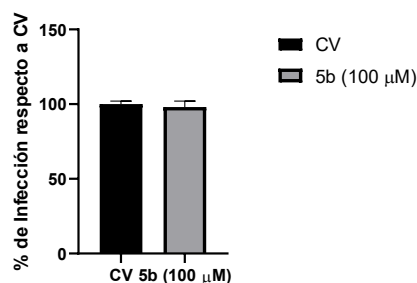


Figura 6. Ensayo de capacidad virucida del compuesto **5b** frente a HSV-1.

Finalmente, para caracterizar aún más la acción inhibitoria del compuesto **5b** se realizó un experimento de tiempo de adición mediante un ensayo de reducción de placas. En este caso se trabajó tanto con los virus HSV-1 y HSV-2. Así, las células Vero fueron expuestas al compuesto **5b** antes, durante o después de la infección con HSV-1 y HSV-2. Para ambos casos, en ninguno de los distintos tiempos de tratamiento el compuesto **5b** inhibió el número de unidades formadoras de placa (UFP), pero sí se observó que, durante la etapa de postratamiento, tanto para HSV-1 como para HSV-2, el tamaño de las placas (áreas) se redujo a un 40% y a un 60% en comparación con el control, respectivamente (Figura 7).

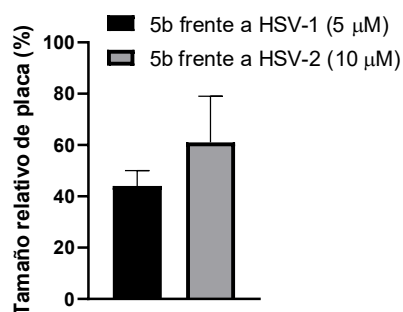


Figura 7. Efecto de **5b** sobre el tamaño de las placas de lisis generadas por infección con HSV-1 y HSV-2.

Esto confirma que el efecto antiviral de **5b** se da luego de la internalización de las partículas virales y que el efecto ejercido es independiente de la cepa de virus utilizada.

La reducción del tamaño de la placa viral de las cepas del VHS en presencia del compuesto **5b** sugiere que este análogo puede impedir la primera ronda de replicación viral y/o la propagación de célula a célula, siendo esta última etapa un factor importante en la capacidad de infección, la virulencia, el establecimiento de la latencia y la evasión de la respuesta inmunitaria durante las infecciones por Herpes virus (Roa-Linares et al., 2016).

Actualmente, se están llevando a cabo ensayos para estudiar el efecto de **5b** sobre la propagación del virus de célula a celular utilizando una cepa fluorescente de HSV-1 que puede replicarse en presencia

de anticuerpos neutralizantes para HSV-1. En estas condiciones se garantiza la transmisión de célula a célula a través de las uniones intercelulares entre células infectadas y no infectadas y se observará si el tratamiento con **5b** afecta esta forma de propagación.

Conclusiones

En resumen, en este trabajo hemos demostrado que la reacción Ugi-Smiles es una herramienta sintética fácilmente aplicable y original para la obtención de 3-aminonitroestronas N,N-disustituidas estructuralmente diversas en comparación con los métodos sintéticos utilizados actualmente y ya mencionados. Los resultados destacan el alcance y las limitaciones de la reacción y demuestran que el progreso de la misma está muy influenciado por el esqueleto esteroideal, efecto que no se observa cuando la reacción de Ugi-Smiles se aplica a fenoles activados de estructura más sencilla.

Finalmente, encontramos que el compuesto **5b** posee actividad antiviral frente a HSV-1 y HSV-2, mientras que el compuesto **5e** es un potencial agente antiproliferativo frente a HT29 y A549. Actualmente, se está profundizando el estudio de los mecanismos de acción biológica para ambos compuestos.



Bibliografía

- Abdessalem, A. Ben, Abderrahim, R., Dos Santos, A., El Kaïm, L., y Grimaud, L. (2017). Ugi-Smiles Couplings of Purine Derivatives. *Synlett*, 28 (6), 691–694.
- Alonso, F., Cirigliano, A. M., Cabrera, G.M., y Ramírez, J.A. (2010). Synthesis and Preliminary Biological Screening of Sterol Analogues as New Antifungal Agents against Plant Pathogens. *Steroids*, 75 (10), 659–664.
- Bohl, M. y Duax, W. L. (2018). *Molecular Structure and Biological Activity of Steroids*. doi:10.1201/9781351074803
- Chau-Minh, P., Yong, L., Byoung-moo, K., Yaser, M, y Scott, D.T. (2011). Inhibition of steroid sulfatasa with 4-substituted estrone and estradiol derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19 (20), 5999–6005.
- Chen, H., Engkvist, O., Blomberg, N., y Li, J. (2012). A Comparative Analysis of the Molecular Topologies for Drugs, Clinical Candidates, Natural Products, Human Metabolites and General Bioactive Compounds. *Med. Chem. Commun.*, 3 (3), 312–321.
- Chéron, N., Ramozzi, R., El Kaïm, L., Grimaud, L., y Fleurat-Lessard, P. (2013). Substituent effects in ugi-smiles reactions. *J. Phys. Chem. A.*, 117 (33), 8035–8042.
- Chéron, N., El Kaïm, L., Grimaud, L., y Fleurat-Lessard, P. (2011). Evidences for the key role of hydrogen bonds in nucleophilic aromatic substitution reactions. *Chem. Eur. J.*, 17 (52), 14929–14934.
- Cruz Silva, M. M. y Ribeiro Salvador, A. R. (2020). *Chemistry and Biological Activity of Steroids*. doi:10.5772/intechopen.88781
- Dagousset, G., Simon, C., Anselmi, E., Tuccio, B., Billard, T., y Magnier, E. (2017). Generation of the SCF3 Radical by Photoredox Catalysis: Intra- and Intermolecular Carbotrifluoromethylthiolation of Alkenes. *Chem. Eur. J.*, 23 (18), 4282–4286.
- Dávola, M. E., Mazaira, G. I., Galigniana, M. D., Alché, L. E., Ramírez, J. A., y Barquero, A. A. (2015). Synthetic Pregnenolone Derivatives as



- Antiviral Agents against Acyclovir-Resistant Isolates of Herpes Simplex Virus Type 1. *Antiviral Res.*, 122, 55-63.
- Dömling, A., Wang, W., y Wang, K. (2012). Chemistry and Biology of Multicomponent Reactions. *Chem. Rev.*, 112 (6), 3083–3135.
- El Kaïm, L., Grimaud, L., y Oble, J. (2005) Phenol Ugi-Smiles Systems: Strategies for the Multicomponent N-Arylation of Primary Amines with Isocyanides, Aldehydes, and Phenols. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 44 (48), 7961–7964.
- El Kaïm, L. y Grimaud, L. (2010). Ugi-Smiles Couplings: New Entries to N-Aryl Carboxamide Derivatives. *Mol. Divers.*, 14 (4), 855–867.
- El Kaïm, L., Gizolme, M., Grimaud, L., y Obie, J. (2007). Smiles Rearrangements in Ugi- and Passerini-Type Couplings: New Multicomponent Access to O- and N-Arylamides. *J. Org. Chem.*, 72 (11), 4169–4180.
- El Kaïm, L. y Grimaud, L. (2014). The Ugi-Smiles and Passerini-Smiles Couplings: A Story about Phenols in Isocyanide-Based Multicomponent Reactions. *European J. Org. Chem.*, 2014 (35), 7749–7762.
- El Kaïm, L., Grimaud, L., y Pravin, P. (2012). Ugi-Smiles couplings of 4-substituted pyridine derivatives: A fast access to chloroquine analogues. *Org. Lett.* 14 (2), 476–478.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., y otros. (2013). Gaussian 09, Gaussian Inc.: Wallingford CT.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., y Kroemer, G. (2011). Cell Death Assays for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10 (3), 221–237.
- Kovács, F., Gopisetty, M. K., Adamecz, D. I., Kiricsi, M., Enyedy, E. A., y Frank, E. (2021). Synthesis and conversion of primary and secondary 2-aminoestradiols into A-ring-integrated benzoxazolone hybrids and their in vitro anticancer activity. *RSC Adv.*, 11 (23), 13885-13896.
- Lardy, S. W., Luong, K. C., y Schmidt, V. A. (2019). Formal Aniline Synthesis



- from Phenols through Deoxygenative N-Centered Radical Substitution. *Chem. Eur. J.*, 25 (67), 15267–15271.
- Lee, J. A. y Berg, E. L. (2013). Neoclassic Drug Discovery: The Case for Lead Generation Using Phenotypic and Functional Approaches. *J. Biomol. Screen.*, 18 (10), 1143–1155.
- Liu, K., Tang, S., Wu, T., Wang, S., Zou, M., Cong, H., y Lei, A. (2019). Electrooxidative Para-Selective C–H/N–H Cross-Coupling with Hydrogen Evolution to Synthesize Triarylamine Derivatives. *Nat. Commun.*, 10 (1), 1–10.
- Mostafa, Y.A., Kralt, B., Rao, P.P.N., y Taylor, S.D. (2015). A-ring substituted 17 β -arylsulfonamides of 17 β -aminoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol as highly potent reversible inhibitors of steroid sulfatase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23 (17), 5681–5692.
- Oaksmith, J. M., Peters, U., y Ganem, B. (2004). Three-Component Condensation Leading to β -Amino Acid Diamides: Convergent Assembly of β -Peptide Analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (42), 13606–13607.
- Radu, I. I., Poirier, D., y Provencher, L. (2002). New efficient pathway for the synthesis of 3-aminoestrone. *Tetrahedron Lett.* 43 (42), 7617–7619.
- Ramezanzpour, S., Rezaei, M. N.; Vaezghaemi, A., y Rominger, F. (2018). Facile Synthesis of Novel 3,4,5-Trisubstituted-1,2,4-Triazin-6(1H)-Ones via a Sequential Ugi-Smiles Type/Nucleophilic Substitution/Cyclization Reaction. *New J. Chem.*, 42 (21), 17533–17537.
- Reguera, L., Attorresi, C. I., Ramírez, J. A., y Rivera, D. G. (2019). Steroid diversification by multicomponent reactions. *Beilstein J. Org. Chem.*, 2019 (15), 1236–1256.
- Rivera, D. G. y Wessjohann, L. A. (2006). Supramolecular Compounds from Multiple Ugi Multicomponent Macrocyclizations: Peptoid-Based Cryptands, Cages, and Cryptophanes. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (22), 7122–7123.
- Roa-Linares, V. C., Brand, Y. M., Agudelo-Gomez, L. S., Tangarife-Castaño, V., Betancur-Galvis, L. A., Gallego-Gomez, J. C., y González, M. A. (2016). Anti-Herpetic and anti-



- dengue activity of abietane ferruginol analogues synthesized from (+)-dehydroabietylamine. *Eur. J. Med. Chem.*, 108, 79-88.
- Scalmani, G. y Frisch, M. J. (2010). Continuous Surface Charge Polarizable Continuum Models of Solvation. I. General Formalism. *J. Chem. Phys.*, 132 (11), 1-15.
- Sidhoum, M. A., El Kaïm, L., y Grimaud, L. (2018). 4-Aminopyrimidine Libraries from the Ugi-Smiles Reaction of Thiouracil. *Tetrahedron*, 74 (38), 5222–5231.
- Simón, L. y Goodman, J. M. (2011). How Reliable Are DFT Transition Structures? Comparison of GGA, Hybrid-Meta-GGA and Meta-GGA Functionals. *Org. Biomol. Chem.*, 9 (3), 689–700.
- Suwandi, L. S., Agoston, G.E., Shah, J.H., Hanson, A.D., Zhan, X.H., LaVallee, T.M. y Treston A. M. (2009). Synthesis and antitumor activities of 3-modified 2-methoxyestradiol analogs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 19 (22), 6459–6462.
- Taeufer, T. y Pospesch, J. (2020). Palladium-Catalyzed Synthesis of N,N-Dimethylanilines via Buchwald–Hartwig Amination of (Hetero) Aryl Triflates. *J. Org. Chem.*, 85 (11), 7097-7111.
- Tomson, A.J. y Horwitz, J.P. (1959). Some 2- and 4-substituted estrone 3-methyl ethers. *J. Org. Chem.*, 24 (12), 2056-2059.
- Weigend, F. y Ahlrichs, R. (2005). Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 7 (18), 3297–3305.
- Zhao, Y. y Truhlar, D. G. (2008). Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry. *Acc. Chem. Res.*, 41 (2), 157–167.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020170100679 BA).

Tradescantia ¿Ornamental o Medicinal? Caracterización Química de la Tradescantia pallida en Paraguay



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



C.28. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Tradescantia ¿Ornamental o Medicinal? Caracterización Química de la *Tradescantia pallida* en Paraguay

Autor: Ferreira, Williams; will.ferreiramerlos@gmail.com

Co-autor(es): Ramirez, Vanessa; vaneramirezcenturion08@gmail.com; Acosta, Alfredo; alfredoandresacostafernandez@gmail.com; Darmanaz, Nicole; nicoledarma98@gmail.com

Tutor/a: Ferreira, Francisco; licfranferre10@gmail.com

Universidad Nacional de Asunción (UNA)

Resumen

La *Tradescantia pallida*, una planta herbácea, comúnmente considerada como maleza ornamental posee propiedades para uso medicinal, aunque no se cuenta con datos de respaldo. Este estudio plantea la identificación de los fitoconstituyentes presentes en el extracto crudo etanólico de la *Tradescantia pallida*. Las muestras fueron colectadas de la zona del campus universitario en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay. Se realizó un screening fitoquímico de los metabolitos presentes. El contenido de fenoles totales fue determinado por el método colorimétrico. De acuerdo a los resultados obtenidos, se demuestra la presencia de Flavonoides y cumarinas. En cuanto a los fenoles totales se cuantifico 30,1±3,0 mg Equivalentes Ácido Gálico/g de extracto. Se han identificado hasta 26 compuestos por cromatografía gaseosa, destacando la presencia de trazas del Biciclo[10.1.0]tridec-1-eno del cual no se han encontrado antecedentes en la especie de estudio, además, ácidos grasos, vitamina E, sitosterol, escualeno. Todas las moléculas poseen efecto conocido en el área de la medicina, tal que, la *Tradescantia pallida* muestra un potencial uso beneficioso en el área de la salud humana.

Palabras clave: *Tradescantia pallida*, Screening fitoquímico, fenoles totales, Biciclo[10.1.0]tridec-1-eno



Introducción

Las plantas ornamentales, no se encuentran clasificadas concretamente dentro del reino plantae, sino que se tratan de cualquier tipo de planta que se cultive y cuide con el propósito de embellecer mediante el paisajismo un espacio determinado, es decir cuando son empleadas como elemento decorativo. (Acosta, 2022)

Las plantas ornamentales alimenticias y medicinales, son aquellas que se cultivan y se comercializa con propósitos decorativos por sus características estéticas, como las flores, hojas, la peculiaridad de su follaje, frutos o tallos en jardines y diseños paisajísticos, como planta de interior o para flor de corte. Sin embargo, también pueden ser utilizadas como fuente de alimento o para elaborar ciertas medicinas. (*Plantas Ornamentales Alimenticias y Medicinales - Explotaciones Jogamar*, 2020)

Según la OMS, las plantas medicinales constituyen una terapia más natural, efectiva, de costo racional y asequible a las poblaciones. (Ramirez C. *et al.*, 2013)

De acuerdo con (Id Plantae, n.d.) la *Tradescantia pallida* es considerada una maleza ornamental de hojas violetas muy utilizada para macetas, como esta planta resiste a diversas condiciones climáticas como temperaturas extremas y baja o escasa humedad en los patios y balcones

con alta exposición al sol. La *Tradescantia pallida* es además una planta medicinal que puede ser aprovechada para el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias.

Objetivos

Objetivo General.

- Identificar los diferentes fitoconstituyentes presentes en el extracto crudo etanólico de la *Tradescantia pallida* del Campus Universitario-San Lorenzo.

Objetivos Específicos.

- Analizar la presencia de los principales metabolitos secundarios a través de reacciones químicas de identificación, en el extracto crudo etanólico
- Evaluar el contenido de Compuestos Fenólicos totales en el extracto crudo etanólico, a través del método de Folin-Cioulcateu.
- Proponer estructuras de compuestos presentes en el extracto crudo etanólico, empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.
- Comparar estos resultados con los reportados en otras regiones.

Materiales y métodos

Selección de Muestras.

Las muestras de la especie vegetal (libre de sus raíces) fueron colectadas de la zona

del campus universitario (FCA), tomando solo las hojas sanas y sin daños aparentes.

Pretratamiento de Muestras.

Las muestras a ser analizadas fueron secadas bajo corriente de aire a temperatura ambiente y bajo sombra. Luego se procedió a realizar el triturado en un molino a fricción. El material triturado (incluyendo una fracción acuosa) se transfirió a un frasco de vidrio para luego realizar la maceración con EtOH 96% por 1 mes con agitación esporádica. Luego se filtró y el residuo se realizaron subsecuentes extracciones con el mismo solvente hasta que no de coloración en el EtOH. Luego, se unificaron los extractos y se evaporó el exceso de solvente. El remanente (conteniendo un poco de agua proveniente de la plata) se liofilizó hasta obtener un polvo de color púrpureo

Screening fitoquímico.

Para la realización de los ensayos del screening fitoquímico se utilizó la metodología de acuerdo a (Flores & García, 2016), con algunas adaptaciones para la especie en estudio. Se tomaron 10mg del extracto liofilizado en un vaso de precipitado de 50ml y se añadió 10ml de agua destilada, se sonico en un baño de ultrasonido durante 5min y se procedió a los ensayos correspondientes.

Saponina

En un tubo de ensayo se tomó 1ml de extracto, se le agregaron 4ml de agua destilada y se calentó durante 5min y se agito mecánicamente por 3min.

Flavonoides

Prueba de Shinoda: En un tubo de ensayo se colocaron 1ml de extracto, con una pequeña cantidad de magnesio en polvo y 4 gotas de HCl concentrado, en la campana de extracción. Relacionar los cambios de color con la presencia de los siguientes metabolitos

Compuesto	Coloración
Flavonas	Naranja
Flavonoides	Rojo
Flavonoles	Rojo azulado
Flavonas	Verde
Flavononoles	Verde azulado
Xantanos	Violeta

- **Prueba de zinc:** En un tubo de ensayo se colocaron 1ml de extracto, con una pequeña porción de zinc en polvo y 4 gotas de HCl concentrado. Relacionar los cambios de coloración con la presencia de los siguientes metabolitos.

Compuesto	Coloración
Leucoantocianidinas	Rojo
Catequinas	Café amarillento

Esteroles

- **Reacción de Zack:** Se tomo 1ml de extracto en un tubo de ensayo y se le agregaron unas gotas de ácido acético y unas gotas ácido sulfúrico concentrado con unas gotas de FeCl₃ al 20%; tornándose una coloración verde si la reacción es positiva.
- **Reacción de Lieberman-Burchard:** Se tomaron 1ml de extracto en un tubo de ensayo y se le agregaron unas gotas de anhídrido acético y unas gotas de ácido sulfúrico concentrado; formándose así un anillo de color azul si la reacción es positiva.

Cumarinas

Se colocaron 1ml de extracto en un tubo de ensayo y se le agregaron unas gotas de hidróxido de amonio. Se cerro el tubo y se realizaron las lecturas a longitudes de onda de 254 y 365nm.

Taninos

- **Ensayo de cloruro férrico:** A 1ml de extracto crudo se adicionaron unas gotas de cloruro férrico al 5% en solución etanólica; Una coloración verde azulada indica una reacción positiva.
- **Ensayo de Gelatina-Sal:** Se tomo 1 ml de extracto crudo en un tubo de ensayo y de le adicionaron 1ml del reactivo gelatina-sal; la formación de un precipitado es confirmatoria para esta prueba.

Alcaloides

Se tomo una pequeña porción del extracto y se disolvió en HCl al 10%

- **Reacción de Mayer:** En un tubo de ensayo se colocaron 1ml de extracto y se le adicionaron unas gotas de reactivo de Mayer; la formación de un precipitado de color crema es positiva para la reacción.
- **Reacción de Dragendorff:** En un tubo de ensayo se colocaron 1ml de extracto y se agregaron unas gotas de reactivo de Dragendorff; la formación de un precipitado naranja-marrón indica la presencia de alcaloides.
- **Reacción de Wagner:** En un tubo de ensayo se colocaron 1ml de extracto y se agregaron unas gotas de reactivo Wagner; la formación de un precipitado naranja-marrón se considera positiva para la reacción.

Ensayo de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método colorimétrico de (Singleton et al., 1965) con algunas adaptaciones. Se prepararon soluciones metanólicas del extracto a ensayar de aproximadamente 1 mg.mL⁻¹ de concentración.

En diferentes matraces aforados de 10 mL se tomó una alícuota de cada una de las soluciones preparadas (200µ L para monitoreo), se adicionaron 2000 µL de agua y 200 µL del reactivo Folin-Ciocalteu

2N (grado analítico, Merck). Se agitó y luego se dejó en reposo por 5 minutos.




Posterior a eso se adicionaron 1,5 mL de una solución acuosa Na₂CO₃ al 20%, se aforaron a 10 mL con agua. Se agitaron y se dejaron en reposo por 1 hora en la oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV Visible. Se empleó como blanco 1mL de Metanol en paralelo a fin de corregir cualquier interferencia provocada por la adición del mismo.

Para la cuantificación, se compararon con soluciones patrones de Ácido Gálico, el cual se preparó primeramente una solución Stock de ácido gálico en metanol de 100 µg.mL⁻¹. A partir de esta solución se prepararon diluciones tomando 10, 20, 40, 80, y 160 µL en diferentes matraces y se procedieron de la misma manera que en las muestras, con un volumen final de 10 mL. De los resultados se trazó una curva de calibrado para determinar la concentración equivalente de Acido Gálico de los tubos de muestra.

Los resultados se expresaron como como mg equivalentes de ácido gálico (GAE).g⁻¹; los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (SD). (Singleton et al., 1965).

Resultados y discusión

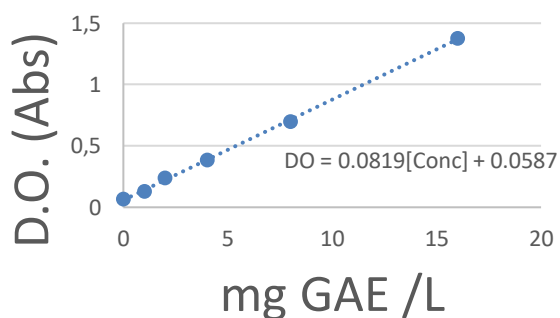
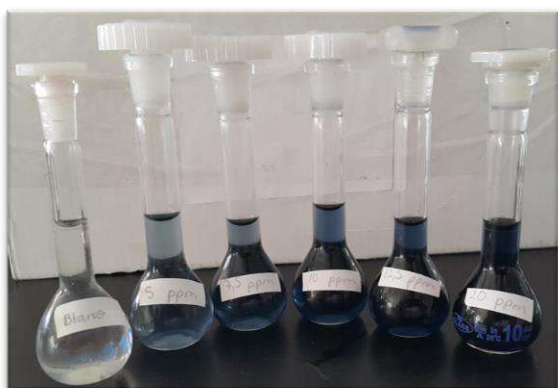
De acuerdo a los resultados obtenidos, se muestra la presencia de Flavonoides por dos reacciones diferentes además de cumarinas.

Metabolito	Ensayo	Resultado
Alcaloides	Wagner	
	Dragendorff	Inconcluso
	Mayer	Inconcluso
Flavonoides	Shinoda	
	Zinc/HCl	
Esteroles	Zack	(-)
	Lieberman-Buchard	(-)
Saponina	Afrosimétrico	(-)
Cumarina	Fluorescencia	(++)
Taninos	FeCl ₃	(-)
	Gelatina/Sal	(-)

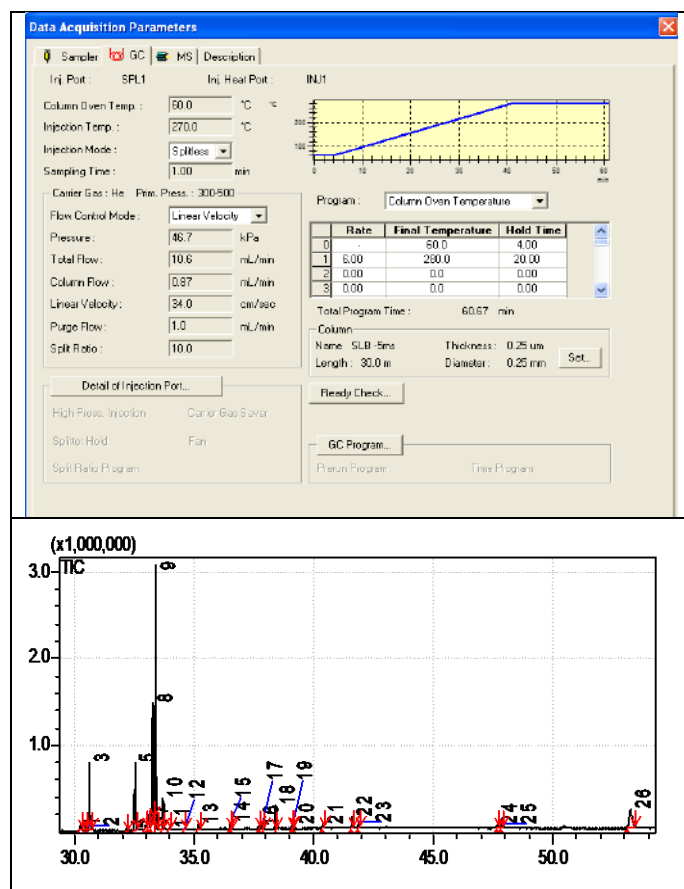
Estos resultados difieren moderadamente de lo reportado por (Huq, 2015) y (Morales Rabanales, 2008) los cuales reportaron la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos. Dicha disidencia de los resultados podría deberse

a las diferencias edafoclimáticas existente entre México y Paraguay.

En cuanto a los compuestos fenólicos totales, se ha cuantificado la misma a un valor de $30,1 \pm 3,0$ mg Equivantes Ácido Gálico/g de extracto, mayor que lo reportado por (Morales Rabanales, 2008) en su fracción hexanica, pero inferior en comparación la fracción en diclorometano y la metanólica, diferencia debida a la presencia de compuestos como la antiocianina cianidin 3,7,3 triglucosido.



En el análisis por GC MS se ha identificado 26 compuestos en la fracción soluble en acetona, el cual fue inyectado en GC MS. Cabe mencionar que la misma ha generado un residuo insoluble de color purpura, soluble en agua.



Además, se han identificado también la presencia de ácidos grasos superiores diversos (algunos ácidos omegas), alcoholes superiores, pero se puede mencionar al compuesto 12 (Biciclo [10.1.0]tridec-1-ene) primer reporte de la molécula en la especie en estudio

También se evidencia al compuesto 18 (1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester) conocido por tener diversas actividades biológicas además de ser empleado como plastificante. Se menciona además la presencia de los compuestos 23 (Squalene), 24 (Vitamin E) y 26 (.beta.-Sitosterol) conocidos antioxidantes ampliamente distribuidos y conocidos compuestos liposolubles.



Conclusiones

Tras los ensayos realizados se han identificado flavonoides por reacciones químicas (Shinoda y Zn/HCl); además se logró cuantificar compuestos fenólicos, mediante una curva de calibrado de una solución Stock de ácido gálico en metanol y finalmente se identificaron 26 compuestos por medio del GC-MS utilizando la biblioteca del NIST en una fracción soluble en acetona, entre ellos: ácidos grasos superiores, vitamina E, sitosterol, escualeno y trazas del Bicyclo [10.1.0]tridec-1-ene.

Bibliografía

- Acosta, M. B. (2022). PLANTAS ORNAMENTALES: qué son, tipos, nombres, imágenes y vídeos. <https://www.ecologiaverde.com/plantas-ornamentales-que-son-tipos-nombres-e-imagenes-2642.html>
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119–145.
- Espejo Serna, A., López Ferrari, A. R., & Ceja Romero, J. (2009). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. (pp. 1187–1198). <http://www1.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora78.pdf>
- Flores, J., & García, M. (2016). Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de pitahaya *Hylocereus undatus*. *Jóvenes En La Ciencia*, 2(1), 29–33. file:///C:/Users/VISERION/Downloads/Flores-Vazquez_2016.pdf
- Huq, S. (2015). Comparative phytochemical evaluation and biological activity screening of *Murdannia nudiflora* and *Tradescantia pallida*. 1–118. <http://dspace.bracu.ac.bd/bitstream/handle/10361/4324/Bachelor-Project-11146004.pdf?sequence=1>
- Id Plantae. (n.d.). *Tradescantia pallida*. Retrieved June 3, 2022, from <https://www.idplantae.com/plantas-medicinales/tradescantia-pallida-nina-en-barco/>
- Morales Rabanales, Q. N. (2008). Estudio fitoquímico e identificación de compuestos antimicrobianos de dos plantas de la familia Commelinaceae. 1–6.
- Naturaleza Tropical. (2021). *Tradescantia pallida*. <https://naturalezatropical.com/tradescantia-pallida/>
- Plantas ornamentales alimenticias y medicinales - Explotaciones Jogamar. (2020). <https://www.jogamarplantaornamental.com/2020/08/05/plantas-ornamentales-alimenticias-y-medicinales/>
- Ramirez C., A., Isaza, G., & Pérez, J. (2013). Especies Vegetales Investigadas Por Sus Propiedades Antimicrobianas, Inmunomoduladoras E Hipoglicemiantes En El Departamento De Caldas (Colombia, Sudamérica). *Biosalud*, 12(1), 59–82.
- Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/16/3/144>

Uso de herramientas informáticas para la gestión documental en trabajos de investigación, Facultad de Enfermería y Obstetricia, San Lorenzo-Paraguay



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



C.29. Tecnologías de la información y comunicación

Uso de herramientas informáticas para la gestión documental en trabajos de investigación, Facultad de Enfermería y Obstetricia, San Lorenzo-Paraguay

Autor: Zarza Díaz, Jorge Quintín; zarza1288@gmail.com

Profesor/a Tutor/a: Ovelar, Rosa Daniela; rovelar@fenob.una.py

Universidad Nacional de Asunción (UNA)

Resumen

El uso de las herramientas informáticas se ha impregnado en la sociedad y, por lo tanto, el sistema educativo no está exento de su influencia. Los estudiantes en la actualidad están en contacto permanente con los recursos tecnológicos la cual contribuye a la necesidad de disponer de una información precisa, pertinente y confiable para el desarrollo de su actividad investigadora; y enfermería como disciplina científica hacer uso de esta con el fin de que fundamente sus investigaciones. El objetivo fue determinar el uso de las herramientas informáticas para la gestión documental en trabajos de investigación de la Facultad de Enfermería y Obstetricia durante el año 2020. El diseño metodológico fue observacional, descriptivo, prospectivo, de corte transversal con enfoque cuantitativo. La población estuvo comprendida por estudiantes de Enfermería. El muestreo fue probabilístico aleatorio simple, el método de recolección de datos fue mediante una encuesta virtual a través de Google por medio de un formulario que estuvo elaborado con preguntas cerradas, opciones múltiples, en base a las variables del estudio. El análisis de los datos se realizó mediante la estadística descriptiva, los resultados mostraron que predomina el sexo femenino, el grupo de edad 21 a 24 años, las bases de datos más usadas son Scielo, Google Scholar, Cicco y BVS Py, para la gestión documental utiliza y analiza la información, pero no realizan monografías, artículos e investigaciones. Se concluyó que el uso de las herramientas informáticas en estudiantes de enfermería es escaso, si bien existen algunos indicios de su utilización, pero sigue siendo una tarea pendiente su difusión y aplicación.

Palabras clave: Herramientas informáticas, Gestión Documental, Trabajos de Investigación.



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Introducción

En los últimos años, la tecnología ha adquirido una importancia creciente como factor relacionado entre países de igual o diferente grado de desarrollo (Sagasti, F; Guerrero, M, 2014). Los beneficios que trae consigo la tecnología moderna son muy numerosos y ampliamente conocidos. Una mayor productividad proporciona a la sociedad unos excedentes que permiten disponer de más tiempo libre, dispensar la educación y, de hecho, proseguir la propia labor científica (De la Vega, 2019).

La literatura e investigación científica, con alto grado de pertinencia y sensibilidad, se ha convertido en una necesidad fundamental para cualquier profesional de las ciencias de la salud, considerando que sin un adecuado conocimiento del funcionamiento de las herramientas informáticas, de las bases de datos científicas y de los artículos indexados, cualquier búsqueda puede ser insuficiente, poco exhaustiva y convertirse en un proceso complejo y frustrante (Sanz-Valero J, Rojo-Alonso C., 2008; Sanz-Valero J, Castiel LD., 2010; Haynes RB; McKibbin KA; Wilczynski NL; Walter SD; Werre SR; Hedges Team., 2005; Michon , F; Tummers, M, 2009).

Es en este campo que el uso de las tecnologías de información y comunicación

(TIC) ha demostrado ser de gran relevancia, para el avance científico y tecnológico; generando cambios en la prestación de servicios de salud, formación de recursos humanos -permitiendo desarrollar de una forma eficaz su capacitación y actualización continua- e investigación (De Fenandez, Teppa, & Fernandez, 2011).

En la actualidad, con las tecnologías de la información y la comunicación (TIC) también se podría afirmar que en salud se hace gestión del conocimiento de forma eficaz, al menos en sus aspectos básicos, pero no es así. La información científica en salud actual se ubica en su mayoría en bases de datos virtuales como Pubmed o Scielo, entre muchas otras, con progresivos incrementos en sus publicaciones (Cañedo Andalia, 2009).

Pese a que en los estudiantes y profesionales de la salud se ha extendido el uso de Internet y se tienen percepciones positivas acerca de su aplicación para la práctica clínica, muchos presentan insuficientes habilidades para acceder, recuperar, ubicar y utilizar toda la información que necesitan. Este problema no se reduce a la simple búsqueda, sino al adecuado manejo de dicha información, es decir, a su lectura, interpretación y aplicación (Molina, Dulzaides, & Mora, 2007; Carranza Lira & Varela, 2007).



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Diversos estudios en Latinoamérica muestran esta realidad, la carencia de habilidades básicas para la búsqueda y uso de la información científica en profesionales de salud. Contribuyen a este problema los usos más frecuentes que los estudiantes hacen de Internet no relacionados con la investigación (chats, redes sociales, etc.), la exigua promoción de dichas habilidades durante la formación en el pregrado a través de programas formales y extracurriculares y, la percepción que los estudiantes tienen sobre la capacitación que brinda la universidad en investigación. Estos aspectos pasan a ser causa multifactorial de la baja producción científica estudiantil (Ospina, Reveiz Herault, & Cardona, 2005; Molina, Huamani, & Mayta Tristan, 2008; Horna, Curioso, Guillen, Torres, & Kawano, 2002; Galan, y otros, 2005).

La enfermería como disciplina científica emergente debe hacer buen uso de las fuentes de información con el fin de conseguir información contrastada que fundamente sus investigaciones. El estar actualizado, conocer los avances en las

distintas disciplinas es necesario no solamente para la investigación, sino también para el desempeño profesional (Jiménez Hernández, J A; Guillén Rios, J F ; Murillo Murillo, R, 2006; Gálvez, 2001).

La investigación en el campo de la enfermería, describe su evolución histórica a partir de las iniciativas de Florence Nightingale en el siglo pasado, porque sus reformas se basaron en una investigación cuidadosa que sirve como base para el continuo análisis y la investigación enfermera en todo el mundo, de allí la importancia de realizar investigaciones en el área de enfermería que sirvan de base científica a los futuros profesionales de la salud (Arratia F. Alejandrina, 2005; Tomey M.A, Alligood M.R, 2007).

Objetivos

Determinar el uso de las herramientas informáticas para la gestión documental en trabajos de investigación.

Facultad de Enfermería y Obstetricia - U.N.A 2020; Describir los datos sociodemográficos; Identificar las bases de datos utilizados y Caracterizar la gestión documental utilizada por estudiantes de Enfermería.

Materiales y métodos

Diseño de estudio observacional, descriptivo, prospectivo, de corte transversal con enfoque cuantitativo. El área de estudio fue la Facultad de Enfermería y Obstetricia, de la Universidad Nacional de Asunción, en la ciudad de San Lorenzo, Paraguay. La población estudiada estuvo comprendida por 311 estudiantes de Enfermería, la muestra 160 estudiantes del 5to al 9no Semestre de todas las secciones, el muestreo de estudio fue probabilístico aleatorio simple; se realizaron sorteos aleatorios por cada sección y el tamaño de la muestra estuvo constituido por el 51,4% de la población. Se utilizó como método la encuesta, como técnica un cuestionario electrónico mediante un instrumento elaborado en Google que abarcaron preguntas cerradas, con opciones múltiples en base a las variables del estudio. Se realizó una encuesta piloto a 30 estudiantes quienes no formaron parte del estudio para ir ajustando el instrumento de recolección de datos y de la misma manera fue verificado por un experto del área de investigación, así como un experto en gestión de datos. Los datos recogidos fueron tabulados en una planilla electrónica elaborada en Microsoft Office Excel para su análisis y para la gestión de datos se utilizó la

estadística descriptiva. En todo momento fueron respetados los principios éticos de la investigación.

Resultados y discusión

El estudio se llevó a cabo con 160 estudiantes y revela los siguientes resultados: los datos sociodemográficos son de estudiantes jóvenes de 20 a 38 años, en su mayoría el grupo etario de 20 a 24 años con 94%, de sexo masculino y femenino predominando está última con 90%, correspondientes del quinto al noveno semestre de todas las secciones y un 83% no pertenece a una sociedad científica, estos datos se pueden apreciar en la tabla 1. En Lima, un estudio realizado por Humani Navarro M; et al, el promedio de edad de los estudiantes fue de $21,1 \pm 2,1$ años (IC 95% = 20,7-21,4 años), con predominio de estudiantes de sexo femenino (88%; $n = 132$). La proporción por semestre de estudio fue del 19% ($n = 29$) para el internado y del 20% ($n = 31$) para los estudiantes del primer al cuarto año. El 3,3% ($n = 8$), pertenece a alguna sociedad científica estudiantil (Humani Navarro, Alegria Delgado, Lopez Sanchez, Tarqui Mamani, & Ormeño Caisafana, 2011).

Tabla N°1 Datos sociodemográficos de estudiantes de enfermería

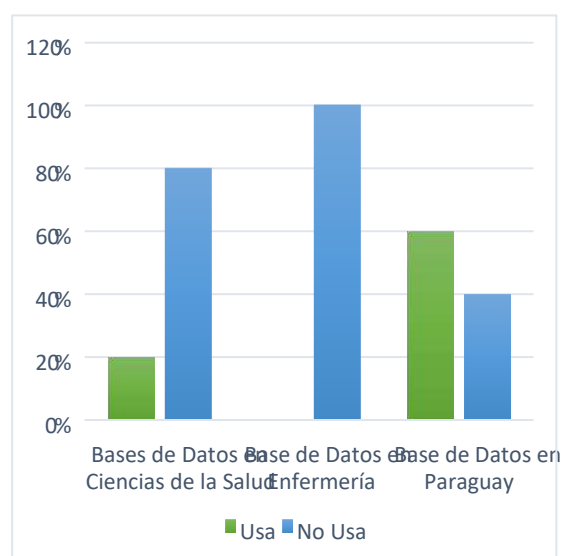
Datos Sociodemográficos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Edad		
20-24 años	151	94
25-29 años	8	5
30-38 años	1	1
Sexo		
Masculino	16	10
Femenino	144	90
Semestre		
Quinto	43	27
Sexto	17	10
Séptimo	41	26
Octavo	13	8
Noveno	46	29
Sección		
Primera	78	49
Segunda	50	31
Tercera	32	20
Pertenece a Sociedad Científica		
Si	27	17
No	133	83

Fuente: Datos obtenidos por los investigadores.

En cuanto al uso de las bases de datos; el uso de las bases de datos en ciencias de la salud destaca el uso de Google scholar con

90%; el uso de las bases de datos en enfermería predomina el no uso con mayor porcentaje Enfispo, Cinhal, Cuiden, EBE; el uso de las bases de datos en Paraguay se destaca el uso de Scielo con 93%, CiccoConacyt 76%, BVS Py 59%. Se contrasta con el estudio realizado en Paraguay por Barrios Coronel I; et al; en estudiantes de medicina donde resaltan que las fuentes utilizadas: Google con un uso del 82 %, Scielo 56 %, Pubmed 31%, Google Scholar 23%, siendo prácticamente desconocidos CICCOC 9%, LILACS 3% y Scopus 1% (Barrios Coronel Iván, Vargas Viveros Melisa, Echeverría Cuevas José, García Pérez Javier, Torales Benítez Julio., 2017).

Figura 1. Base de datos utilizados por estudiantes de Enfermería.



Fuente: Datos obtenidos por los investigadores.

En referencia a la gestión documental; el 91% analiza la información, 99% usa la información, las horas de uso el mayor porcentaje es de 1 hora diario, 73% utiliza una carpeta digital para archivar los datos y se visualiza en la tabla 2, un 97% no realizan monografías, 86% no realizaron un artículo científico y el 14% si realizó, 79% no cuenta con otros trabajos de investigación la cual se puede apreciar en la figura 2. Coincide con un trabajo similar realizado en Perú en estudiantes de medicina donde el 13,6% había realizado alguna investigación científica y la mediana de horas que usa a la semana fue 8 horas (Mejía, 2015).

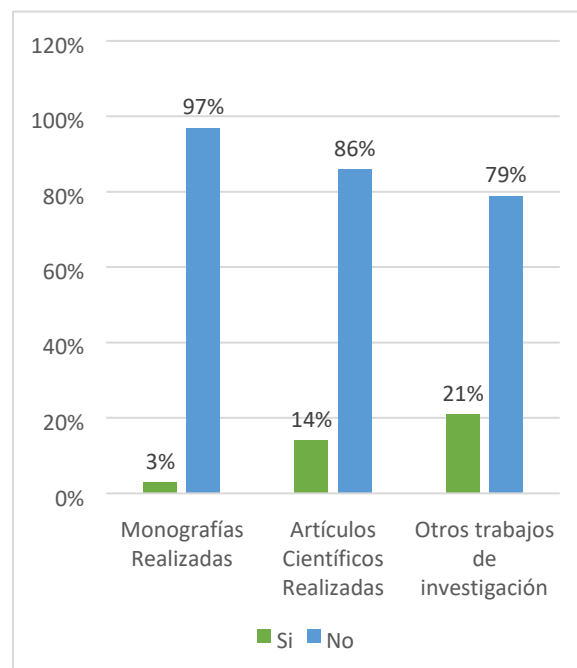
Tabla N°2 Gestión documental utilizada por los estudiantes de enfermería

Gestión Documental	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Análisis de la Información		
Realiza	146	91
No Realiza	14	9
Utilización de la Información		
Usa	158	99
No usa	2	1
Horas de uso de las bases de datos		

1 hora	100	62
2 horas	43	27
3 horas	17	11
Carpeta digital para archivar datos		
Utiliza	116	73
No utiliza	44	27

Fuente: Datos obtenidos por los investigadores.

Figura 2. Gestión documental utilizada por estudiantes de enfermería



Fuente: Datos obtenidos por los investigadores.

Conclusión

Los estudiantes de enfermería en su mayoría el grupo etario es de 20 a 24 años, de sexo femenino, del quinto al noveno semestre correspondiente a todas las



secciones y un 83% no pertenece a una sociedad científica. Las bases de datos más usadas son Scielo con el 93%, Google Scholar 90%, Cicco-Conacyt 76%, Biblioteca Virtual en Salud Py 59%, Enfermería Basada en Evidencia con 24%; siendo prácticamente desconocidas Bireme 90%, Cinhal 92%, Lilacs 85%, Cuiden 83% y el IMT 66%. En la gestión documental el 91% analiza la información, 99% usa la información, las horas de uso diario es de 1 hora con 62%, un 97% no realiza monografías, 86% no realizó un artículo científico, y el 21% si tiene otro trabajo de investigación como protocolos y tesinas de grado.

Se concluye que el uso de herramientas informáticas para la gestión documental en trabajos de investigación en estudiantes de enfermería es escaso, si bien existen algunos indicios de su utilización, pero sigue siendo una tarea pendiente su difusión y aplicación.

Referencias Bibliográficas

Arratia F. Alejandrina. (2005). Investigación y Documentación Historica en Enfermería. Texto Contexto Enferm, Florianópolis., 14(4), 567-74.

Barrios Coronel Iván, Vargas Viveros Melisa, Echeverría Cuevas José, García Pérez Javier, Torales Benítez Julio.

(Octubre-Diciembre de 2017). Uso de tecnologías de la información y comunicación para investigación en estudiantes de medicina paraguayos. Educacion Medica Superior, 31(4), 1-9. Recuperado el 20 de Junio de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086421412017000400004&lng=es.

Cañedo Andalia, A. (2009). Recuperado el 20 de Junio de 2021, de PubMed: ¡Más de seis millones de artículos libres a texto completo en el área de la salud!: http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol19_4_09/aci02409.htm.

Carranza Lira, S., & Varela, A. (2007). Aptitud para la lectura critica de estudios de investigacion clinica en medicos especialistas en adestramiento. Ginecol Obstet Mex, 1(75), 678-681.

De Fenandez, I. C., Teppa, S., & Fernandez, M. C. (2011). Las TIC en el desarrollo de competencias en estudiantes del Programa de Medicina UCLA. Educare, 1(14), 5-27.

De la Vega, I. (Diciembre de 2019). Situación actual de la ciencia, la tecnología y la innovación (CTI) en Venezuela. SCielo, 37(4). Obtenido de



http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492010000400001

Galan, E., Manrique N, Villavicencio, E., Yllatopa, E., Peralta, M., & De la Cruz, W. (2005). Producción científica de los investigadores del pregrado de medicina humana del Perú, 1993-2003. CIMEL(10), 41-48.

Gálvez, A. (2001). Enfermería basada en la evidencia. Cómo incorporar la investigación a la práctica de los cuidados. Granada: Fundación Index;

Haynes RB; McKibbin KA; Wilczynski NL; Walter SD; Werre SR; Hedges Team. (2005). Optimal search strategies for retrieving scientifically strong studies of treatment from Medline: analytical survey. BMJ.(330(7501):1179).

Horna, P., Curioso, W., Guillen, C., Torres, C., & Kawano, J. (2002). Conocimientos, habilidades y características del acceso a internet en estudiantes de medicina de una universidad peruana. Anales de la Facultad de Medicina(63), 32-29.

Humani Navarro, M., Alegria Delgado, D., Lopez Sanchez, M., Tarqui Mamani, C., & Ormeño Caisafana, L. (Diciembre de 2011). Conocimientos, prácticas y habilidades sobre la búsqueda bibliográfica y percepción estudiantil sobre la

capacitación universitaria en investigación, en estudiantes de obstetricia. Educacion Medica, 14(4), 235-240.

Obtenido de https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S157518132011000400007

Jiménez Hernández, J A; Guillén Rios, J F ; Murillo Murillo, R. (Mayo de 2006). Fuentes de Documentación para Enfermería. Enfermeria Global(8).

Mejía, C. R. (Mayo de 2015). Factores Asociados al Uso Regular de Fuentes de Información de Estudiantes de Medicina de Cuatro Ciudades de Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica., 1(1).

Michon, F; Tummers, M. (2009). PLoS ONE. Recuperado el Mayo de 2017, de The Dynamic Interest in Topics within the Biomedical Scientific Community.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721680/>

Molina, A. J., Huamani, C., & Mayta Tristan, P. (2008). Apreciación estudiantil sobre la capacitación universitaria en investigación; estudio preliminar. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica(25), 325-329.

Molina, G. A., Dulzaides, I. M., & Mora, R. O. (2007). Recuperado el 20 de Junio de 2021, de MEDISUR. Nivel de



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



30
AÑOS

conocimientos sobre búsqueda de información en profesionales de la salud.:
<http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/viewArticle/310>.

Ospina, E. G., Reveiz Herault, I., & Cardona, A. F. (2005). Uso de base de datos bibliográficas por investigadores biomédicos latinoamericanos hispanoparlantes:

estudio transversal. Rev Panam Salud Pública(17), 230-236.

Sagasti, F; Guerrero, M. (2014). Situación de la ciencia y tecnología en América Latina. Estudios Internacionales.

Sanz-Valero J, Castiel LD. (2010). La búsqueda de información científica sobre las Ciencias de la Nutrición en Internet. Nutr Hosp., 3(31-7.).

Sanz-Valero J, Rojo-Alonso C. (2008). La Medicina del Trabajo en los Medical Subject Heading Terms (MeSH) y los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS). Med Segur Trab.(54(210):636.).

Tomey M.A, Alligood M.R. (2007). Modelos y teorías en enfermería (6 ed.). Barcelona: Elsevier.

Influencia de la temperatura de síntesis en el tamaño de las ZnO-Ps.
Determinación del área superficial.



C. 24. Ciencia e Ingeniería de Materiales

Título del Trabajo: Influencia de la temperatura de síntesis en el tamaño de las ZnO-Ps.

Determinación del área superficial.

Autor: Robles, Inés Mónica monicarobles1998@gmail.com

Profesor/a guía: Cruz María Karina; Runco Leal, Verónica

Adriana; veronica.runcoleal@fbqf.unt.edu.ar;

Cátedra de Química Inorgánica I / Instituto de Química Inorgánica / Facultad de Bioquímica,
Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

El óxido de zinc (ZnO) es un semiconductor de estructura tipo Wurtzita con una amplia banda de energía de 3.3 eV, su gran potencialidad para ser utilizado en dispositivos eléctricos y electrónicos se debe a las propiedades electrónicas y estructurales del ZnO, las cuales varían de acuerdo al método de síntesis empleado. El método de descomposición térmica de complejos inorgánicos, demostró ser muy efectivo para la obtención de diversos óxidos con un alto grado de pureza. **OBJETIVOS:** Sintetizar partículas de óxido de zinc (ZnO-Ps) a partir de la descomposición térmica controlada del complejo de $Zn[Zn(CN)_4]$ en el intervalo de temperaturas de 500°C a 800°C. Estudiar el efecto de la temperatura en el tamaño, forma y área superficial. **METODOLOGÍA:** Las ZnO-Ps fueron obtenidas por descomposición térmica del complejo precursor a 500°C, 600°C, 700°C y 800°C en atmósfera oxidativa, tanto el complejo como las ZnO-Ps se identificaron y caracterizaron por: espectroscopia infrarroja (TFIR), difracción de rayos X de polvo (DRXP), análisis termogravimétrico (TGA), análisis termodiferencial (DTA) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Se usó el método del Azul de Metileno para obtener el área superficial. **RESULTADOS PRINCIPALES:** El método de descomposición térmica del complejo de $Zn[Zn(CN)_4]$ en el rango de 500°C a 800°C, resultó una excelente elección para la obtención de ZnO-Ps con alto grado de pureza. Se comprobó la relación directa entre el aumento de temperatura y el tamaño de partículas obtenidas. Se comparó los valores obtenidos por DRXP y SEM de las ZnO-Ps. En la determinación del área superficial se comprobó que a menor tamaño de partícula mayor es el área superficial.

Palabras clave: ZnO-Ps - Descomposición térmica -Tamaño de partículas - Área superficial.



● Introducción

El óxido de zinc es un semiconductor de estructura tipo Wurtzita con una amplia banda de energía de 3.3 eV, es utilizado en la elaboración de catalizadores, dispositivos eléctricos y electrónicos además se caracteriza por su capacidad fotocatalítica contra especies químicas y biológicas. Varias investigaciones han comprobado que cuando el tamaño de partícula de los materiales disminuye del rango de micrómetros a nanómetros, se mejoran las propiedades como la difusividad, la resistencia mecánica, la reactividad química y las propiedades biológicas, dando como consecuencia una actividad antibacteriana mejorada. (da Silva, Caetano, Chiari-Andréo, Pietro & Chiavacci, 2019).

La síntesis a nano-escala de óxidos metálicos propicia el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, los cuales han demostrado tener el potencial para controlar bacterias gram-positivas y gram-negativas (Dadi, Azouani, Traore, Mielcarek & Kanaev, 2019).

La propiedad fotocatalítica de las ZnO-Ps dependen en gran medida del método de obtención y del tamaño de estas ya que a menor tamaño presentan mayor energía y área superficial, incrementando así su actividad fotocatalítica (Uribe-López y otros, 2021).

Dado que muchas de las propiedades de los óxidos semiconductores se deben a su tamaño y forma, es necesario disponer de técnicas de síntesis que puedan controlar esas variables. El método de descomposición térmica a partir de complejos inorgánicos, demostró ser muy efectivo para la obtención de óxidos con un alto grado de pureza, y permite variar las temperaturas de síntesis. (Gil, Guimpel, Paesano Jr, Carbonio & Gómez, 2012) (Navarro, Jorge, Negri, Saleh Medina, & Gómez 2015) (Runco Leal, Navarro, Bridoux, Villafuerte & Gómez, 2019).

Una de las técnicas más empleadas para determinar el tamaño y forma de las partículas es la microscopía electrónica de barrido (SEM). Otra técnica que permite obtener el tamaño aproximado de cristalito es la difracción de rayos x (DRX) ya que a partir de los perfiles de los “picos” o máximos de difracción se puede calcular el tamaño de los cristales por la ecuación de Scherrer y el método de Williamson-Hall. (Aparicio Ceja & Carbajal Arizaga 2010). La determinación del área superficial resulta de gran interés debido a la estrecha relación que existe entre el área superficial y el incremento en la actividad anti-microbiana y la



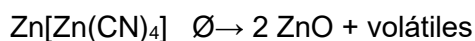
propiedad foto-catalítica. (Uribe-López, 2021), (Dadi, 2019), (da Silva, 2019). Existen diferentes métodos para determinar las propiedades adsorbentes, entre ellos se encuentran la determinación del área superficial, de la porosidad y los ensayos de adsorción, como el índice de azul de metileno, la adsorción de yodo y la adsorción de fenol, entre otras. El índice de azul de metileno es un ensayo de decoloración que indica la capacidad de un sólido poroso de adsorber una molécula que, por su tamaño, no puede acceder a todos los microporos (Kamaraj, Srinivasan, Assefa, Adugna & Kebede, 2020) (Zhang, Lan, Yang, Wei, Tan & Song, 2013).

- **Objetivos:**

Sintetizar partículas de óxido de zinc (ZnO-Ps) a partir de la descomposición térmica controlada del complejo de $Zn[Zn(CN)_4]$ en el intervalo de temperaturas de 500°C a 800°C. Estudiar el efecto de la temperatura de síntesis en el tamaño y el área superficial de las ZnO-Ps.

- **Materiales y métodos.**

Las ZnO-Ps fueron obtenidas por descomposición térmica del complejo precursor $Zn[Zn(CN)_4]$ a 500°C, 600°C, 700°C y 800°C en atmósfera oxidativa.



Caracterización del complejo y los óxidos obtenidos a 500°C, 600°C, 700°C y 800°C. El análisis diferencial térmico y termogravimétrico se realizó utilizando un equipo Shimadzu DTA/TGA 50 (desde temperatura ambiente hasta 800 C, bajo flujo de aire a 20 mL/min y una velocidad de calentamiento de 5°C por minuto). Los espectros infrarrojos se registraron con un equipo FTIR Perkin Elmer Spectrum GX, en la región de 4000–400 cm^{-1} , Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio electrónico SUPRA 55VP-25-83 se estimó el tamaño y la morfología de las partículas. Las difracciones de rayos X de polvo (DRXP) se realizaron en un instrumento XRD Rigaku Miniflex 300 con radiación $Cu K\alpha \lambda=1,5418 \text{ \AA}$ (rango en $2\theta = 10-90$, tiempo de conteo = 1 s y pasos = 0,02). El programa FULLPROF fue aplicado con el objetivo de refinar la estructura cristalina obtenida por el método de Rietveld. Una forma de pseudo-Voigt fue utilizada para ajustar los datos experimentales. Los datos refinados fueron las posiciones atómicas, los parámetros de red, la forma de los picos, los parámetros térmicos isotrópicos y los factores de ocupación.

A partir de los datos del difractograma y usando la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño de cristalito ya que esta ecuación relaciona la forma de la reflexión de un

plano de átomos y la dimensión del cristal en la dirección de ese plano (Barbosa, Barros, Porto & Gama, 2005). La ecuación es:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Dónde: D es tamaño del cristal en la dirección evaluada; λ es la longitud de onda de la radiación de rayos x; θ es el ángulo de difracción de la reflexión evaluada; k es una constante que depende de la forma del cristal, en el caso de partículas esféricas se considera $k = 0.9$; y β es el ancho que presenta la reflexión a la mitad de la altura, conocida como FWHM por sus siglas en inglés. Hay procesos en que las partículas nanométricas que se obtienen presentan varios defectos en su cristalinidad, como lo sería la preparación de partículas metálicas mediante la molienda. Las colisiones constantes entre partículas favorecen la formación de defectos, y estos defectos, a su vez, influyen en el ensanchamiento de las reflexiones en un DRX. En estos casos, el método Williamson-Hall ayuda a separar el ensanchamiento causado por los defectos del cristal y el ensanchamiento debido al tamaño de partícula. La expresión utilizada se basa en la ecuación de Scherrer y se describe como:

$$\beta \cos\theta = \frac{0,9\lambda}{D} + \eta \operatorname{sen}\theta$$

En donde η es la pendiente que se relaciona con la deformación (defectos) que es inversamente proporcional al

tamaño de la partícula (D). (Aparicio Ceja 2010).

Para estimadas las áreas superficiales accesibles al colorante Azul de Metileno (AM) se midió las absorbancias iniciales y de equilibrio de cada solución en un espectrofotómetro de UV spectroquant a una longitud de onda de 625 nm. (Girgis, Soliman & Fathy 2011).

$$S = \frac{y_m N a}{n}$$

S = área superficial (m^2/g)

y_m = es la cantidad de producto adsorbido (mmoles/g)

N = número de Avogadro

a = área molecular 120 \AA para el AM

n = factor de conversión 2 AM

$$y_m = \frac{(C_i - C_f) V}{g}$$

C_i = concentración inicial del AM ($2,67 \cdot 10^{-2}$ mmol)

C_f = concentración final del AM

V = volumen del AM

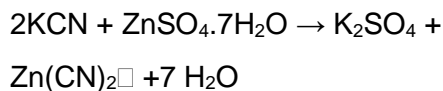
g = peso de muestra

Para relacionar la absorbancia medida con la concentración de azul de metileno de la solución se realizó una curva de calibración.

● Resultados y discusión

La obtención del complejo $\text{Zn}[\text{Zn}(\text{CN})_4]$ se realizó en tres etapas.

1° Etapa: Obtención del cianuro de zinc



2° Etapa: Obtención del complejo tetracianozincato de potasio



3° Etapa: Obtención del complejo tetracianozincato de zinc (Figura 1)

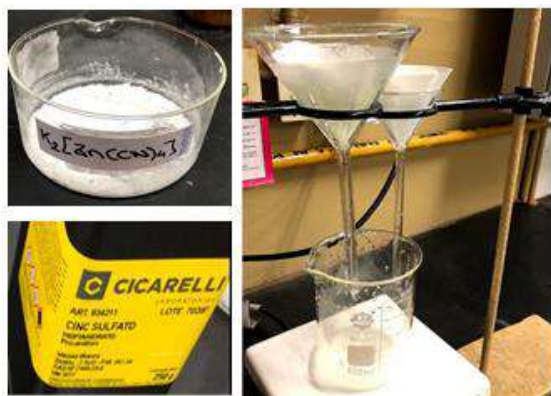
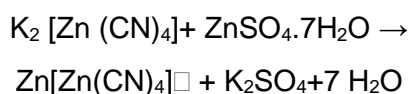


Fig. 1: Síntesis del complejo $\text{Zn}[\text{Zn}(\text{CN})_4]$

Los complejos obtenidos se identificaron por DRXP (Figura 2).

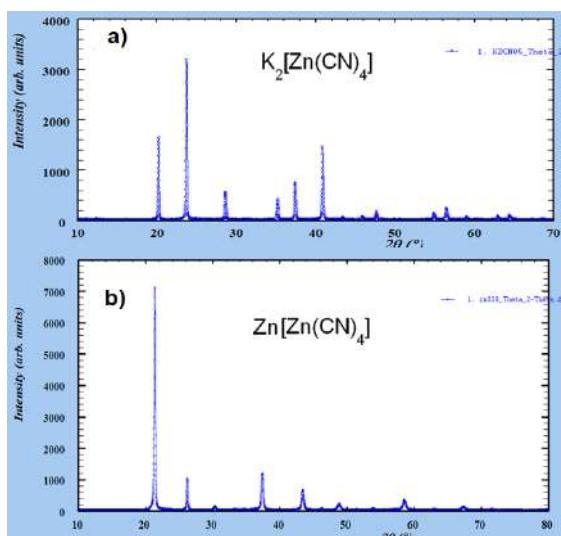


Fig. 2: Difractograma de los complejos a) $\text{K}_2[\text{Zn}(\text{CN})_4]$ y b) $\text{Zn}[\text{Zn}(\text{CN})_4]$

Los perfiles de difracción de los complejos fueron comparados con patrones, para el $\text{K}_2[\text{Zn}(\text{CN})_4]$ COD: 1010079, grupo espacial (GE) $Fd-3m$ sistema cristalino cúbico; el complejo $\text{Zn}[\text{Zn}(\text{CN})_4]$ COD: 4119770 GE: $Pn-30$ sistema cristalino cúbico. (Figura 3). La microscopía electrónica de barrido o SEM, muestra la morfología y microestructura del complejo con un aumento de 10.000 X y una barra de 1 μm . (Figura 4)

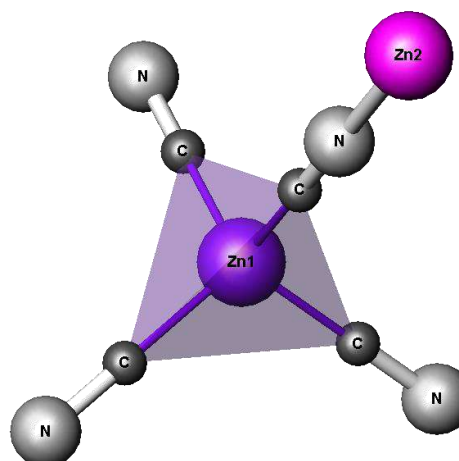


Fig. 3: Estructura cristalina del $\text{Zn}[\text{Zn}(\text{CN})_4]$

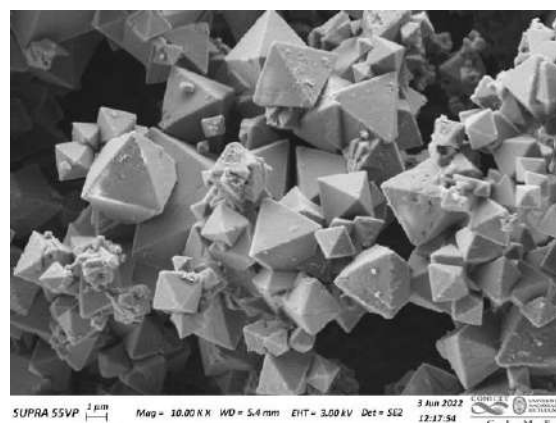
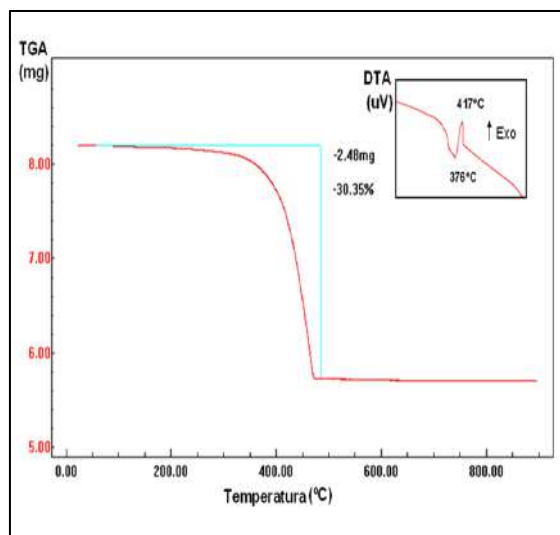


Fig. 4: SEM del $\text{Zn}[\text{Zn}(\text{CN})_4]$ aumento de 10.00 KX

En la Figura 5, se puede observar el análisis termodiferencial y termogravimétrico del complejo $Zn[Zn(CN)_4]$ la descomposición térmica se produce en atmósfera oxidativa (en presencia de aire) se obtiene el óxido de zinc a los 450°C (ZnO), el mecanismo de descomposición teórico coincide con los datos de la pérdida de masa experimental.



Complejo	Perdida de masa total calculada	Perdida de masa total observada
$Zn[Zn(CN)_4]$	69.30 %	69.65 %

Fig. 5: TGA y DTA del $Zn[Zn(CN)_4]$ y cuadro comparativo de la pérdida de peso.

En el espectro IR se observan bandas de estiramiento simétricas $\nu(CN)$ en el rango $2146\text{--}2117\text{ cm}^{-1}$ y se observan bandas de vibraciones a 595 y 430 cm^{-1} $\delta(M\text{--}C:N)$ y $\nu(M\text{--}C)$ respectivamente. (Figura 6)

Estas asignaciones están de acuerdo con los resultados informados anteriormente para diferentes cianometalatos (Gil 2012) (Navarro 2015) (Runco Leal 2019).

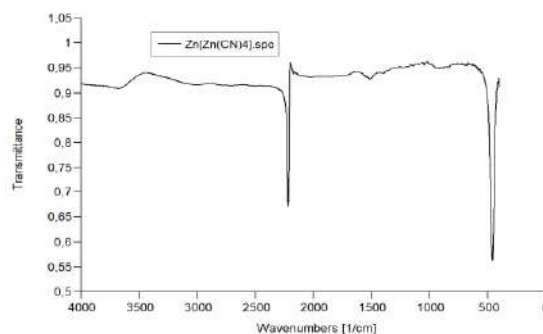


Fig. 6: FTIR - $Zn[Zn(CN)_4]$

Para obtener las ZnO -Ps se realizó la descomposición térmica a diferentes temperaturas a 500°C , 600°C , 700°C y 800°C en atmósfera oxidativa, los productos fueron identificados por DRXP (Figura 7), los perfiles de difracción fueron comparados con el patrón de ZnO COD: 2300112, grupo espacial (GE) $P63mc$ sistema cristalino hexagonal (Figura 8).

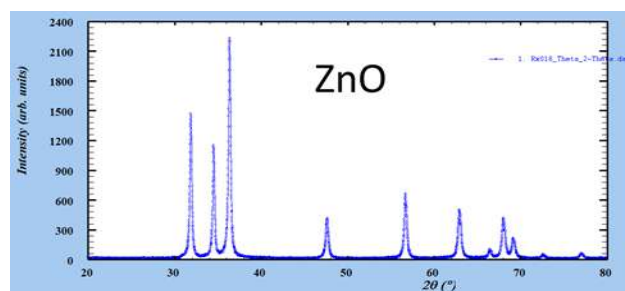


Fig. 7: Difractograma del ZnO

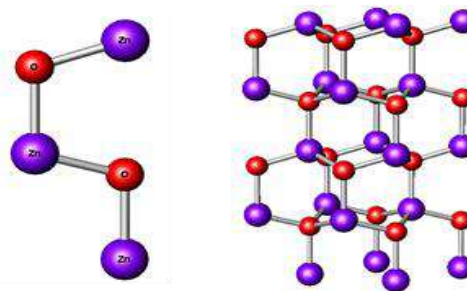


Fig. 8: Estructura cristalina del ZnO

En la Figura 9 se muestra la microscopía SEM, comparando el complejo precursor y el óxido obtenido a 500°C ambos en el mismo aumento de 50.000 X y una barra de 200 nm. (Figura 9)

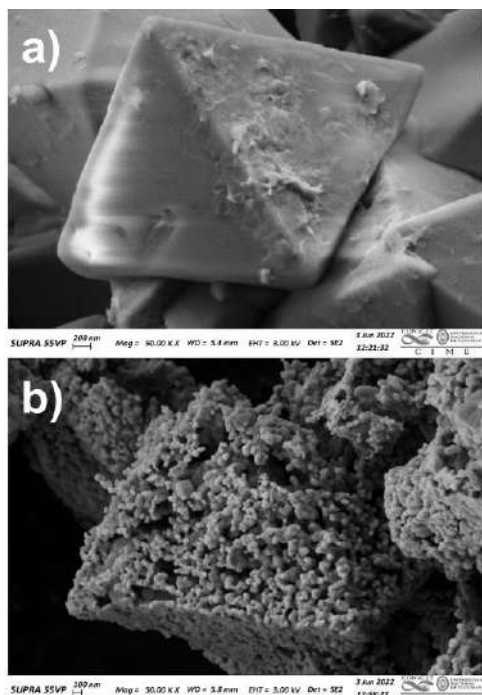


Fig. 9: SEM a) $Zn[Zn(CN)_4]$ b) ZnO obtenido a 500°C aumento de 50.00 KX

FTIR. Como se ve en la Fig. 10, los picos observados en la región entre 500 y 400 cm^{-1} se deben a las vibraciones de Zn-O de las ZnO -NP

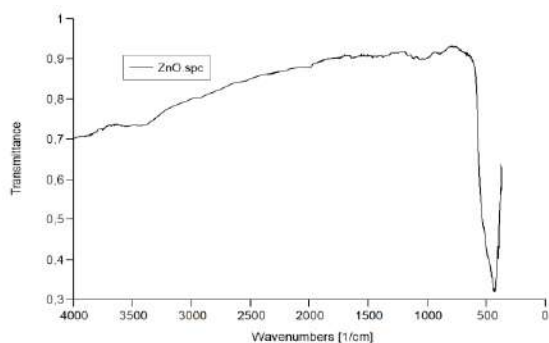


Fig. 10: FTIR - ZnO

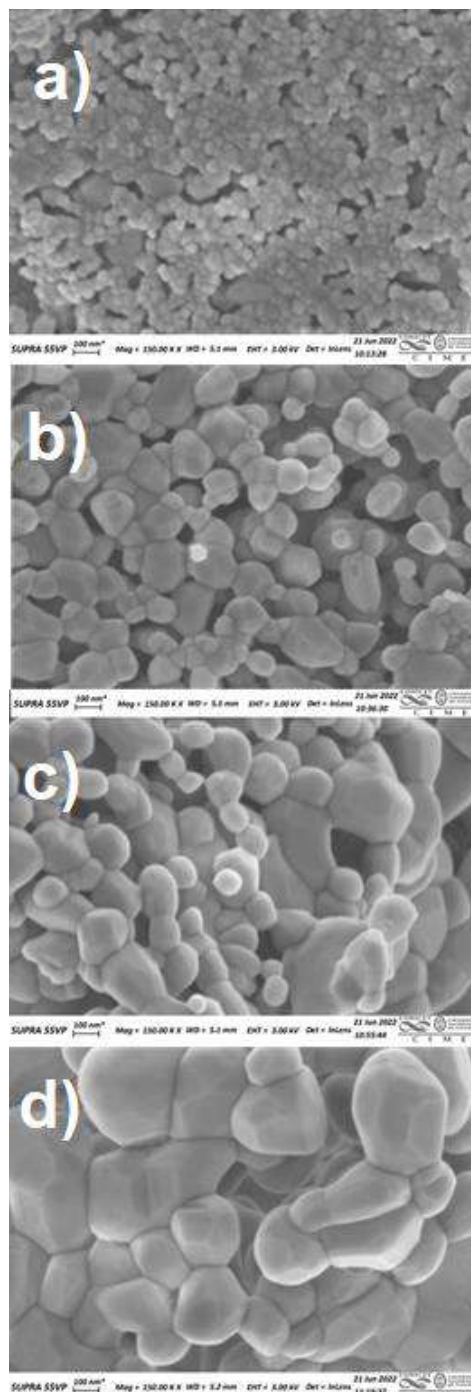


Fig. 11: SEM del ZnO a) 500°C b) 600°C c) 700°C d) 800°C aumento de 150.00 KX barra de 100nm
En la Figura 11 se pueden observar los SEM de los óxidos en un mismo aumento de 150.000 X, mostrando que a mayor

temperatura de síntesis es mayor el tamaño de las partículas de óxido de zinc, con un tamaño promedio para 500°C es de 45 nm, 600°C de 102 nm, 700°C de 186 nm y las de 800°C de 344 nm.

A partir de los datos del difractograma y usando la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño del cristalito. Los tamaños obtenidos a distintas temperaturas de síntesis se compararon con los calculados con el método Williamson-Hall, el cual tiene en cuenta el ensanchamiento causado por los defectos del cristal y el ensanchamiento debido al tamaño de partícula. (Tabla 1)

Temperatura (°C)	Scherrer (nm)	Williamson-Hall (nm)
800	73,63	81,1
700	62,72	61,5
600	54,74	47,9
500	36,14	35,1

Tabla 1: tamaño calculado de ZnO-Ps obtenidas a diferentes temperaturas, por los métodos de Scherrer y Williamson-Hall

Se estimaron las áreas superficiales accesibles al colorante Azul de Metileno (AM), observando que a mayor temperatura de síntesis es menor el área superficial. Los valores del área superficial se expresan en unidades de m² por gramo de ZnO. (Tabla 2)

Temperatura (°C)	Absorbancia	S(m ² /g)
800	0,818	96,58
700	0,810	118,86
600	0,804	136,44
500	0,793	167,57

Tabla 2: Relación entre la temperatura y el área superficial (S)

- Conclusiones

La síntesis de ZnO-Ps a partir de la descomposición térmica del complejo Zn[Zn(CN)₄], resultó ser un método muy versátil para la obtención de partículas en un amplio rango de tamaños de 45 nm a 344 nm, con alto grado de pureza.

La comparación entre los tamaños de cristalitos por la ecuación de Scherrer y el método Williamson-Hall, dejó ver que la diferencia de tamaños entre los métodos es mayor a medida que las partículas son más grandes y con mayor variedad de formas. La microscopia electrónica muestra mayor diferencia entre los tamaños de las partículas de ZnO, que los métodos matemáticos basados en la forma y ancho de los picos de los difractogramas, esto es coherente con la bibliografía consultada ya que los métodos matemáticos son útiles y comparables a los obtenidos por SEM en partículas en nanoescala, es decir

en partículas cuyo tamaño se encuentren comprendido entre 1 nm y 100 nm. Solo las partículas de ZnO obtenidas a 500°C son nanopartículas de tamaño y forma uniforme.

La determinación del área superficial varía gradualmente con el tamaño de partículas, en las ZnO-Ps más pequeñas se observa una mayor área superficial, lo que las hace muy interesantes para su empleo como agente antimicrobiano y su uso como adsorbente de contaminantes.

- Bibliografía

Aparicio Ceja, M. E., & Carbajal Arizaga, G. G. (2010). Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 3(2), 62-72.

Barbosa, R., Barros, B. S., Porto, R. I., & Gama, L. (2005). Síntese e caracterização do espinélio Zn₇Sb₂O₁₂ Dopado com Terras Raras. *Revista matéria*, 10(2), 364-369.

Bol. Soc. Esp. Ceram. V., 45 [4] 283-288 (2006).

da Silva, B. L., Caetano, B. L., Chiari-Andréo, B. G., Pietro, R. C. L. R., & Chiavacci, L. A. (2019). Increased

antibacterial activity of ZnO

nanoparticles: Influence of size and surface modification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 440-447.

Dadi, R., Azouani, R., Traore, M., Mielcarek, C., & Kanaev, A. (2019). Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109968.

Etcheverry, L. P., Flores, W. H., Silva, D. L. D., & Moreira, E. C. (2018). Annealing effects on the structural and optical properties of ZnO nanostructures. *Materials Research*, 21.

Gil, D. M., Guimpel, J., Paesano Jr, A., Carbonio, R. E., & Gómez, M. I. (2012). Y [Fe_{1-x}Co_x (CN)₆]·4H₂O (0 ≤ x ≤ 1) solid solutions: Synthesis, crystal structure, thermal decomposition and spectroscopic and magnetic properties. *Journal of Molecular Structure*, 1015, 112-117.

Girgis, B. S., Soliman, A. M., & Fathy, N. A. (2011). Development of micro-mesoporous carbons from several seed hulls under varying conditions of activation. Microporous and



- Mesoporous Materials, 142(2-3), 518-525.
- Kamaraj, M., Srinivasan, N. R., Assefa, G., Adujna, A. T., & Kebede, M. (2020). Facile development of sunlit ZnO nanoparticles-activated carbon hybrid from pernicious weed as an operative nano-adsorbent for removal of methylene blue and chromium from aqueous solution: extended application in tannery industrial wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100540.
- Navarro, M. C., Jorge, G., Negri, R. M., Saleh Medina, L. M., & Gómez, M. I. (2015). Synthesis and characterization of Bi_{1-x}NdxFeO₃ (0 ≤ x ≤ 0.3) prepared by thermal decomposition of Bi_{1-x}Ndx [Fe(CN)₆]·4H₂O. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 122(1), 73-80.
- Runco Leal, V., Navarro, C., Bridoux, G., Villafuerte, M., & Gómez, M. I. (2019). Preparation and characterization of a new series of solid solutions of Bi_{1-x}YxFeO₃ (0 < x < 1) from the thermal decomposition of hexacyanoferrates doped with yttrium. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 135(6), 3259-3268.
- Uribe-López, M. C., Hidalgo-López, M. C., López-González, R., Frías-Márquez, D. M., Núñez-Nogueira, G., Hernández-Castillo, D., & Alvarez-Lemus, M. A. (2021). Photocatalytic activity of ZnO nanoparticles and the role of the synthesis method on their physical and chemical properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 404, 112866.
- Zhang, F., Lan, J., Yang, Y., Wei, T., Tan, R., & Song, W. (2013). Adsorption behavior and mechanism of methyl blue on zinc oxide nanoparticles. *Journal of nanoparticle research*, 15(11), 1-10.
- **Financiamiento**
- Los autores agradecen el financiamiento del Proyecto PIUNT 26D-616.
- A la SCAIT por brindarnos la posibilidad de viajar y participar.
- Un agradecimiento especial al Licenciado en Química Gonzalo Lascano por su gran incentivo y apoyo en este proyecto.

Análisis cuantitativo de las condiciones ambientales en espacios de exhibición y de almacenamiento en un museo de historia natural y su relación con el deterioro de los ejemplares biológicos



C. 25. Ciencia, tecnología e innovación

Análisis cuantitativo de las condiciones ambientales en espacios de exhibición y de almacenamiento en un museo de historia natural y su relación con el deterioro de los ejemplares biológicos

Autor: Barroso, Patricia Elizabeth; patriciaebarroso@gmail.com

Profesor/a guía: Sandoval Salinas, María Leonor; msandoval@csnat.unt.edu.ar; Zamora, María Silvana; mariasilvanazamora@gmail.com

Universidad Nacional de Tucumán (UNT)

Resumen

Considerando la importancia de las condiciones de almacenamiento y/o exhibición del patrimonio, en relación con los daños irreversibles que pueden ocasionar, y teniendo en cuenta que los Museos de Historia Natural nacionales no cuentan con estudios sistematizados sobre el grado de adecuación de las condiciones ambientales a la sensibilidad de sus Colecciones Biológicas (CB), se pretende elaborar lineamientos de conservación preventiva para la exhibición y el almacenamiento de las CB del Museo Lillo de Ciencias Naturales de la Fundación Miguel Lillo (Tucumán, Argentina), basados en la caracterización colorimétrica de los especímenes biológicos y en la cuantificación de las condiciones ambientales.

Se seleccionaron dos especímenes de características similares (misma especie y preparación general) albergados en este museo, uno en una sala de exhibición y otro en el área de almacenamiento; y mediante una metodología objetiva estandarizada, se cuantificó el color de los mismos, utilizando un espectrorradiómetro portátil *JAZ Ocean Optics*. En paralelo, se registraron los valores de temperatura y humedad relativa, empleando instrumentos de medición automáticos, *data loggers HOBO*, que permitieron determinar niveles medios y fluctuaciones horarias y diarias; y los niveles de iluminancia natural y artificial, con un luxómetro *Minolta T-1M*.

En este trabajo se presentan resultados preliminares (vinculados a un estudio enmarcado en una beca EVC-CIN) que parecen indicar que ambos espacios no brindarían las condiciones ambientales adecuadas para la correcta conservación de especímenes biológicos,



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



encontrándose los niveles de las variables analizadas por fuera de lo esperado de acuerdo a la normativa vigente.

Palabras clave: Colecciones Biológicas, Conservación Preventiva, Patrimonio.



Introducción

Los ejemplares albergados en los Museos de Historia Natural (MHN), y la información asociada a ellos, suelen ser la base de numerosos estudios en el marco de diversas disciplinas (Izquierdo Moya, 2013; Rey Fraile, 2013). Las Colecciones Biológicas (CB) de los MHN contienen evidencia de la vida pasada en nuestro planeta (Martínez Meyer, 2005) y pueden documentar la existencia de hábitats en desaparición o especies en extinción. En este sentido, las CB representan el patrimonio natural de un país o región (Mesa Ramírez y Bernal, 2005) y son una herramienta invaluable tanto para el avance de las Ciencias Biológicas, contribuyendo al desarrollo científico y cultural de un país, como para la protección de la biodiversidad.

Los MHN se consideran los principales custodios de las CB, y su rol en la conservación preventiva ha cobrado una importancia particular. Las CB presentan un envejecimiento o deterioro natural (Mesa Ramírez y Bernal, 2005) y pueden además presentar un deterioro adicional ocasionado por un manejo inadecuado de determinados factores extrínsecos, llamados agentes de deterioro (Thomson, 1986; Pérez et al., 1998; Michalski,

2009a,b,c; Herráez et al., 2014). Entre éstos, la temperatura y la humedad relativa a niveles inadecuados, las radiaciones con características contraindicadas, las fuerzas físicas y la disociación (IPCE, 2013), son responsables en gran medida de los deterioros evitables evidenciados en las últimas décadas. La falta de evaluación, y de la posterior gestión, de los riesgos a los que se someten las CB, tanto en espacios de almacenamiento como de exhibición, se traducen lentamente en la pérdida de valor en el acervo (Pedersoli et al., 2016), ya que el deterioro reduce la vida útil de los ejemplares y, por lo tanto, limita la transferencia del conocimiento y la perpetuidad del uso y disfrute de las CB. Dada la importancia que tienen las CB para la comunidad científica y la sociedad, resulta necesario garantizar su integridad material por medio de una adecuada conservación preventiva.

El término conservación preventiva hace referencia a acciones específicas sobre el contexto próximo a una colección para prevenir o reducir en lo posible los deterioros. El objetivo es preservar al máximo la composición original de la colección prolongando su vida útil (Simmons, 2002; Michalski, 2014). Se la reconoce actualmente como el medio por excelencia para preservar y perpetuar la



integridad del patrimonio y la información científica asociada.

Se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con los cambios temporales en la coloración de diversos especímenes en las colecciones de museos (por ejemplo, en relación a especímenes de aves y mamíferos, McNett y Marchetti, 2005; Pohland y Mullen, 2006; Quesada y Senar, 2006; Doucet y Hill, 2009; Cassey et al., 2010; Sandoval et al., 2018). En todos los casos, los resultados mostraron diferencias sustanciales en los espectros de reflectancia medidos en las muestras más nuevas y más antiguas. El color de los ejemplares es susceptible de deteriorarse con el tiempo debido a la degradación química o estructural de los pigmentos, lo que puede resultar en la alteración de sus propiedades ópticas (Cassey et al., 2012). Aún más, el cambio de color de los ejemplares se ha reconocido explícitamente como un posible factor limitante en la investigación sobre material de colección (Doucet y Hill, 2009; Davis et al., 2013). A pesar de ello, ninguno de estos estudios ha considerado de manera explícita, y menos aún ha cuantificado, las condiciones ambientales a las que estuvieron sometidos los ejemplares estudiados, responsables últimas del grado de deterioro observado.

Los agentes de deterioro pueden causar daño del tipo físico-mecánico (luz visible, ultravioleta -UV- e infrarroja -IR-, temperatura, humedad relativa -HR-, fuego, agua, fuerzas físicas directas -manipulación incorrecta, golpes, etc.-), químico (contaminantes -fungicidas, insecticidas, sustancias preservantes, etc.-) y/o biológico (pestes -bacterias, hongos, insectos, etc.-). Diversas investigaciones han estudiado las consecuencias de la influencia de los agentes de deterioro sobre los materiales con el fin de brindar recomendaciones para su adecuada conservación, pero raramente se han enfocado en colecciones de MHN en general y en CB en particular, aún cuando los materiales biológicos pueden sufrir daños ocasionados por cualquiera de estos agentes cuando los riesgos no se gestionan adecuadamente (National Park Service, 1999, 2005; Pedersoli et al., 2016).

En relación con lo expuesto, el plan de trabajo propuesto, para llevar a cabo las actividades que se enmarcan en una Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas otorgada por el Consejo Interuniversitario Nacional (Becas EVC-CIN, Argentina), se enfoca en la generación de conocimiento en relación al deterioro de ejemplares biológicos exhibidos en el Museo Lillo de Ciencias Naturales (MUL) de la Fundación

Miguel Lillo, Tucumán, y su contrastación con el deterioro de ejemplares similares almacenados. Dicho deterioro será estimado mediante la determinación instrumental cuantitativa de los cambios de color entre los ejemplares sometidos a diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad e iluminación (almacenamiento *versus* exhibición) y será relacionado con las condiciones ambientales actuales de estos espacios. Por último, se aspira a aportar recomendaciones que, en términos de la conservación preventiva, optimicen el almacenamiento y la exhibición de las CB en los MHN. Se pretende elaborar propuestas concretas y viables para la institución, en relación al acondicionamiento ambiental de estos espacios, para asegurar la conservación preventiva de sus ejemplares.

En este trabajo se presentan los resultados de la toma y el análisis de los datos ambientales. Los resultados de la toma y el análisis de los datos colorimétricos serán presentados más adelante, cuando se disponga de la totalidad de los datos previstos.

Objetivos

Considerando a modo de hipótesis que:

1. Las condiciones ambientales pueden ser caracterizadas cualitativa y cuantitativamente según el emplazamiento geográfico y la materialidad de las CB.
2. El color de los especímenes biológicos que constituyen las CB depende de las condiciones ambientales y puede considerarse un indicador del deterioro.
3. Existe una relación cuantificable entre los patrones de cambio de color y las condiciones ambientales.
4. Las condiciones ambientales de los espacios de exhibición y almacenamiento pueden adaptarse a la sensibilidad de las CB que albergan optimizando su conservación preventiva.

Se plantearon objetivos específicos vinculados con: seleccionar y clasificar genéricamente las CB en una sala de exhibición y en un área de almacenamiento del MUL; registrar y caracterizar la temperatura, humedad relativa e iluminación de los espacios seleccionados; determinar cuantitativamente el color de los ejemplares seleccionados; correlacionar los patrones de cambio de color con las condiciones ambientales; aportar recomendaciones que garanticen la conservación preventiva de las CB en los espacios estudiados; para así, finalmente, a modo de objetivo general, lograr elaborar lineamientos de conservación preventiva



para la exhibición y el almacenamiento de las CB del MUL, basados en la estimación del deterioro del material biológico, mediante su caracterización colorimétrica, y en la cuantificación de condiciones ambientales.

Elaborar los lineamientos previamente mencionados, resulta relevante, sobre todo, teniendo en cuenta que en los MHN nacionales no se cuenta con estudios sistematizados sobre el grado de adecuación de las condiciones ambientales a la sensibilidad de las CB, ni datos basados en evidencia empírica obtenida en los museos locales que permitan evaluar la existencia y la magnitud del daño que pueden presentar los ejemplares biológicos almacenados y/o exhibidos en distintos espacios. Así, las conclusiones del análisis propuesto, luego de generalizarse las prácticas de gestión de datos, buscan reflejarse en un documento metodológico final, a incorporar en un Plan de Conservación Preventiva, que guíe las intervenciones en el museo y el manejo de sus colecciones por parte del personal involucrado.

Materiales y métodos

El desarrollo del trabajo se realizó mediante un relevamiento previo y la actualización bibliográfica sobre el estado

del arte de la temática abordada, llevando a cabo puestas en común y la discusión en encuentros periódicos con la directora y co-directora del plan de trabajo.

Los primeros meses de labor, estuvieron orientados a la selección y análisis de reportes técnicos, manuales y guías relacionados con el cuidado, el manejo y la conservación preventiva de bienes culturales en general y de colecciones biológicas en particular, como así también de seguimiento y análisis de las condiciones ambientales. De este modo, se pretendía la incorporación de conocimientos y definiciones básicas para la ampliación del marco teórico del plan de trabajo.

Así, sentadas las bases teóricas del proceso, el martes 23 de noviembre del 2021 se realizó la primera visita al Museo Miguel Lillo de Ciencias Naturales (MUL), en Tucumán, Argentina.

De la consideración de que los bienes patrimoniales expuestos en museos forman parte de un *ecosistema*, se desprende que no es posible abordar de forma aislada el estudio de las condiciones ambientales que caracterizan a los medios en los que se encuentran, limitándose solo a su entorno inmediato; por el contrario, es necesario tener en cuenta que los bienes

patrimoniales están expuestos a diferentes sistemas: el externo, el edificio y el interno (Herráez et al., 2014)

Partiendo de un análisis del sitio o sistema externo inmediato, es necesario considerar que el MUL se ubica en la ciudad de San Miguel de Tucumán, en la provincia de Tucumán, Argentina; presentándose en conjunto con la Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo de la Universidad Nacional de Tucumán y un jardín botánico (Fig. 1); en un contexto urbano con gran presencia de vegetación y próximo a importantes avenidas de circulación vehicular.

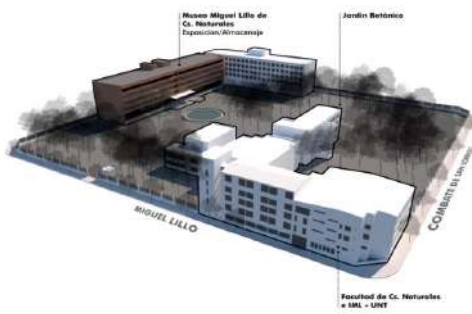


Figura 1. Análisis del emplazamiento del Museo Miguel Lillo de Ciencias Naturales (elaboración propia).

Durante la primera visita se llevó a cabo un relevamiento arquitectónico y fotográfico minucioso de dos ámbitos espaciales del inmueble, que fueron seleccionados en función de la ubicación de los ejemplares cuyas características colorimétricas se

decidió estudiar. Tales ejemplares fueron en principio dos especímenes taxidermizados de puma: un espécimen albergado en el **área de reserva/almacenamiento**, sin control de las condiciones ambientales (temperatura, HR e iluminación naturales), y otro espécimen albergado en una de las **salas de exposiciones/exhibiciones permanentes**, en un ambiente con control de las condiciones ambientales (uso permanente y continuo de aire acondicionado e iluminación artificial).

Así, la toma de datos en lo que respecta a las condiciones ambientales y la toma de datos colorimétricos se realizó en dos ámbitos espaciales: el anexo del MUL, en el cuarto piso del Edificio de Zoología de la FML (área de reserva/almacenamiento; Fig. 2) y en una de las salas de exposiciones/exhibiciones permanentes del MUL, en la planta baja del Edificio de Zoología de la FML (Fig. 3)

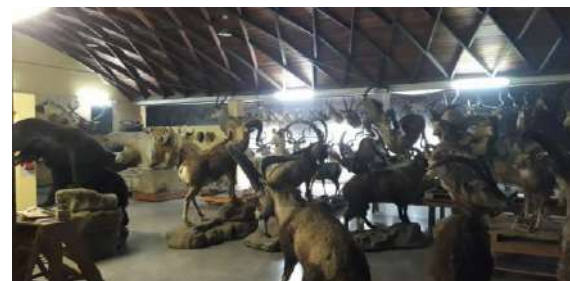


Figura 2. Área de reserva/almacenamiento en el cuarto piso del Edificio de Zoología de la Fundación Miguel Lillo.



Figura 3. Salas de exposiciones/exhibiciones permanentes del MUL, en la planta baja del Edificio de Zoología de la Fundación Miguel Lillo.

El Edificio de Zoología de la FML se constituye como un prisma de cuatro niveles de altura, cuyas caras de mayores dimensiones se orientan hacia el norte y hacia el sur. Resulta relevante mencionar que, hacia el norte, el diseño del mismo cuenta con aleros y parasoles, que brindan una protección de las aberturas vidriadas frente a la incidencia de la radiación solar, a lo que se agrega la fuerte presencia de vegetación en la misma orientación (Fig. 4).

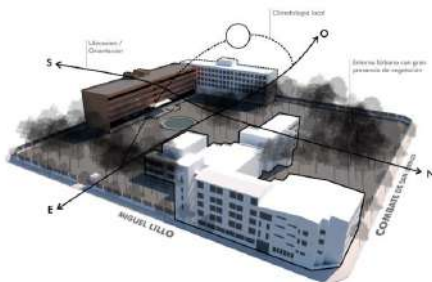


Figura 4. Análisis de la envolvente del Edificio de Zoología de la FML frente a la climatología local y los puntos cardinales (elaboración propia).

Dadas las características del edificio estudiado, *a priori* de la toma de datos, en el área de reserva/almacenamiento se consideró la posibilidad de registrar mayores variaciones ambientales, debido a sus dimensiones, a la ausencia de sistemas de acondicionamiento artificial del aire y contacto con el exterior importante, puesto que cuenta con una envolvente que carece de las condiciones adecuadas para brindar protección frente a la incidencia de materia (humedad, contaminantes) y energía (calor, radiación electromagnética). Teniendo en cuenta que esta envolvente debería comportarse como un límite de protección frente a los factores externos, se la consideró *a priori* inadecuada, puesto que se encuentra sumamente deteriorada: los cierres vidriados presentan amplias roturas que permiten un contacto directo de las colecciones almacenadas con el medio externo (Fig. 5). A esto se suma el poco control de la apertura y el cierre de los cerramientos mencionados, así como del encendido y apagado de la iluminación artificial con la que cuenta el espacio.



Figura 5. Condiciones inadecuadas de los cerramientos vidriados del depósito de almacenamiento.

En las salas de exposiciones/exhibiciones permanentes, por su parte, sectorizadas en la planta baja del edificio, se estimó la posibilidad de registrar variaciones ambientales menores, por la presencia de sistemas de acondicionamiento del aire en constante funcionamiento y por la existencia de una envolvente que permite mayores condiciones de estanqueidad, a su vez protegida por la fuerte presencia de vegetación exterior.

La metodología que se aplicó puede analizarse considerando dos etapas fundamentales, en las que se aplicaron distintos medios técnicos y materiales.

Primera etapa

Se inició con una primera etapa en la que se buscó obtener datos cuantitativos de las variables ambientales de interés: temperatura, humedad relativa y luz visible. Estos datos permitieron la definición de las condiciones ambientales interiores y exteriores de los espacios en los que se sitúan los ejemplares estudiados.

El registro, análisis y caracterización de las condiciones ambientales se realizó de manera periódica -de noviembre a diciembre del año 2021, cada semana-, colocando instrumentos de medición en un punto fijo, ubicado junto al ejemplar, y un punto móvil, próximo al mismo; y de manera continua -de diciembre a febrero y de marzo a junio del año 2022-, situando un instrumento de medición en el área de reserva/almacenamiento y otro en una de las salas de exposiciones/exhibiciones permanentes.

También se dispusieron instrumentos de medición exteriores -desde noviembre del año 2021 a junio del año 2022-, que permitieron definir las condiciones higrotérmicas del sistema externo, altamente influenciado por los factores naturales y que, por tal razón, pudieron ser luego constatados, con los datos climatológicos locales.

Para la definición general de las condiciones de iluminación de los espacios, se realizó el registro de datos durante una semana para cada caso, colocando nuevamente los instrumentos de medición en dos puntos: uno fijo junto al ejemplar y otro móvil en sectores próximos a las fuentes de luz - naturales y artificiales - más cercanas (Fig. 6).



Figura 6. Data loggers HOBO, ubicados con orientación a las fuentes de luz más cercanas, en el área de reserva/almacenamiento (cuarto piso).

Por otro lado, para una caracterización ambiental más completa, se registraron datos de iluminancia real en puntos críticos sobre los ejemplares y en sus entornos (Figs. 7, 8), como así también sobre muestras materiales de control (Fig. 9).

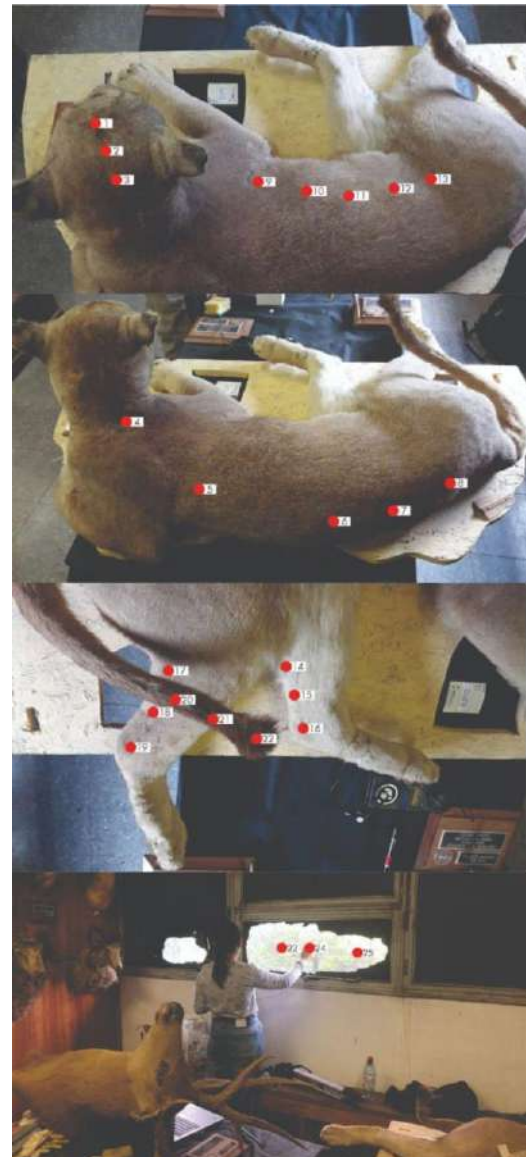


Figura 7. Puntos seleccionados para la toma de niveles de iluminación en el área de reserva/almacenamiento (parte superior de la cabeza del ejemplar: 3 puntos; dorso del cuerpo: 5 puntos; lateral del cuerpo: 5 puntos; cara externa del miembro inferior derecho: 3 puntos; cara interna del miembro inferior izquierdo: 3 puntos; mitad distal de la cola: 3 puntos; puntos sobre el vidrio transparente de la ventana próxima).



Figura 8. Puntos seleccionados para la toma de niveles de iluminación en una de las salas de exposiciones/exhibiciones permanentes (puntos sobre ejemplar - análogos a los del ejemplar almacenado-, pared posterior y vidrio transparente de la vitrina más próxima).

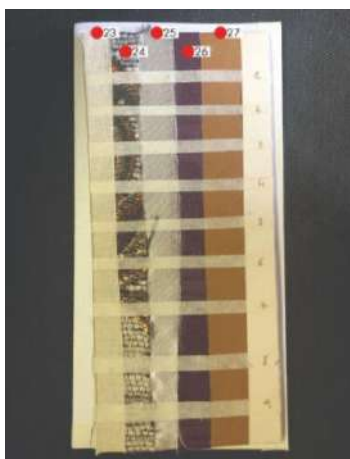


Figura 9. Muestras de materiales colocados en una superficie próxima a la

de los especímenes biológicos estudiados. De izquierda a derecha: lino, seda, tafetán de algodón, cartulina 60% algodón, papel gran gramaje con alta carga de algodón.

Para esta etapa fue imprescindible la utilización de dos instrumentos de medición que permitieron obtener datos certeros y objetivos:

- *Data loggers HOBO*: estos aparatos automáticos de medición continua fueron seleccionados, pues se requería la obtención de datos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (%) en pocos puntos de medición y de una forma continua, tal que fuera posible adquirir una cantidad de información suficiente para realizar posteriormente comparaciones diarias y estacionales.
- Luxómetro *Minolta T-1M*: permitió calcular la iluminancia real incidente en la superficie de los puntos críticos definidos sobre los ejemplares estudiados, sus entornos espaciales inmediatos (paredes, vitrinas, superficies y mesadas de manipulación) y las muestras materiales seleccionadas, expresando los datos en lux.

Segunda etapa

Una vez obtenidos y validados los datos ambientales obtenidos, la segunda etapa metodológica consistió en organizar la información y realizar un análisis estadístico, que resulta relevante puesto que permitió una mejor interpretación de las representaciones gráficas que arrojaron los instrumentos de medición a lo largo de todo el proceso.

Para el tratamiento estadístico de los datos se definieron:

- *Periodos de observación:* las variables fueron analizadas para dos situaciones: ciclos de fluctuación diaria y estacional (considerando estaciones críticas: verano, entre los meses de diciembre, enero y febrero, y otoño-invierno, entre los meses de marzo, abril, mayo y junio).

- *Parámetros estadísticos básicos:* una vez organizados los datos de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa arrojados por los *data loggers*, se los caracterizó desde un punto de vista estático, obteniéndose valores de tendencia central -medias- y valores de dispersión -extremos, oscilaciones y desviaciones-, todos ellos relativos a las muestras obtenidas en los periodos definidos con anterioridad.

- *Tabulación y esquematización gráfica:* los instrumentos utilizados para obtener los datos tienen la particularidad de contar con un paquete de software de análisis y gráficos para poder registrar, ver, graficar y analizar los valores obtenidos (Fig. 10). Al mismo tiempo, brindan una tabulación, muy elemental, que muestra los datos obtenidos por fecha y hora (Fig. 11).

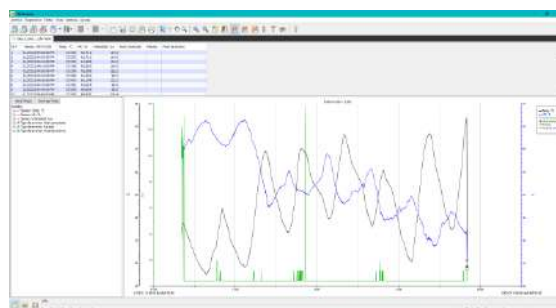


Figura 10. Lectura de datos por el software “HOBOWare”.

Nº	Fecha	Temp, °C	HR, %	Intensidad, Lux	Heet conectado	Parado	Final de archivo
1	11/23/21 04:00:00 PM	27,333	61,711	114,3			
2	11/23/21 04:05:00 PM	27,333	61,711	114,3			
3	11/23/21 04:10:00 PM	27,333	61,599	114,3			
4	11/23/21 04:15:00 PM	27,338	61,563	114,3			
5	11/23/21 04:20:00 PM	27,338	61,200	122,2			
6	11/23/21 04:25:00 PM	27,382	61,232	98,5			
7	11/23/21 04:30:00 PM	27,431	61,179	122,2			
8	11/23/21 04:35:00 PM	27,481	61,004	98,5			
9	11/23/21 04:40:00 PM	27,530	60,829	98,5			
10	11/23/21 04:45:00 PM	27,530	60,829	98,5			

Figura 11. Tabulación elemental con datos ordenados por fecha y hora, arrojada por el software “HOBOWare”.

Sin embargo, para complementar y analizar mejor las planillas y curvas de evolución temporal arrojadas por los instrumentos de medición -una vez

definidos los parámetros estadísticos básicos a obtener-, se procedió a organizar esta información por medio de otra tabulación, que dio lugar a un análisis más sistemático. Este procedimiento fue facilitado por la utilización de hojas de cálculos, en las que se organizó la base de datos y se obtuvieron automáticamente los parámetros estadísticos requeridos en cada caso (Fig. 12).

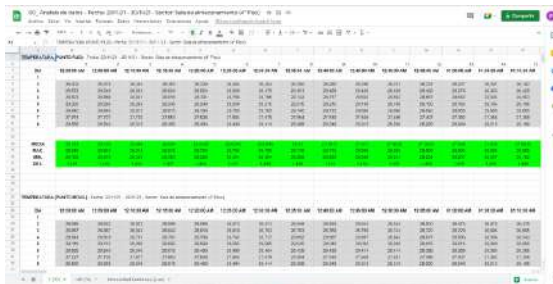


Figura 12. Hoja de cálculo para la organización de datos y obtención de parámetros estadísticos.

Resultados y discusión

Teniendo en cuenta que la interpretación de la información estadística permite posteriormente la definición de las conclusiones del análisis (Herráez et al., 2014), se procedió a caracterizar los diferentes sistemas: externo e interno.

A continuación, se muestran las gráficas semanales de humedad relativa, temperatura e intensidad luminosa, para los dos espacios analizados (Figs. 13 a 18).

Punto fijo - Área de reserva/almacenamiento (4° Piso)

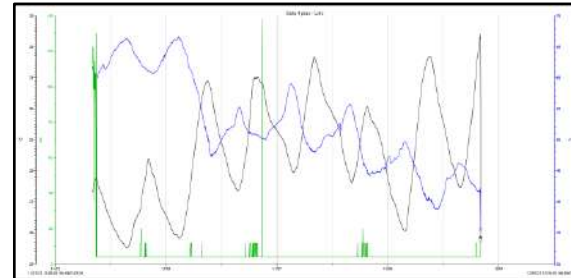


Figura 13. Gráfico de superposición de las curvas de evolución de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa para punto fijo en sala de almacenamiento. Semana 23-11-21 a 30-11-21. — Temp. (°C), — HR (%), — Intensidad (Lux).

Punto móvil - Área de reserva/almacenamiento (4° Piso)

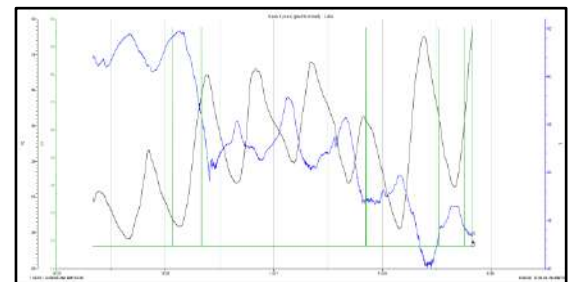


Figura 14. Gráfico de superposición de las curvas de evolución de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa para punto móvil en sala de almacenamiento. Semana 23-11-21 a 30-11-21. — Temp. (°C), — HR (%), — Intensidad (Lux).

Punto fijo - Sala de exposiciones/exhibiciones permanentes (planta baja)

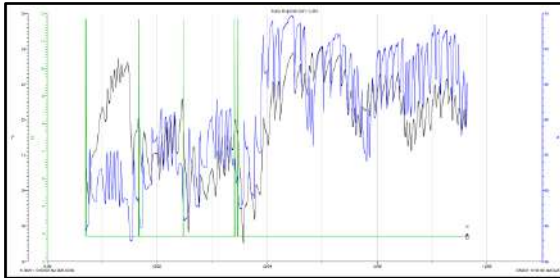


Figura 15. Gráfico de superposición de las curvas de evolución de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa para punto fijo en sala de exposiciones permanentes. Semana 30-11-21 a 07-12-21. — Temp. (°C), — HR (%), — Intensidad (Lux).

Punto móvil - Sala de exposiciones/exhibiciones permanentes (planta baja)

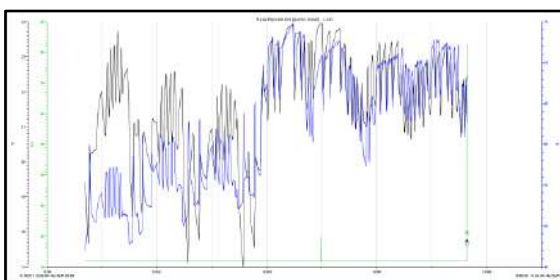


Figura 16. Gráfico de superposición de las curvas de evolución de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa para punto móvil en sala de exposiciones permanentes. Semana 30-11-21 a 07-12-21.

21. — Temp. (°C), — HR (%), — Intensidad (Lux).

Punto fijo - Área de reserva/almacenamiento (4° Piso)

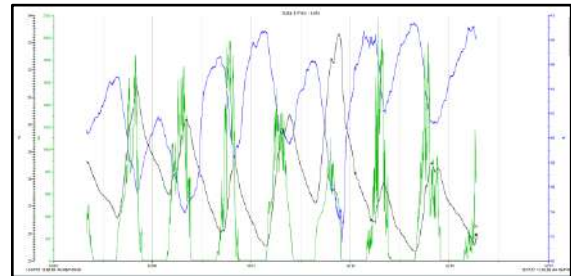


Figura 17. Gráfico de superposición de las curvas de evolución de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa para punto fijo en sala de almacenamiento. Semana 07-12-21 a 15-12-21. — Temp. (°C), — HR (%), — Intensidad (Lux).

Punto fijo - Sala de exposiciones/exhibiciones permanentes (planta baja)

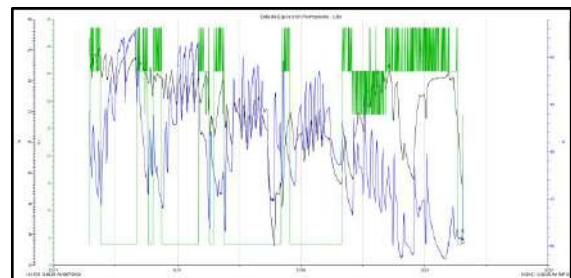


Figura 18. Gráfico de superposición de las curvas de evolución de temperatura, humedad relativa e intensidad luminosa para punto fijo en sala de exposiciones permanentes. Semana 15-12-21 a 21-12-21. — Temp. (°C), — HR (%), — Intensidad (Lux).

Si bien se pueden deducir conclusiones rápidas en función de la observación de los gráficos anteriores, resultó conveniente para la definición de las condiciones ambientales del interior, obtener los siguientes datos estadísticos: medias diarias y medias de los máximos y mínimos diarios y estacionales; extremos máximos y mínimos diarios y estacionales; oscilaciones absolutas diarias y estacionales.

Así, se construyeron tablas adicionales (Tablas I, II y III), que a modo de resumen arrojan las conclusiones de las superposiciones de curvas previas. A continuación, se presentan algunas de ellas.

Tabla I

Cálculo de los parámetros estadísticos diarios para valores de temperatura (°C).

DIA	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
1	27,089	27,775	26,402	1,374	0,410	0,949
2	26,948	28,394	25,501	2,893	0,383	0,050
3	29,371	30,800	25,844	5,059	1,377	0,051
4	29,190	31,001	27,358	3,643	1,248	0,051
5	29,805	31,853	27,949	3,714	1,145	0,051
6	28,823	30,098	27,579	2,487	0,740	0,074
7	28,875	31,689	25,051	6,628	2,004	0,051
8	29,527	32,407	28,646	3,761	1,387	3,471
MEDIA	28,60525	30,2915	25,725	3,563	1,008	0,418
MAX.	30,178	32,407	27,949	4,458	1,294	0,744
MIN.	25,873	28,245	25,501	2,744	0,747	0,912
DES.	0,241	1,907	0,834	1,074	0,547	0,303
OSC. ABS.		4,192				

DIA	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
1	26,904	27,161	26,648	0,515	0,150	0,073
2	27,069	28,320	25,817	2,503	0,791	0,050
3	28,301	30,444	26,158	4,288	1,500	0,050
4	29,002	30,596	27,407	3,189	1,135	0,051
5	29,361	30,773	27,949	2,824	0,913	0,050
6	28,486	29,565	27,407	2,158	0,642	0,075
7	28,810	31,510	25,109	6,401	1,957	0,051
8	29,538	31,791	27,284	4,507	1,238	0,050
MEDIA	28,4095	29,9055	26,9075	2,998	0,866	0,515
MAX.	29,87	31,791	27,949	3,842	1,215	0,917
MIN.	25,867	28,097	25,817	2,260	0,542	1,108
DES.	0,263	1,583	0,858	0,885	0,563	0,100
OSC. ABS.		3,664				

Semana 23-11-21 a 30-11-21 para área de reserva/almacenamiento (Punto Fijo: mitad superior de la tabla - punto móvil: mitad inferior de la tabla).

Tabla II

Cálculo de los parámetros estadísticos diarios para valores de humedad relativa (%).

DIA	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
1	51,512	53,039	50,984	3,055	0,723	0,276
2	56,894	59,559	47,228	19,331	6,998	0,793
3	52,828	55,292	49,954	5,328	1,339	0,249
4	53,518	59,047	47,989	11,058	3,453	0,411
5	50,016	55,771	44,250	11,511	4,039	0,417
6	44,207	49,688	38,726	10,962	3,878	0,583
7	44,207	49,688	38,726	10,962	3,878	0,583
8	40,285	45,235	34,337	11,898	1,707	7,855
MEDIA	51,716	56,1225	47,3095	8,813	2,395	3,346
MAX.	60,0435	59,559	53,528	13,031	3,151	0,382
MIN.	40,285	46,235	34,337	11,898	2,412	6,691
DES.	0,922	8,481	4,976	3,485	1,982	0,685
OSC. ABS.		20,324				

DIA	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
1	61,596	62,219	60,973	1,246	0,333	0,183
2	62,482	64,497	60,466	4,031	1,230	0,175
3	66,963	64,821	49,105	16,716	5,403	0,881
4	63,317	65,418	51,216	4,202	1,014	0,293
5	64,060	67,898	50,221	7,677	2,459	0,384
6	61,193	65,760	46,626	9,134	3,342	0,451
7	44,832	49,681	40,002	9,659	3,320	0,585
8	44,408	46,536	42,280	4,256	1,171	0,238
MEDIA	63,2085	65,671	50,747	4,924	1,580	0,292
MAX.	62,918	64,821	61,015	3,806	1,169	0,183
MIN.	43,269	46,538	40,002	6,534	2,045	0,585
DES.	0,264	7,565	6,570	0,965	1,703	0,220
OSC. ABS.		18,285				

Semana 23-11-21 a 30-11-21 para área de reserva/almacenamiento (Punto Fijo: mitad superior de la tabla - punto móvil: mitad inferior de la tabla).

Tabla III

Cálculo de los parámetros estadísticos diarios para valores de intensidad luminosa (Lux).

DIA	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
1	67,0	130,1	3,9	126,2	43,0	126,2
2	11,8	19,7	3,9	15,8	2,4	7,9
3	7,9	11,8	3,9	7,9	1,1	7,9
4	7,9	11,8	3,9	7,9	1,1	7,9
5	3,9	3,9	3,9	0,0	0,0	0,0
6	11,8	19,7	3,9	15,8	1,8	7,9
7	3,9	3,9	3,9	0,0	0,0	0,0
8	11,8	19,7	3,9	15,8	1,8	7,9
	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
MEDIA	35,5	67,0	3,9	63,1	13,4	63,1
MAX.	67,0	130,1	3,9	126,2	26,8	126,2
MIN.	3,9	3,9	3,9	0,0	0,0	0,0
DES.	10,0	47,7	0,0	47,7	14,8	47,7
OSC. ABS.		126,2				

DIA	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
1	11,8	11,8	11,8	0,0	0,0	11,8
2	11,8	11,8	11,8	0,0	0,0	11,8
3	15,8	19,7	11,8	7,9	0,7	19,7
4	11,8	11,8	11,8	0,0	0,0	11,8
5	11,8	11,8	11,8	0,0	0,0	19,7
6	15,8	19,7	11,8	7,9	0,5	0,0
7	11,8	11,8	11,8	0,0	0,0	0,0
8	15,8	19,7	11,8	7,9	1,0	15,8
	MEDIA	MAX.	MIN.	OSC.	DES.	MOH
MEDIA	13,8	15,8	11,8	4,0	0,6	11,8
MAX.	15,8	19,7	11,8	7,9	1,1	3,0
MIN.	11,8	11,8	11,8	0,0	0,0	0,0
DES.	0,4	3,0	0,0	3,0	0,4	0,0
OSC. ABS.		7,9				

Semana 23-11-21 a 30-11-21 para área de reserva/almacenamiento (Punto Fijo: mitad superior de la tabla - punto móvil: mitad inferior de la tabla).

A partir de esta lectura es posible decir para el **área de reserva/almacenamiento** que, en cuanto a:

- **Temperatura:** en ambos puntos de medición, se registran niveles de oscilación diaria entre los 3-6°C, y temperaturas máximas de alrededor de los 33,33°C. Con respecto a los registros estacionales, que se corresponden con la estación de verano, se registraron oscilaciones entre

los 4-7°C, y temperaturas máximas de alrededor de los 36,42°C. Así, como se estimó desde un principio, podría describirse como un ambiente con fluctuaciones bruscas, cuyo origen puede encontrarse en las condiciones de su envolvente, que no brindarían una adecuada protección del espacio que se resguarda frente al exterior, dando lugar a mayores variaciones ambientales.

- **Humedad relativa:** en ambos puntos, se observaron valores de oscilación diaria entre el 7-20%, con registros máximos de alrededor del 70,92%. Y teniendo en cuenta que la humedad relativa se relaciona con la inversa de la temperatura, las fuertes variaciones de humedad relativa están caracterizadas también por las variaciones de temperatura en el espacio. La ausencia de sistemas mecánicos de acondicionamiento del aire impide el control de esta variable.

- **Intensidad luminosa:** “en este caso, los más destacados son los niveles máximos y valores que integren el tiempo, debido al carácter acumulativo de su influencia” (Herráez et al., 2014). Por ello, resulta relevante el registro de datos que se llevó a cabo con los instrumentos ubicados con orientación a las fuentes de luz más cercanas. De ello, se registraron valores diarios máximos de 3173,2 lux, y valores

estacionales máximos de 1359,9 lux. Si bien estos datos caracterizan a las condiciones de iluminación del ambiente en general, es importante mencionar que de la información obtenida con las mediciones realizadas *in situ*, utilizando un luxómetro, se registró que las incidencias máximas sobre el ejemplar analizado se sitúan alrededor de los 200 lux.

Con respecto a la **sala de exposiciones/exhibiciones permanentes**, se dedujo que en cuanto a:

- *Temperatura*: se registraron oscilaciones diarias menores, que no superan los 2,3°C, y temperaturas máximas de 23,95°C. Los datos estacionales para verano, arrojaron variaciones mayores, entre los 4-6°C, con temperaturas máximas de 36,42°C, lo que puede relacionarse con una cuestión de usos del museo, puesto que los datos fueron registrados durante un periodo en el que permaneció cerrado para el público, por lo que el empleo de los sistemas de acondicionamiento de aire pudo haber variado.

- *Humedad relativa*: se observaron oscilaciones diarias entre 2,40-19,07%, y oscilaciones estacionales entre 10,46-15,64%. Los valores máximos diarios se sitúan alrededor del 74,71% y los valores máximos estacionales cercanos al 79,55%.

- *Intensidad luminosa*: es importante destacar que en este espacio no se genera un ingreso de iluminación natural, por lo tanto, los valores máximos diarios -que no superan los 153,7 lux- y los máximos estacionales -no mayores a los 997,3 lux- se corresponden con la iluminación artificial de esta área. Por su parte, el valor máximo incidente sobre el ejemplar ubicado en este sector, registrado *in situ* utilizando un luxómetro, no supera los 101 lux.

Partiendo de la consideración de que la temperatura, la humedad y la luz, son factores que deben considerarse a la hora de intervenir y analizar una exposición, y teniendo en cuenta que pueden poner en marcha el deterioro de las colecciones o desencadenar el biodeterioro, los resultados de nuestro análisis de datos, se contrastaron con niveles de exhibición de referencia, establecidos por normativas y estudios de conservación preventiva para este tipo de patrimonio.

Con respecto a la temperatura y a la humedad relativa, son factores que deben analizarse en paralelo, puesto que, a mayor temperatura, menor será la humedad relativa y viceversa. Tomando como valores de referencias, los máximos recomendados de 46 a 60% para la HR, con posibilidades de variación de +/- 5%,



en ambos espacios analizados estos niveles son ampliamente superados.

En relación a la temperatura, se presentan dos situaciones opuestas: por un lado, la sala de almacenamiento, que cuenta con valores que sobrepasan los medios recomendados de 18°C y variaciones de +/- 2°C; y por otro lado, la sala de exposiciones, en la que los niveles de temperatura se encuentran adecuadamente controlados gracias a la utilización de sistemas de acondicionamiento del aire de forma continua.

En cuanto a la luz que interviene, para el caso de estudio, proviene de fuentes naturales y artificiales, y no solo afecta directamente a los ejemplares en cuestión, sino que también actúa indirectamente sobre el ambiente, aportando calor.

Siendo importante mencionar que el deterioro que genera la luz, no solo depende de su intensidad -medida en lux- sino también del material expuesto a ella; se puede decir que, tanto en la sala de exposición permanente, como en la sala de almacenamiento, ambos ejemplares, se encuentran expuestos a altos niveles de intensidad luminosa (101-200 lux), puesto que el valor máximo para exposición de objetos de fácil alteración -como son

aquellos de origen animal- es de 50 lux, “teniendo presente el compromiso con la iluminación mínima requerida para una visión adecuada” (Herráez et al., 2014). Los altos niveles resultan peligrosos, puesto que el daño que genera la iluminación es acumulativo en el tiempo. Frente a ello, se pueden adoptar medidas para controlar la incidencia de esas radiaciones naturales y artificiales, que consisten, por un lado, en dotar a las aberturas de la envolvente, de adecuados filtros adhesivos y tejidos, capaces de impedir esta incidencia sobre los objetos. Aquí es necesario plantear que el museo cuenta con estos elementos, sin embargo, se encuentran altamente deteriorados y no cumplen su función.

En cuanto a la iluminación artificial, no es menos relevante la necesidad de un diseño con lámparas adecuadas a las colecciones almacenadas/exhibidas y una gestión del tiempo de encendido para minimizar el tiempo de exposición.

Conclusiones

De los resultados analizados hasta el momento, es posible identificar dos situaciones opuestas. Por un lado, un ejemplar ubicado en un espacio de almacenamiento, cuya envolvente no brinda las condiciones de estanqueidad



adecuadas para una correcta conservación de las colecciones biológicas que alberga, ya que se constituye como un límite débil entre el interior y el exterior, lo que da lugar a la incidencia directa de materia (humedad, contaminantes) y energía (calor, radiación electromagnética). Por lo tanto, el espacio tiene una gran exposición a las variaciones bruscas naturales de las condiciones ambientales más significativas.

Por otro lado, encontramos un ejemplar ubicado en una sala de exhibiciones, con condiciones ambientales mucho más estables, y valores medianamente controlados, gracias al empleo constante de sistemas de acondicionamiento del aire, que limitan las variaciones bruscas capaces de afectar a las colecciones biológicas en cuestión.

Si bien lograr que las condiciones ambientales sean las correctas, para una adecuada conservación de las colecciones almacenadas y/o exhibidas en museos, resulta un objetivo complejo, las nuevas tecnologías brindan la ventaja de poder indagar y evaluar las distintas situaciones, para así tomar decisiones, intervenir y corregir aquellos aspectos que afectan a los bienes albergados, tanto de forma global -en salas de almacenamiento y exhibición - como particular- entornos

inmediatos a las piezas-.

Es relevante mencionar que una intervención requiere, no solo disponer de la información cuantitativa, sino también de un análisis de las características propias de cada espécimen, las intervenciones a las que estuvo expuesto, la constitución de los espacios que lo albergan, el tipo de construcción, su estructura y materialidad, la configuración de las exposiciones de las que forma parte y los criterios para su almacenamiento, como así también las formas de uso y mantenimiento.

De los resultados obtenidos se puede deducir que los espacios del museo analizado, destinados al almacenamiento de extensas colecciones biológicas, no brindan actualmente condiciones ambientales adecuadas para ellas. A su vez, estos resultados desfavorables, pueden relacionarse con las condiciones arquitectónicas inadecuadas del inmueble debido a su escaso mantenimiento, decisiones de diseño incorrectas y la incidencia humana en los espacios, entre otros factores.

El área de reserva/almacenamiento estudiada se encuentra particularmente afectada por el alto valor de aquellas variables que pueden perjudicar directamente al material almacenado. Y si



bien existen, y pueden elaborarse, distintas recomendaciones respecto a cuáles son las medidas que se pueden tomar para reducir los daños que se pueden ocasionar, es importante señalar que las mismas deben aplicarse con urgencia, puesto que son los sectores de almacenamiento los destinados a resguardar las colecciones por períodos de tiempo más prolongados, debiendo por lo tanto brindarles la mayor protección.

Por último, llevar a cabo una correcta conservación, implica un trabajo interdisciplinario, que aporte diferentes perspectivas y logre dentro de las posibilidades del museo, mejorar la actual situación de nuestro patrimonio natural. El trabajo presentado resulta un aporte en este sentido, puesto que ha sido llevado adelante por personas formadas en áreas del conocimiento diferentes (arquitectura, ingeniería electrónica y biología), con lo que confluyen ámbitos del saber tradicionalmente no relacionados en una propuesta integral.

Bibliografía

Cassey P, ME Hauber, G Maurer y JG Ewen. 2012. Sources of variation in reflectance spectrophotometric data: a quantitative analysis using avian

eggshell colours. *Methods in Ecology and Evolution*, 3:450-6.

Cassey P, G Maurer, C Duval, JG Ewen y ME Hauber. 2010. Impact of time since collection on avian eggshell color: a comparison of museum and fresh egg specimens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64:1711-20.

Davis AK, N Woodall, JP Moskowicz, N Castleberry y BJ Freeman. Temporal change in fur color in museum specimens of mammals: reddish-brown species get redder with storage time. *International Journal of Zoology*, 2013:876347.

Doucet SM y GE Hill. 2009. Do museum specimens accurately represent wild birds? A case study of carotenoid, melanin, and structural colours in longtailed manakins *Chiroxiphia linearis*. *Journal of Avian Biology*, 40:146-156.

Herráez JA, G Enríquez de Salamanca González, MJ Pastor Arenas y T Gil Muñoz. 2014. Manual de seguimiento y análisis de condiciones ambientales. Madrid: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

IPCE - Instituto del Patrimonio Cultural de España. 2013. Conservación



- preventiva: revisión de una disciplina. Patrimonio Cultural de España N°7.
- Izquierdo Moya I. 2013. Los tesoros del investigador: las colecciones de Historia Natural como referencia del trabajo científico. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Segunda época, 11:69-83.
- Martínez Meyer E. 2005. Las colecciones científicas: eje del conocimiento de la biodiversidad (ed.). Revista Mexicana de Mastozoología 9:4-5.
- McNett GD y K Marchetti. 2005. Ultraviolet degradation in carotenoid patches: live versus museum specimens of wood warblers (Parulidae). The Auk, 122:793-802.
- Mesa Ramírez DP y AA Bernal. 2005. Protocolos para la preservación y manejo de colecciones biológicas. Boletín Científico, Centro de Museos, Museo de Historia Natural, Vol. 10, enero-diciembre: 117-148.
- Michalski S. 2009a. Agent of deterioration: Incorrect temperature. Canada: Canadian Conservation Institute.
- Michalski S. 2009b. Agent of deterioration: Incorrect relative humidity. Canada: Canadian Conservation Institute.
- Michalski S. 2009c. Agent of deterioration: Light, ultraviolet and infrared radiation. Canada: Canadian Conservation Institute.
- Michalski S. 2014. The power of history in the analysis of collection risks from climate fluctuations and light. 17th Triennial Conference. Melbourne: ICOM-CC.
- National Park Service. 1999. Chapter 4: Museum collections environment. Museum Handbook. Part I: Museum Collections.
- National Park Service. 2005. Appendix T: Curatorial care of biological collections. Museum Handbook. Part I: Museum Collections.
- Pedersoli Jr. JL, C Antomarchi y S Michalski. 2016. Guide to risk management. Rome-Canada: ICCROM – CCI.
- Pérez E, E Castillo, E Serpa, F Rodríguez, F Anaya, Y Espinel, M Gálvez y E Gómez. 1998. Manual para el cuidado de objetos culturales. Colombia: Ministerio de Cultura. UNESCO.
- Pohland G y P Mullen. 2006. Preservation agents influence UV-coloration of plumage in museum bird skins. Journal of Ornithology, 147:464-467.



Quesada J y JC Senar. 2006. Comparing plumage colour measurements obtained directly from live birds and from collected feathers: the case of the great tit *Parus major*. *Journal of Avian Biology*, 37:609-616.

Rey Fraile I. 2013. Museos, colecciones científicas y ADN. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, Segunda época, 11:53-68.

Sandoval Salinas ML, JD Sandoval, EM Colombo y RM Barquez. 2018. The pattern of color change in small mammal museum specimens: is it independent of storage histories given museum-specific conditions? *BMC Research Notes*, 11:424.

Simmons JE. 2002. Herpetological collecting and collections management. Revised edition. *Herpetological Circular* No. 31. Philadelphia: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.

Thomson G. 1986. *The museum environment*. Segunda edición. London: Butterworth-Heinemann.

Financiamiento

Beca Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC) Convocatoria 2020 del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) “Nuevas tecnologías aplicadas a la

exhibición y preservación del patrimonio cultural material en instituciones públicas”, otorgada a PE Barroso.

Proyecto PIUNT E601 “Nuevas tecnologías aplicadas a la exhibición y preservación del patrimonio cultural material en instituciones públicas”. Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT). Director: Dr. Raúl Ajmat.

Agradecimientos

Agradecemos a la Fundación Miguel Lillo por permitirnos el acceso al Museo Miguel Lillo de Ciencias Naturales (MUL) y al área de reserva/almacenamiento del cuarto piso del Edificio de Zoología. Agradecemos al Instituto de Investigación en Luz, Ambiente y Visión (ILAV, UNT-CONICET) y al Dr. Raúl F. Ajmat por el préstamo de equipamiento específico. Agradecemos a la Dra. Bárbara Silva por su asistencia y colaboración con el manejo del instrumental y sus softwares asociados.

Nuevos complejos heterolépticos [Cu(6-[(quinolin-2-il-metilen)amino]-2H-cromen-2-ona)(PP)]⁺, con potencialidades fotofísicas, donde PP corresponden a ligandos derivados de fenil-fosfinas



C. 25 Ciencia, tecnología e innovación

Nuevos complejos heterolépticos [Cu(6-[(quinolin-2-il-metilen)amino]-2H-cromen-2-ona)(PP)]⁺, con potencialidades fotofísicas, donde PP corresponden a ligandos derivados de fenil-fosfínas

Autor: Robles Pérez, Stephania^a. stephania.robles@usach.cl

Profesor guía: Guerrero Núñez, Juan. juan.querrero@usach.cl, Dreyse Silva, Paulina.

paulina.dreyse@usm.cl

Universidad de Santiago de Chile (USACH)

Resumen

La investigación de las propiedades luminiscentes de complejos de metales de transición es un área de estudio muy activa como resultado del aumento en la demanda de materiales aplicables en procesos de conversión de energía solar y/o generación de luz. Dentro de estos, los complejos de Cu(I) constituyen alternativas promisorias para estos procesos debido a sus propiedades estructurales, fotofísicas y redox, sumando además la mayor abundancia y menor costo de este metal, respecto de otros metales de transición fotoluminiscentes. Bajo esta consideración, se diseñaron y prepararon dos nuevos complejos heterolépticos de Cu(I) que contienen un fragmento quinolina en el ligando NN, que debería contener al LUMO, con el objetivo estudiar comparativamente las propiedades de los estados basal y excitado de dos complejos.

En este congreso se informa la síntesis de ambos complejos de Cu(I) usando una metodología *template*; la estructura en solución establecida mediante el análisis concertado de espectros de resonancia magnética nuclear 1D (¹H, ³¹P, ¹³C-RMN) y 2D (COSY, HSQC-¹H-¹³C, HMBC-¹H-¹³C, HMBC-¹H-¹⁵N), y la caracterización mediante espectroscopía UV-Visible. Estos espectros en CH₂Cl₂, muestran transiciones de transferencia de carga metal-ligando (TCML) características de compuestos de Cu(I) ($\lambda_{\text{máx}}= 428$ nm para [Cu(NN)(PP₁)₂]⁺ y $\lambda_{\text{máx}}= 469$ nm para [Cu(NN)(PP₂)₂]⁺).

Palabras clave: Cobre, complejos, luminiscencia.

^a Estudiante de doctorado del Programa de Posgrado de Doctorado en Química de la Universidad de Santiago de Chile, es becaria de Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, del Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación de Chile.



Introducción

Los compuestos de coordinación son una clase fascinante de moléculas que tienen amplias aplicaciones en muchas áreas, como dispositivos electroluminiscentes, diseño de dispositivos ópticos, sensores en sistemas biológicos y químicos, etc^[1]. En los últimos años, el diseño y síntesis de complejos de metales de transición luminiscentes se ha convertido en un área de investigación activa como resultado del aumento en la demanda de materiales aplicables en la conversión de energía solar y/o generación de luz, principalmente basados en Ir(III) y Ru(II)^[2,3]. Sin embargo, el elevado costo y la baja abundancia de estos metales limitan la aplicabilidad tecnológica de estos sistemas^[1,2]. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas basadas en metales más abundantes y menos costosos es de crucial y atractivo interés de investigación^[3,4]. En este sentido, los complejos de Cu(I) exhiben un gran potencial y son alternativas viables para estas aplicaciones debido a sus propiedades estructurales, fotofísicas y redox, las cuales se pueden modular con facilidad mediante el diseño de sus estructuras en base a una elección adecuada de los ligandos^[1-4].

La química de los compuestos de cobre (I) presenta gran versatilidad coordinativa y estructural que ocasiona que sus propiedades sean altamente modulables mediante un idóneo diseño de su estructura, donde el tipo de ligando y la combinación de ellos juegan un rol fundamental. Los complejos de Cu(I) tienen la capa de orbitales d llena (d^{10}), con una distribución electrónica simétrica por lo que no presentan estabilización de campo cristalino^[5]. Tienen tendencia a formar complejos tetracoordinados, con una disposición tetraédrica o pseudotetraédrica de los ligandos alrededor del centro metálico. No obstante, el tipo y cantidad de átomos coordinantes, la voluminosidad, las restricciones estéricas y conformacionales del ligando condicionan los múltiples modos de coordinación del Cu(I), encontrando estructuras tetraédricas distorsionadas, pirámide de base trigonal, tipo balancín y pseudo cuadrado plano. Estas características determinan, por ejemplo, sus propiedades electrónicas.

El diseño estructural óptimo de complejos heterolépticos de Cu(I) del tipo $[Cu(NN)(PP)]^+$, con propiedades emisivas mejoradas, se logrará mediante una elección racional de los ligandos NN y PP. La utilización de ligandos NN, principalmente derivados de 2,2'-bipiridina

(bpy) o 1,10-fenantrolinea(phen), y PP con grandes ángulos de mordida, ha sido ampliamente explorada para sintetizar complejos de Cu(I) que favorezcan sus propiedades emisivas desde estados excitados de TCML. Para favorecer el decaimiento radiativo desde dichos estados excitados con un rendimiento cuántico elevado, se utilizan ligando PP que estabilizan el estado de oxidación 1+ del cobre y evitan el aplanamiento del estado excitado de TCML mediante impedimento estérico en la esfera de coordinación del centro metálico. Adicionalmente, un mayor blindaje se obtiene incrementando las demandas estéricas del ligando NN, logrando disminuir los decaimientos no radiativos en estos complejos^[2,6-9]. No obstante, la labilidad estructural y coordinativa del centro metálico debe ser considerada en el diseño de estos tipos de complejos, con el fin de evitar tensiones estructurales sobre la coordinación metal-ligando que conduzcan a procesos de intercambios químicos dinámicos que se pueden generar en solución, lo cual se espera evitar con ligandos NN y PP voluminosos, pero a la vez flexibles, para favorecer el desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia la formación exclusiva del complejo heteroléptico.

Centrados en esto, se prepararon dos nuevos complejos heterolépticos $[Cu(NN)(PP)]^+$ (NN= (6-[(quinolin-2-ilmetilen)amino]-2*H*-cromen-2-ona), (PP₁)₂= trifenilfosfina y PP₂= bis[2-difenilfosfino)fenil]éter).

Objetivos

Obtener y evaluar las propiedades estructurales y fotofísicas de dos nuevos complejos heterolépticos Cu(I), $[Cu(NN)(PP)]^+$, con NN= (6-[(quinolin-2-ilmetilen)amino]-2*H*-cromen-2-ona), (PP₁)₂= trifenilfosfina y PP₂=bis[2-difenilfosfino)fenil]éter).

Materiales y métodos

Síntesis de los Complejos.

En 40 mL de diclorometano, se añadieron 0,76 mmol de 2-quinolincarboxaldehído y 6-amino-2*H*-chromen-2-ona. A esta mezcla se agregó ligando fosfina PP (1,52 mmol de PP₁ y 0,76 mmol PP₂) hasta su total disolución. Finalmente se añadió $[Cu(CH_3CN)_4]X$ (X=PF₆ o ClO₄) (0,76 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas en ambiente de nitrógeno hasta formar una solución de color rojo-naranja. El volumen de disolvente se redujo mediante evaporador rotatorio, se deja secar y el sólido formado se lavó con éter dietílico un par de veces.

Posteriormente los compuestos se recrystalizaron mediante difusión con éter dietílico en solución de diclorometano, para dar sólidos microcristalinos puros.



Figura 2. Esquema de síntesis de complejos de Cu(I) propuestos por método *template*.

Resonancia magnética nuclear.

Las mediciones de RMN fueron realizadas en un espectrómetro BRUKER Avance NEO 400 (400,13 MHz para ^1H , 100,62 MHz para ^{13}C , 161,97 MHz para ^{31}P y 40,56 MHz para ^{15}N), equipado con sonda directa SmartProbeTM de 5mm, con gradientes de campo en Z de 5G/A*cm. La temperatura fue de 300 K, y el solvente deuterado fue CDCl_3 .

Espectroscopía de absorción UV-Vis.

Los estudios mediante espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-Vis) para los complejos de Cu(I) fueron realizados en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 25 a temperatura ambiente, en el rango de longitudes de onda entre 200 y 1100nm, en celdas de

cuarzo de 1 cm y soluciones preparadas en CH_2Cl_2 de concentración 0,14 mM para $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_1)_2]^+$ y 0,18 mM para $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)]^+$.

Resultados y discusión

Los complejos son de color rojo anaranjado y fueron obtenidos con rendimientos del compuesto cristalizado por sobre el 85%. Todas las mediciones instrumentales fueron realizadas con los compuestos recrystalizados y son estables en los tiempos y concentraciones usados en las mediciones.

Los estudios descritos en este reporte se encuentran aún en desarrollo y los resultados tienen carácter exploratorio en parte de los análisis realizados.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La estructura de los complejos $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP})]^+$ fue establecida mediante análisis concertado de variados espectros 1D (^1H , ^{31}P , ^{13}C -RMN) y 2D (COSY, HSQC- ^1H - ^{13}C , HMBC- ^1H - ^{13}C , HMBC- ^1H - ^{15}N). En las figuras 3 y 4 se muestran los espectros ^1H y ^{31}P (inserto) de los complejos medido en CDCl_3 . La asignación de las señales del espectro ^1H se realizó según la numeración indicada en la figura de la molécula inserta en cada espectro.

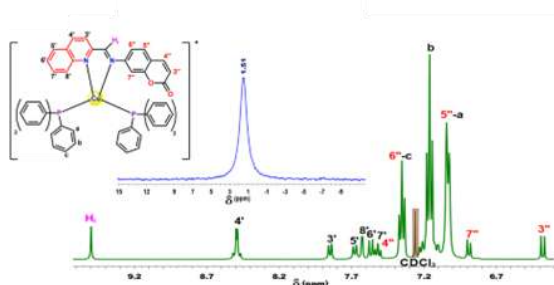


Figura 3. Espectros RMN- ^1H e inserto ^{31}P en CDCl_3 a 300 K de $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_1)_2]^+$.

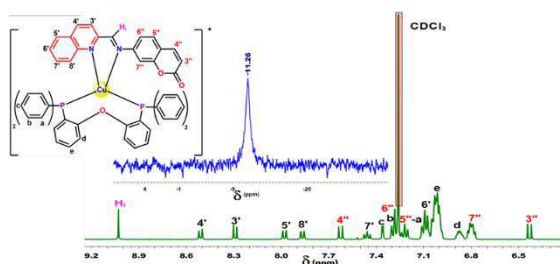


Figura 4. Espectros RMN- ^1H e inserto ^{31}P en CDCl_3 a 300 K de $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)_2]^+$.

En términos generales la formación del complejo obtenido mediante síntesis template, se establece por presencia de la señal de protón H_i (imina) y por correlaciones $^{2,3}\text{J}$ en el espectro HMBC- ^1H - ^{13}C entre núcleos de los fragmentos moleculares unidos por el grupo imina en el ligando NN, la presencia de una única señal en el espectro de RMN- ^{31}P , con el ensanchamiento característico de ligandos trifenilfosfina enlazados a un Cu(I) (Figura 3) ó bis[2-difenilfosfino)fenil]éter (Figura 4). Del mismo modo, la integración relativa de las señales protónicas es correspondiente con la estructura heteroléptica determinada para los complejos como también lo es la

presencia de las correlaciones HMBC- ^1H - ^{15}N esperadas.

En las figuras 5 y 6 se muestran espectro 2D-COSY, donde se observan las correlaciones analizadas para la determinación estructural.

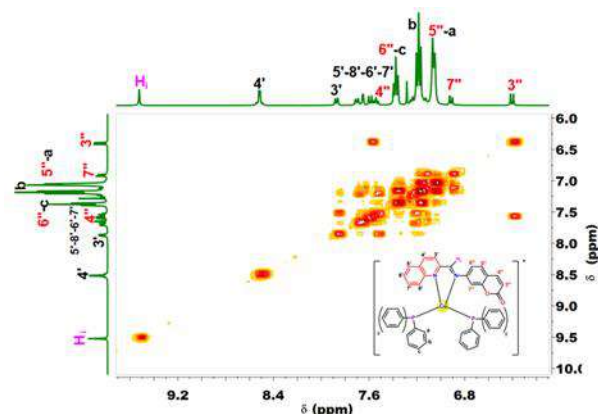


Figura 5. Espectros 2D-COSY en CDCl_3 a 300 K de $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_1)_2]^+$.

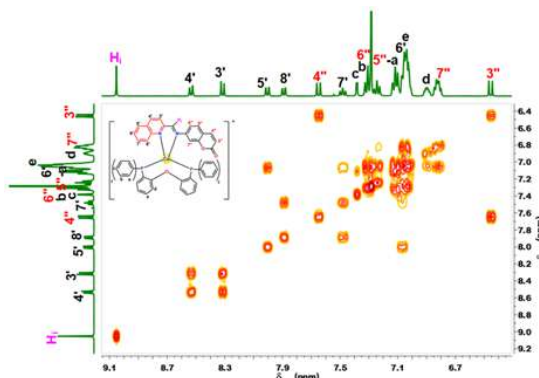


Figura 6. Espectros 2D-COSY en CDCl_3 a 300 K de $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)_2]^+$.

Espectroscopía UV-Visible

En la figura 7, se muestran los espectros UV-Visible de ambos complejos en CH_2Cl_2 . En ellos se observa a menor energía, una banda ancha asociada a la transferencia de carga metal-ligando

(TCML) a $\lambda_{\text{máx}} = 428 \text{ nm}$ para el complejo $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_1)_2]^+$ y de $\lambda_{\text{máx}} = 469 \text{ nm}$ para $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)]^+$. Esta similitud espectral en ambos complejos permite presumir que esta transición involucra prioritariamente a los orbitales del ión Cu(I) en la conformación del HOMO y al fragmento quinolina en la conformación del LUMO. El efecto de los ligandos fosfinas se expresa en un notorio corrimiento de la banda del complejo $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)]^+$ a menor energía respecto del $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_1)_2]^+$.

Este efecto puede ser asociado a una mayor distorsión estructural del complejo $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)]^+$ hacia una estructura más alejada del tetraedro por efecto de las restricciones del ligando bicoordinante bis[2-difenilfosfino)fenil]éter.

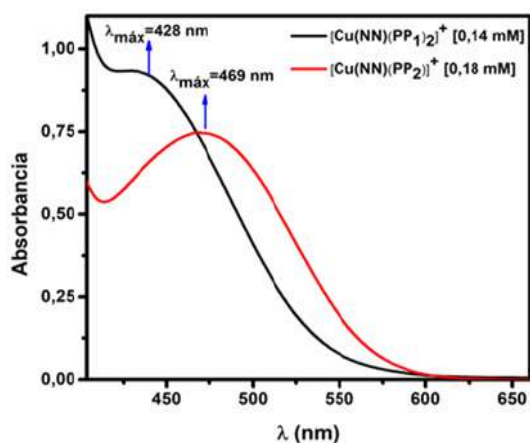


Figura 7. Espectro UV-Visible de los complejos $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_1)_2]^+$ (línea negra) y $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{PP}_2)]^+$ (línea roja) en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos hasta el momento evidencian la formación con buenos rendimientos y buena pureza de los complejos $[\text{Cu}(6-[(\text{quinolin-2-il-metilen)amino]-2H\text{-cromen-2-ona})(\text{trifenilfosfina})_2]^+$ y $[\text{Cu}(6-[(\text{quinolin-2-il-metilen)amino]-2H\text{-cromen-2-ona})(\text{bis}[2\text{-difenilfosfino)fenil]éter})]^+$.

Bibliografía

- Zhang, Y., Traber, P., Zedler, L., Kupfer, S., Gräfe, S., Schulz, M., & Dietzek, B. (2018). Cu(I) vs. Ru(II) photosensitizers: Elucidation of electron transfer processes within a series of structurally related complexes containing an extended π -system. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(38), 24843-24857. Doi:10.1039/c8cp04595j
- Lazorski, M. S., & Castellano, F. N. (2014). Advances in the light conversion properties of Cu(I)-based photosensitizers. *Polyhedron*, 82, 57-70. Doi:10.1016/j.poly.2014.04.060
- Bizzarri, C., Spuling, E., Knoll, D. M., Volz, D., & Bräse, S. (2018). Sustainable metal complexes for organic light-emitting diodes (OLEDs). *Coordination Chemistry Reviews*, 373, 49-82. Doi:10.1016/j.ccr.2017.09.011



4. Zhang, Y., Schulz, M., Waechtler, M., Karnahl, M., & Dietzek, B. (2018). Heteroleptic diimine–diphosphine Cu(I) complexes as an alternative towards noble-metal based photosensitizers: Design strategies, photophysical properties and perspective applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 356, 127-146. Doi:10.1016/j.ccr.2017.10.016

5. Armaroli, N., Accorsi, G., Cardinali, F., & Listorti, A. (2007). Photochemistry and photophysics of coordination compounds: Copper. In *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I* (pp. 69-115). Springer, Berlin, Heidelberg. Doi:10.1007/128_2007_128

6. Armaroli, N. (2001). Photoactive mono-and polynuclear Cu(I)–phenanthrolines. A viable alternative to Ru(II)–polypyridines?. *Chemical Society Reviews*, 30(2), 113-124. Doi:10.1039/b000703j

7. Moudam, O., Kaeser, A., Delavaux-Nicot, B., Duhayon, C., Holler, M., Accorsi, G., & Nierengarten, J. F. (2007). Electrophosphorescent homo-and heteroleptic copper(I) complexes prepared from various bis-phosphine ligands. *Chemical communications*, (29), 3077-3079. Doi:10.1039/b707398d

8. Paria, S., & Reiser, O. (2014). Copper in photocatalysis. *ChemCatChem*, 6(9), 2477-2483. Doi:10.1002/cctc.201402237

9. Tschierlei, S., Karnahl, M., Rockstroh, N., Junge, H., Beller, M., & Lochbrunner, S. (2014). Substitution-controlled excited state processes in heteroleptic copper(I) photosensitizers used in hydrogen evolving systems. *ChemPhysChem*, 15(17), 3709-3713. Doi:10.1002/cphc.201402585

Financiamiento

Departamento de Relaciones Internacionales e Interuniversitarias, Universidad de Santiago de Chile.

Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación, Gastos operacionales N°21201855.

Fondecyt Regular N°191902 Dr. Juan Guerrero.

Fondecyt Regular N°1201173 Dra. Paulina Dreyse.

Agradecimiento

Agradezco al Departamento de Relaciones Internacionales e Interuniversitarias de la Universidad de Santiago de Chile, al Programa de



“Generación de Conocimiento
con Integración Científica, Académica, Tecnológica & Cultural para la Justicia, la Libertad y el Bienestar de Nuestros Pueblos”

7-8-9 / SEP 2022



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO XAVIER
UNIVERSIDAD DIGNA
BOLIVIA



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



30
AÑOS

Posgrado de Doctorado en Química de la Universidad de Santiago de Chile; a la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca; y a los componentes del eje temático “C”, Ciencias Exactas, número “25”, Ciencia, tecnología e innovación, de las XXIX Jornadas Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM).

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos polifenólicos en vainas de *Mucuna pruriens* y su actividad antioxidante, optimizada por metodología de superficie de respuesta



C.28. Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones

Extracción asistida por ultrasonido de compuestos polifenólicos en vainas de *Mucuna pruriens* y su actividad antioxidante, optimizada por metodología de superficie de respuesta

Autora: Avalos, Beatriz; betyavals22@gmail.com

Co-autor(es): Gonzalo, Ojeda; gaojeda@exa.unne.edu.ar; Vallejos, Margarita; vallejos.marga@gmail.com; Acevedo, Belén; belenaacevedo@exa.unne.edu.ar

Profesor/a guía: Vallejos, Margarita; vallejos.marga@gmail.com

Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Argentina

Resumen

Mucuna pruriens (MP) es una legumbre que se cultiva en la región del Nordeste Argentino (NEA). Sus semillas poseen elevado contenido de compuestos bioactivos, entre los que se destacan los compuestos polifenólicos (CP) y la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor del neurotransmisor dopamina. Las vainas de MP (vMp) son residuos agrícolas, y el conocimiento sobre su composición es limitado. Nuestro objetivo fue la obtención de extractos de vMp, con elevada concentración de CP y capacidad antioxidante (CA) mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), optimizada con metodología de superficie de respuesta. A fin de optimizar las condiciones de extracción se aplicó un diseño experimental (Box-Behnken; programa Design Expert). Se usaron tres variables independientes: concentración de etanol; amplitud del ultrasonido y tiempo de extracción, y dos variables de respuesta: contenido de polifenoles totales (CPT) y CA. El CPT se determinó por el método de Folin-Ciocalteu y la CA a través de la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Las condiciones óptimas fueron, etanol 30%; 10 min y amplitud 80%, y obtuvimos 274,21 mg GAE g⁻¹ de CPT y 2,41 mmol TEAC g⁻¹ de CA, concordado con los valores predichos y validando nuestro modelo estadístico. En los extractos optimizados se evaluó presencia de L-dopa utilizando HPLC-DAD. Se encontró un considerable contenido de L-Dopa de 7,45%, concentración que se halla dentro de los valores más altos reportados para semillas de MP. Los resultados sugieren que las vMP podrían considerarse potencial fuente de CP con CA y del compuesto L-Dopa, que pueden ser extraídos mediante técnicas eficientes, rentables y ecológicamente amigables a partir de un desecho agrícola regional.

Palabras clave: polifenoles, metodología de superficie de respuesta, levodopa

Introducción

La *Mucuna pruriens* (MP) es una legumbre, cuyo cultivo se ha incorporado en la cultura agronómica de la región del noreste argentino (NEA). Las semillas poseen un alto contenido de proteínas (20-26 %) de buena calidad nutricional y una elevada cantidad de almidón (30-50 %) (Chinapolaiah et al., 2019). Además, contienen elevadas cantidades de componentes bioactivos, entre los que se destacan los polifenoles (PFs) con efectos beneficiosos para la salud (Kavitha C & Thangamani C, 2014) y el aminoácido no proteico *L*-3,4-dihidroxifenilalanina (*L*-DOPA) o levodopa, precursor directo del neurotransmisor dopamina, que se utiliza ampliamente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Las vainas de MP (Figura 1), consideradas residuos agrícolas, también contienen compuestos bioactivos, sin embargo, el conocimiento sobre su composición es muy limitado.



Figura 1. Vainas de *Mucuna pruriens* con semillas.

Objetivos

Con el propósito de maximizar la obtención de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante a partir vainas de MP, en este trabajo se realizó la optimización de las condiciones de extracción aplicando un diseño experimental de superficie de respuesta (RSM).

Materiales y Métodos

1-Material: Se trabajó con vainas de Mp (vMp) provistas por la Estación Experimental Agropecuaria El Sombrero, Corrientes (INTA). El material vegetal se molió, tamizó y almacenó a 10 °C.

2-Diseño experimental: Se empleó RSM, mediante el diseño Box-Behnken Design (BBD) utilizando el programa Design Expert® (Design Expert, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN). Se evaluaron los efectos de tres variables independientes: tiempo de extracción (min), concentración de etanol (%) y poder de extracción del ultrasonido (amplitud; %), sobre dos variables de respuesta: contenido polifenólico total (CPT) y capacidad antioxidante (CA). Se trabajo con un diseño en un bloque, con tres factores de tres niveles y cuatro puntos centrales, lo que arrojó un total de 16 experimentos. El orden de los

experimentos fue aleatorio. En la Tabla 1 se detallan los niveles empleados.

3-Obtención de extractos: A una solución 1:10 de muestra/solvente se aplicó ultrasonido de alta intensidad utilizando procesador ultrasónico (VCX500, Sonics, EE.UU.). Los tratamientos se realizaron según las condiciones obtenidas del diseño experimental (ver Tabla 1). La solución resultante se centrifugó, se filtró y luego se eliminó el solvente usando rotavapor (RE100-PRO DragonLab). Las soluciones acuosas se liofilizaron (Liofilizador CHRIST Alpha 1-4 LO).

4-Contenido de Polifenoles totales: se determinó de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu descrito por Vázquez et al. (Vázquez et al., 2008). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalentes/g de extracto (mg AGE/g).

5-Capacidad antioxidante: Se empleó el método de Brand-Williams et al. (Brand-Williams et al., 1995) con algunas modificaciones. Se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), por medio de la disminución en la absorbancia leída a 517 nm en un lector de multiplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific), y se comparó el valor con la curva de referencia

construida con Trolox como patrón primario, expresando los resultados como mmoles trolox/g extracto (TEAC/g)

6-Cuantificación de *L*-dopa por HPLC: La cuantificación de *L*-dopa se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Rathod *et al.* (Rathod et al., n.d.) para semillas de Mp. Fue necesario realizar ligeras modificaciones al método, debido a que se tuvo que adaptar a la matriz utilizada. El extracto sólido de vMp se disolvió con HCl 0,1 N, se realizó una dilución 1:2 usando la fase móvil como solvente. La muestra filtrada fue sometida a cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) con detector de matriz de fotodiodos operándose a 280 nm. Como patrón, se utilizó 1 mg de *L*-dopa disuelto en 200 μ L de HCl acuoso 0,1 N y luego se llevó a 1 mL con fase móvil. Para la fase móvil se preparó una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (5: 3: 2) con 0,2% de trietilamina, se llevó a un pH aproximado de 3,3. Se utilizó un volumen total de 20 μ L para la inyección y un flujo de 1 mL/min. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18. La adquisición y evaluación de datos se realizó con base en una curva de calibración previamente establecida.

8-Análisis estadístico: las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados

se evaluaron a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) con el Programa Infostat. (Park et al., 2011)

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestra la matriz experimental y los resultados obtenidos para cada condición de extracción. En la Figura 1 se representan los gráficos de superficie respuesta obtenidos.

Tabla 1. Diseño experimental y resultados de las variables de estudio.

E	T	A	CE	CPT	CA
1	20	80	50	240,55 ± 7,08	1,58 ± 0,35
2	15	80	100	87,8 ± 2,77	0,57 ± 0,95
3	15	80	0	305,47 ± 3,37	1,58 ± 0,32
4	10	0	50	265,66 ± 5,54	1,63 ± 0,45
5	15	0	100	56,22 ± 1,40	0,43 ± 0,26
6	15	0	0	177,89 ± 6,29	1,48 ± 1,20
7	15	40	50	229,72 ± 6,14	1,88 ± 0,49
8	15	40	50	236,91 ± 2,34	1,55 ± 1,22
9	10	80	50	360,86 ± 6,42	2,50 ± 0,72
10	10	40	100	35,47 ± 1,00	0,26 ± 0,53
11	20	40	0	275 ± 0,86	0,74 ± 0,51
12	15	40	50	341,92 ± 0,73	1,35 ± 0,65
13	20	0	50	253,35 ± 2,53	1,83 ± 1,02
14	10	40	0	258,91 ± 4,87	1,40 ± 0,98
15	15	40	50	201,39 ± 6,36	1,61 ± 1,11
16	20	40	100	70,19 ± 1,41	0,25 ± 0,32

E: experimento; T: tiempo (min); A: amplitud (%); CE: concentración de etanol (%). Los resultados se expresan como media ± sd.

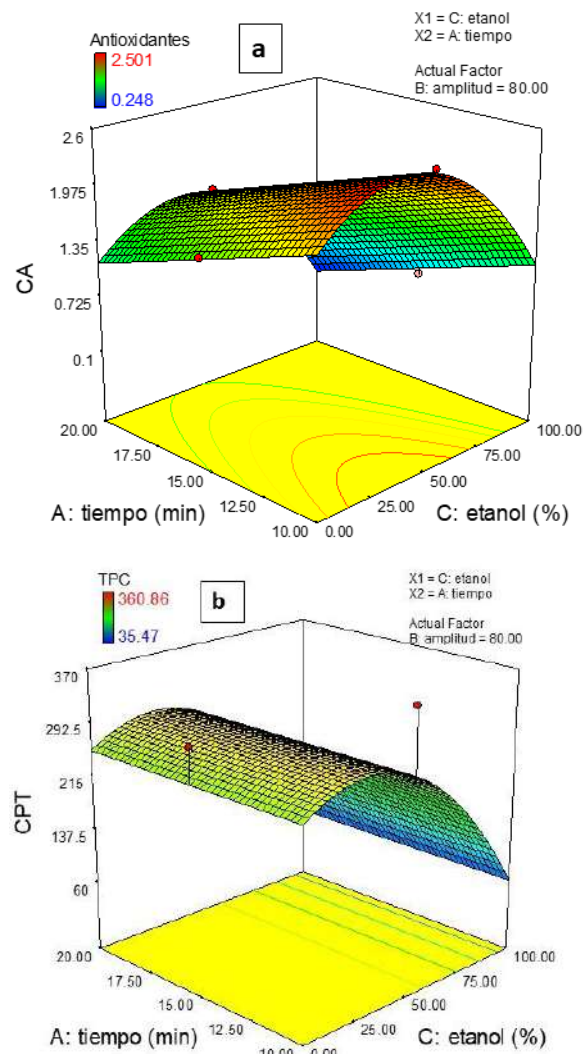


Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta del diseño experimental (amplitud de 80%). a) CA (TEAC/g) y b) CPT (mg AGE/g).

El mayor CPT y la CA más efectiva, se obtuvieron empleando 50% CE, 80% de amplitud y 10 min (360,86 mg AGE/g; 2.50 TEAC/g). La CE fue la variable crítica, detectándose valores elevados de CPT y CA entre 0% y 50 % CE; y una notable disminución para 100 % CE, lo cual

concuera con el efecto de la polaridad del solvente sobre el proceso de extracción (Alothman et al., 2009).

En la Tabla 2 se muestran las condiciones óptimas de extracción, calculadas por el software, considerando el mismo peso estadístico a las variables de respuesta. Se realizaron tres experimentos independientes usando las condiciones optimizadas y determinando las dos variables de respuesta.

TABLA 2. Condiciones óptimas de extracción predichas por el modelo estadístico y las obtenidas experimentalmente.

	T	CE	A	CPT	CA
Predicho	10	30	80	287,54	2,50
Experimental	10	30	80	274.21± 11,43	2,41± 0,11
RSD				3,97	4,4
%					

T: tiempo (min); A: amplitud (%); CE: concentración de etanol (%). Los resultados se expresan como media ± sd.

Estos resultados validaron nuestro modelo ya que los valores experimentales concuerdan con los predichos. La desviación residual estándar (% RSD) del valor predicho fue relativamente baja (<5). Los extractos obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonido mostraron valores notables de compuestos polifenólicos y de actividad antioxidante

para las vMp estudiadas, contenido de los cuales existe poca o nula información para esta parte de la planta, no obstante, se conoce que las semillas, poseen elevado contenido polifenólico y buena actividad antioxidante (Vázquez Encalada & Segura Campos, 2020).

Los datos obtenidos por HPLC (Figura 2) demuestran la presencia de *L*-dopa en extracto de vMP, cuya concentración es significativa (7,45% ± 0,07 mg%) respecto a lo cuantificado en extractos de semilla de MP (9,50% ± 0,05 mg%), obtenidos bajo las mismas condiciones de extracción. El contenido de *L*-dopa reportado para semilla de *Mucuna pruriens* está en el rango de 1,25-9,16 % (Ingle, 2003). Es de nuestro conocimiento que, la presencia de *L*-dopa en vainas de las legumbres *Mucuna* no ha sido reportada en la literatura, por lo tanto, resulta muy alentador para nuestra investigación, tanto la presencia como la concentración hallada en las vainas de *Mucuna pruriens* de nuestra región.

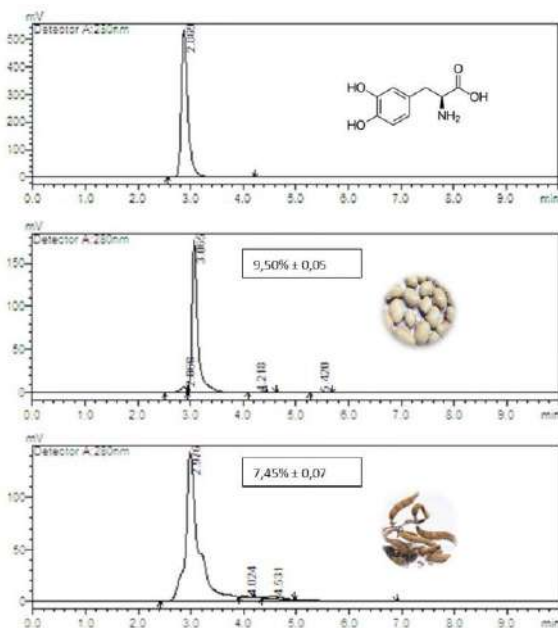


Figura 2. Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC-DAD4 a) Patrón de *L*-dopa b) Extracto de semilla de Mp c) Extracto de vMP. Valores expresados en g/100 g de muestra seca.

Conclusiones

Los resultados mostraron que las vMP contienen una apreciable cantidad de compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante.

Las condiciones óptimas de extracción mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta lograron maximizar la obtención de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, a partir de las vMp.

El solvente fue el factor que más afectó las variables respuestas.

En los extractos optimizados se identificó y cuantificó *L*-dopa, lo cual es un resultado muy prometedor, para considerar a las vMP como potencial fuente de este valioso compuesto. Asimismo, se evidenció que los extractos de vMP inhiben la enzima α -amilasa, por lo tanto, podrían influir en el metabolismo de la glucosa, lo cual resulta atractivo por sus posibles aplicaciones en el campo de la medicina.

Este estudio permite diseñar procedimientos de extracción eficientes, económicos y ecológicamente amigables para la obtención de compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante a partir de un desecho de la agricultura de nuestra región, lo que conllevaría al agregado de valor de un cultivo regional.

Bibliografía

- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785–788. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.12.005>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.



[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Chinapolaiah, A., K., H. B., G.N., M., Thondaiman, V., Keshava Rao, V., N., H. R., & S., S. K. (2019). Variability in L-Dopa and other biochemical composition of *Mucuna pruriens* (L.) an underutilized tropical legume. *Industrial Crops and Products*, 138, 111447.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.06.010>

Kavitha C, & Thangamani C. (2014). *Journal of Medicinal Plants Research* Amazing bean “*Mucuna pruriens*”: A comprehensive review. 8(2), 138–143.
<https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5036>

Park, Y. S., Jeon, M. H., Hwang, H. J., Park, M. R., Lee, S. H., Kim, S. G., & Kim, M. (2011). Antioxidant activity and analysis of proanthocyanidins from pine (*Pinus densiflora*) needles. *Nutrition Research and Practice*, 5(4), 281–287.
<https://doi.org/10.4162/NRP.2011.5.4.281>

Rathod, B. G., Patel, N. M., & Laxminarayan, S. (n.d.). *Development of validated RP-HPLC method for the estimation of L-Dopa from Mucuna*

pruriens, its extracts and in Aphrodisiac formulation.

Vázquez Encalada, S., & Segura Campos, M. R. (2020). *Mucuna pruriens* fiber: nutritional, functional and biological properties. *Food Science and Technology*, 41(1), 120–126.
<https://doi.org/10.1590/FST.39719>

Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Álvarez, J., & Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 279–285.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2008.03.003>

Financiamiento

El desarrollo de este proyecto se lleva a cabo con fondos provenientes del proyecto PI: 18V001, SGCyT-UNNE. Res. N° 1100/18 C.S. “Aprovechamiento de residuos agrícolas de la provincia de Corrientes para la obtención de compuestos bioactivos”. (Monto otorgado: \$ 80.000, Período: 2019 – 2023).