

# TEORÍA Y APLICACIONES DE LA QUÍMICA ANALÍTICA EN MÉXICO

Número 2, enero-diciembre 2024



**TEORÍA Y APLICACIONES DE LA QUÍMICA ANALÍTICA EN MÉXICO, Número 2, enero-diciembre 2024, es una publicación anual editada por la Asociación Mexicana de Química Analítica A.C. (AMQA), San Francisco 1626, Despacho 808, Colonia del Valle, Benito Juárez, 03100 Ciudad de México, teléfono: 8186580264, <https://taqam.amqa.org.mx/> y [editortaqam@amqa.org.mx](mailto:editortaqam@amqa.org.mx). Editor responsable: Marsela Garza Tapia. Reserva de derechos al Uso Exclusivo No. 04-2024-052812125300-102, ISSN: 3061-7758, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Asociación Mexicana de Química Analítica, San Francisco 1626, Despacho 808, Colonia del Valle, Benito Juárez, 03100 Ciudad de México, Marsela Garza Tapia, fecha de última modificación: 20 de diciembre 2024.**

**El contenido de los artículos es responsabilidad de los autores y no refleja el punto de vista de los árbitros, del Editor o de la AMQA. Se autoriza la reproducción total o parcial de los textos aquí publicados siempre y cuando se cite la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.**

## Editorial

Asociación Mexicana de Química Analítica, A.C.

## Editor

Marsela Garza Tapia

ISSN: 3061-7758

Revista de difusión de la ciencia

## Comité editorial

Miembro	Universidad
Dr. Alberto Rojas Hernández	Universidad Autónoma Metropolitana
Dr. Carlos Andrés Galán Vidal	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo	Universidad Autónoma De Baja California
Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas	Universidad Nacional Autónoma de México
Dra. Gabriela Roa Morales	Universidad Autónoma del Estado de México
M. en C. Gabriel Palacios Huerta	Universidad de Guadalajara
Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Dra. Iliana Margarita de la Garza Rodríguez	Universidad Autónoma de Coahuila
Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Dr. Jorge Martínez Guerra	Universidad Autónoma Metropolitana
Dr. José Antonio Reyes Aguilera	Universidad de Guanajuato
Dr. José Antonio Rodríguez Ávila	Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo
Dra. María del Pilar González Muñoz	Universidad De Guanajuato
Dra. María Gabriela Vargas Martínez	Universidad Nacional Autónoma de México
Dra. Minerva Monroy Barreto	Universidad Nacional Autónoma de México
Dra. Norma Rodríguez Laguna	Universidad Nacional Autónoma de México
Dra. Patricia Balderas Hernández	Universidad Autónoma del Estado de México
M. en C. Silvia Citlalli Gama González	Universidad Nacional Autónoma de México

## Prefacio

Con gran entusiasmo presentamos este nuevo número de la revista “Teoría y Aplicaciones de la Química Analítica en México”. Tras su relanzamiento el año pasado, nos complacer continuar avanzando en la difusión de la Química Analítica en nuestro país.

La comunidad profesional y estudiantil vinculada a la Química Analítica en México, ha contribuido generosamente para este número, dándonos la oportunidad de recabar estos manuscritos que nos muestran el desarrollo de esta ciencia a lo largo y ancho de nuestro territorio.

Desde los estudios fundamentales hasta el uso y aplicación de normativas en la Química Analítica, los autores abordan una amplia gama de temas que orientan a la comunidad en la comprensión y resolución de problemas importantes, no solo para la Química Analítica, sino también para áreas relacionadas del conocimiento.

Estamos convencidos que, a través de “Teoría y Aplicaciones de la Química Analítica en México” se fortalecerá la comunicación y colaboración entre los profesionales de esta disciplina, permitiéndonos enfrentar juntos los retos actuales y contribuir al bienestar de la sociedad.

Agradecemos a los autores, revisores y colaboradores que hicieron posible este número. Su tiempo, conocimientos y experiencia permiten mantener los estándares de calidad y valores que la AMQA ha promovido por tantos años.

Esperamos que este número les inspire a continuar avanzando en sus propias investigaciones y ha seguir explorando juntos el fascinante y desafiante camino que nos ofrece la Química Analítica.

## Índice

Prefacio	4
Evaluación de extractos ricos en polifenoles a partir de subproductos del jitomate obtenidos por diferentes métodos	7
Estudio de las propiedades químico-analíticas del cacao	19
Estudio electroquímico sobre la formación de complejos de ácido carnínico con cationes $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Al}^{3+}$ y $\text{Cu}^{2+}$ .	35
Elaboración e implementación de materiales didácticos interactivos para la enseñanza de Química Analítica	45
Determinación de nitritos en embutidos mediante análisis digital de imagen	52
Cuantificación de fenoles totales en extracto acuoso de <i>Caléndula Officinalis L.</i>	59
Síntesis de un hidrogel composite para la cuantificación de metales pesados presentes en matrices complejas	70
Extracción de Au(III) con sílices funcionalizadas con grupos metilimidazolio	79
Cálculo de la constante de unión para determinar la eficiencia de intercalación de la arcilla laponita cargada con metotrexato	90
Contribuciones a la caracterización electroquímica de la dopamina y polidopamina	96
Remoción de metales pesados en presencia de un contaminante emergente utilizando <i>Euphorbia antisyphilitica Zucc</i> como bioadsorbente.	109
Interpretación de las valoraciones de soluciones de diclofenaco sódico y de ftalato ácido de potasio con ácido perclórico, en ácido acético glacial	120
Biosensor electroquímico para la detección de peróxido de hidrógeno.	130
Determinación de ácido ascórbico mediante polarimetría: aplicación a docencia para análisis instrumental	142
Caracterización analítica de compuestos lignocelulósicos provenientes de desechos agroindustriales.	150
Determinación de las constantes de acidez del zincon en medio acuoso por espectrofotometría de UV-Vis	164
Separación electroforética de hidrocarburos monoaromáticos mediante cromatografía electrocinética micelar	171

Aplicación de la Norma ISO 9001:2015 en el Diseño y Desarrollo de Métodos para la Detección Y Cuantificación de Saxitoxina en Moluscos Bivalvos mediante UPLC-MS/MS _____	178
Adsorción de cobre mediante el uso de masilla modificada químicamente _____	190
Parámetros cromatográficos de los derivados de 2,4-DNPH de carbonilos comunes en un ambiente laboral _____	201
Desarrollo de un método de extracción asistida por ultrasonido y microextracción en una sola gota por inmersión directa para la detección de cannabidiol en una muestra comercial de cigarro	208

# Evaluación de extractos ricos en polifenoles a partir de subproductos del jitomate obtenidos por diferentes métodos

Jared Mauricio López Téllez<sup>a</sup>, María del Pilar Cañizares Macías<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Circuito Exterior S/N Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510 Ciudad de México, México, \*e-mail: [pilarm@unam.mx](mailto:pilarm@unam.mx)

## Resumen

En el presente trabajo se evaluaron cuatro métodos de extracción (Soxhlet (SOX), agitación (AGI), ultrasonidos (US) y microondas (MO)) para la obtención de extractos ricos en polifenoles a partir de la piel y las semillas del jitomate. La optimización de la extracción se realizó mediante una estrategia univariable para SOX, y estrategias multivariadas para AGI, US y MO, maximizando el índice de polifenoles totales. Los extractos obtenidos fueron analizados con los ensayos Folin-Ciocalteu y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, así como HPLC-UV para determinar ácido gálico, cafeico, clorogénico, quercetina y kaempferol. Los resultados se procesaron con análisis de componentes principales, demostrando que AGI presentó la mejor recuperación de polifenoles. Los extractos de US obtuvieron índices de polifenoles totales y capacidad antioxidante menores a AGI, pero las concentraciones individuales no tuvieron diferencias significativas, siendo 90 % más rápido. La extracción MO también disminuyó el tiempo en un 66 % respecto a AGI, sin embargo, un decremento del 30 % en todos los valores fue observado. Por su parte, SOX demostró una pobre eficiencia en un tiempo prolongado de análisis. Los subproductos del jitomate demostraron ser fuentes de polifenoles antioxidantes que podrían ser utilizados en las industrias farmacéuticas y alimentarias en marco de la economía circular.

**Palabras clave.** *Polifenoles; Subproductos del jitomate; Extracción; Economía circular*

## Abstract

In this work, four extraction methods (Soxhlet (SOX), shaking (AGI), ultrasounds (US) and microwaves (MO)) were evaluated for obtaining polyphenol-rich extracts from tomato peel and seeds. Extraction optimization was performed using univariate strategy for SOX, and multivariate strategies for AGI, US and MO, maximizing total polyphenol index. Obtained extracts were analyzed with Folin-Ciocalteu and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assays, as well as HPLC-UV to determine gallic, caffeic, chlorogenic acid, quercetin and kaempferol. The results were processed with principal component analysis, showing that AGI showed the best polyphenol recovery. US extracts obtained total polyphenol and antioxidant capacity indexes lower than AGI, but individual concentrations without significant differences, being 90% faster. MO also decreased time by 66% compared to AGI, however, a 30-% decrease in all values was observed. By its way, SOX showed poor efficiency over a prolonged analysis time. Tomato by-products proved to be sources of polyphenols with high antioxidant activity for potential pharmaceutical and food applications within the framework of the circular economy.

**Keywords.** *Polyphenols; Tomato by-products; Extraction; Circular economy*

## 1. Introducción

La economía circular es un modelo de producción y consumo que implica compartir, alquilar, reutilizar, reparar, renovar y reciclar materiales y productos existentes todas las veces que sea posible para crear un valor añadido [1]. En este sentido, cualquier proceso que involucre el aprovechamiento de los residuos agroindustriales se considera sumamente ventajoso.

De acuerdo con la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), el jitomate (*Lycopersicon esculentum* P. Mill) es la segunda industria hortícola distribuida a nivel mundial, con una producción de más de 186 millones de toneladas anuales [2,3].

Sin embargo, esta industria genera aproximadamente 8.5 millones de toneladas de subproductos al año, constituidas de piel (61 %), semillas (38 %) y algunos tejidos residuales ( $\leq 1$  %), con un impacto económico y ambiental grave. Por ejemplo, el Banco de México estima que los millones de toneladas de residuos generados al año equivalen al 2.5 % del producto interno bruto anual, con una elevada producción de gases de efecto invernadero, y un desperdicio de millones de litros de agua.

Los subproductos del jitomate han sido tradicionalmente empleados como alimento para ganado, la producción de compostas y la obtención de colorantes. Adicionalmente, estos han demostrado ser fuentes ricas de una gran cantidad de moléculas bioactivas como fibra, aminoácidos, vitaminas, minerales, proteínas, ácidos grasos, fitoesteroles, ácidos orgánicos, carotenoides, polifenoles, entre otros, lo que ha permitido la utilización de extractos, aceites, pociones e infusiones en los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético [4]. Esencialmente, la capacidad antioxidante, es decir, el potencial para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato en presencia de radicales, de estas moléculas han incrementado sus aplicaciones industriales.

Sí bien, los carotenoides son los principales antioxidantes ya que representan hasta el 70 % de la composición química total, su naturaleza altamente hidrofóbica hace necesario el uso de elevadas cantidades de disolventes orgánicos volátiles para su extracción, traducándose en un impacto ambiental grave y, de igual manera, extractos con muy poca biodisponibilidad [5].

Por otra parte, los polifenoles son metabolitos minoritarios, de naturaleza polar y semipolar, con elevada biodisponibilidad y actividad antioxidante presentes en los subproductos del jitomate. Estos antioxidantes se han utilizado para la prevención y tratamiento de enfermedades humanas y el mejoramiento de las propiedades organolépticas y la vida media de alimentos. A pesar de ello, los trabajos dedicados en la recuperación de polifenoles a partir de la piel y las semillas del jitomate son escasos. Por otra parte, no hay estudios suficientes que permitan establecer ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de extracción sobre los resultados.

En este contexto, el objetivo del trabajo fue evaluar el desempeño de cuatro métodos de extracción (Soxhlet (SOX), agitación (AGI), ultrasonidos (US) y microondas (MO)) para la obtención de extractos ricos en polifenoles a partir de la piel y las semillas de jitomate, determinando la dependencia entre la composición fenólica de la matriz y la técnica de extracción.

## 2. Experimental

### 2.1. Reactivos y disolventes

Todos los disolventes grado HPLC, utilizados en los análisis cromatográficos, el reactivo Folin–Ciocalteu (F–C, 2 N), carbonato de sodio, el reactivo 2,2–difencil–1–picrilhidrazilo (DPPH), ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, quercetina y kaempferol fueron de Sigma–Aldrich (EUA).

### 2.2. Muestras y su pretratamiento

Cinco kilogramos de fruto de jitomate fresco se adquirieron en mercados locales de la ciudad de México, cumpliendo con las características de un “fruto grande” de acuerdo con la norma mexicana NMX–FF–031–1997–SCFI “Productos Alimenticios No Industrializados Para Consumo Humano – Hortalizas Frescas – Tomate – (*Lycopersicon Esculentum* P. Mill.) – Especificaciones”: frutos enteros de apariencia fresca, color rojo, razonablemente formados, de 59–71 mm de diámetro, sin daño, compactos y de consistencia firme.

Una vez en el laboratorio, las muestras se lavaron con agua desionizada, se secaron con papel adsorbente y se separaron en piel y semillas. Después, la piel y las semillas se secaron en horno a  $45 \pm 2$  °C durante 60 h, se pulverizaron y se tamizaron a un diámetro de 0.40 mm. En seguida, se preparó un ‘pool’ de muestras de piel y semillas para simular una matriz completamente exprimida tal como en las industrias, el cual se almacenó a  $-20$  °C en oscuridad hasta su análisis. Este pool se utilizó durante todos los experimentos.

### 2.3. Estimación de los índices de polifenoles totales y capacidad antioxidante

El ensayo FC se empleó para la estimación del índice de polifenoles totales: 100  $\mu$ L de extracto se mezclaron con 100  $\mu$ L del reactivo FC ( $1 \text{ Eq L}^{-1}$ ) y 800  $\mu$ L de una disolución amortiguadora de carbonatos ( $500 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 10), incubando la reacción en oscuridad durante 15 min y midiendo la absorbancia a 760 nm. El índice de polifenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca ( $\text{mg EÁG g}^{-1}$ ).

La estimación del índice de capacidad antioxidante se llevó a cabo aplicando el ensayo DPPH: 80  $\mu$ L de extracto se mezclaron con 800  $\mu$ L de reactivo DPPH ( $500 \text{ mmol L}^{-1}$  en metanol/agua (80/20, v/v)) y, después de 10 min, la absorbancia se midió a 517 nm. El porcentaje de reducción se calculó de acuerdo con la ecuación 1:

$$\%Reducción = \left(1 - \frac{Absorbancia_{muestra}}{Absorbancia_{blanco}}\right) \times 100 \quad (1)$$

dicho porcentaje fue directamente proporcional a la capacidad antioxidante, expresada como  $\mu\text{mol EÁG g}^{-1}$  de muestra seca. Para los ensayos FC y DPPH, se construyeron las curvas de calibración por estándar externo, utilizando disoluciones de ácido gálico en metanol/agua (80/20, v/v) bajo las condiciones descritas. El intervalo de trabajo del ensayo FC fue 20–80 mg GAE  $\text{L}^{-1}$ , y para el ensayo DPPH fue 10–40  $\mu\text{mol GAE L}^{-1}$ .

#### 2.4. Optimización de las condiciones de extracción para los diferentes métodos

Las condiciones de los cuatro métodos de extracción se establecieron evaluando diferentes parámetros fisicoquímicos que afectan la eficiencia de cada técnica en específico.

Para el método SOX se evaluó el efecto de la composición del extractante etanol/agua (entre 50/50 y 90/10, v/v), el volumen de éste (de 100 a 200 mL) y el tiempo de extracción fue de 6 h. Los experimentos se realizaron por triplicado, usando 5 g de muestra y temperatura de 70 °C.

Para los métodos AGI, US y MO, se llevó a cabo una optimización multivariable combinando el diseño Plackett–Burman (PB), para identificar los factores con efectos significativos de cada técnica, y el Box–Behnken (BB), para determinar las condiciones óptimas de los factores significativos [6]. Para el diseño PB, cada factor se asignó con un valor bajo (–) y uno alto (+) para construir la matriz, dando un total de 12 experimentos. Las variables y sus valores se muestran en la Tabla 1. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y el índice de polifenoles totales se empleó como la variable de respuesta.

**Tabla 1.** Valores experimentales de factores estudiados en los diseños PB.

Factor	(–)	(+)
<i>Método AGI</i>		
Tiempo de extracción (h)	1	6
Velocidad de agitación (rpm)	150	600
Temperatura (°C)	25	50
Etanol-agua (v/v)	50/50	90/10
Volumen de extractante (mL)	10	50
Disolvente orgánico	Metanol	Etanol
<i>Método US</i>		
Tiempo de extracción (min)	5	20
Sonicación (s)	10	30
Relajación (s)	10	30
Etanol-agua (v/v)	50/50	90/10
Volumen de extractante (mL)	20	40
Disolvente orgánico	Metanol	Etanol
<i>Método MO</i>		
Tiempo de extracción (min)	10	30
Irradiación (s)	1	2
Poder (%)	10	90
Etanol-agua (v/v)	50/50	90/10
Volumen de extractante (mL)	20	40
Disolvente orgánico	Metanol	Etanol

Después, los resultados se analizaron con el software *STATGRAPHICS Centurion XVI* (Stat point Technologies, EUA) para describir el comportamiento de cada factor independiente y se trazó el diagrama de Pareto para observar la influencia individual de los factores.

Posteriormente, para el diseño BB, a cada factor se le asignó un valor central (0), aparte de sus valores bajo y alto, dando un total de 15 experimentos, realizados por duplicado. La Tabla 2 presenta los valores centrales utilizados para cada factor significativo.

**Tabla 2.** Valores centrales de los factores significativos en los diseños BB.

Método AGI		Método US		Método MO	
Factor	Valor central	Factor	Valor central	Factor	Valor central
Temperatura (°C)	37	Tiempo de extracción (min)	12	Tiempo de extracción (min)	20
Etanol-agua (v/v)	75/25	Sonicación (s)	20	Potencia (%)	50
Volumen de extractante (mL)	30	Etanol-agua (v/v)	75/25	Etanol-agua (v/v)	75/25

Se estimaron el índice de polifenoles totales, el índice de capacidad antioxidante y el porcentaje de recuperación de sólidos en los extractos, y se utilizó una función de deseabilidad como variable de respuesta para seleccionar las condiciones que maximizaban los tres parámetros. Los resultados se analizaron con el software *STATGRAPHICS* y se seleccionaron como óptimas las condiciones de aquel experimento que presentó mayor valor de deseabilidad.

### 2.5. Estudios de precisión y recuperación

Las precisiones intra-día e inter-día se estimaron de la siguiente manera: en las condiciones óptimas de cada método, las muestras se extrajeron por duplicado durante 7 días, y luego los extractos se analizaron mediante los ensayos FC y DPPH. Posteriormente, se llevó a cabo una prueba ANOVA de un factor (95 % de confianza) para calcular el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) [7].

Para la recuperación, las muestras se adicionaron con 5 mg de estándar de ácido gálico y se sometieron a agitación lenta durante 24 h, y luego se extrajeron utilizando condiciones óptimas de cada método por triplicado. Los extractos se analizaron mediante los ensayos FC y DPPH, y las recuperaciones se calcularon como se indica en la ecuación 2:

$$\%Recuperación = 100 \left( \frac{C_1}{C_0} \right) \quad (2)$$

donde  $C_1$  y  $C_0$  son las concentraciones después y antes del análisis, respectivamente. De acuerdo con las directrices de la AOAC [7], el criterio de aceptación es < 20 % de %DER para precisión y entre 80 y 120 % para la recuperación.

### 2.6. Determinación de un panel de polifenoles en los extractos por HPLC-UV/MS

Se determinó la presencia de los ácidos gálico, cafeico y clorogénico, y quercetina y kaempferol (figura 1). La separación se realizó en un HPLC Agilent 1260 Infinity equipado con bomba cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador y detector de arreglo de diodos (Agilent Technologies, EUA). Se utilizó una columna ZORBAX Extend-C18 (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) (Agilent Technologies), 5  $\mu$ L de volumen de inyección y un caudal de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. La fase móvil se compuso de ácido acético al 0.2 % (A) y metanol (B). Se empleó el siguiente gradiente: 0-3 min a 30% B, 3-5 min de 30 a 50% B, 5-6 min a 50 % B, 6-8 min de 50 a 70% B, 8-12 min 70 % B, regresar a condiciones iniciales a 14 min. El ácido gálico, quercetina y kaempferol se detectaron a 260 nm y, ácidos cafeico y clorogénico a 324 nm. Se construyeron las curvas de calibración por estándar externo de cada polifenol en un intervalo de 5 a 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> en metanol y se midieron para su cuantificación.

Los polifenoles se confirmaron por HPLC-MS con fuente de electronebulización y analizador triple cuadrupolo 6410 (Agilent Technologies, EUA). La fuente se empleó en modo negativo, adquiriendo los espectros en modo full-scan (intervalo de 50 y 1650  $m/z$ ) y la presión de 30 psi. El voltaje capilar y cono se ajustó a 5 kV y 167 V, respectivamente, y la temperatura a 350 °C. Los datos se procesaron en el software MassHunter (Agilent Technologies, EUA).

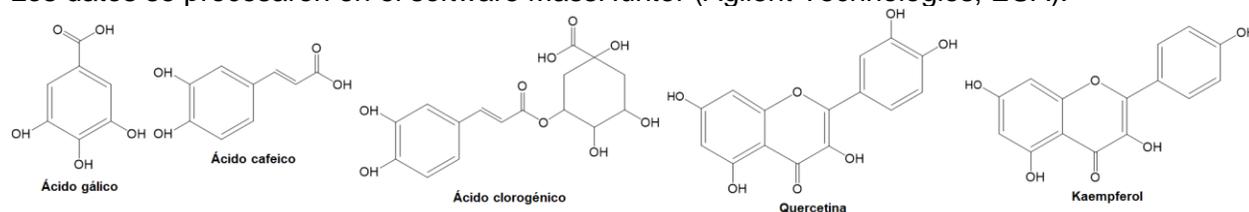


Figura 1. Estructura de los polifenoles modelo empleados en el estudio.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Evaluación de los métodos por espectrofotometría y HPLC-UV

El intervalo de trabajo del ensayo FC se obtuvo la ecuación:  $y = 0.0130 (\pm 0.0001) [x] - 0.1795 (\pm 0.0102)$ , y para el ensayo DPPH la ecuación:  $y = 1.9809 (\pm 0.0240) [x] + 1.6707 (\pm 0.6521)$ . Los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) para los ensayos FC y DPPH fueron de 0.9914 y 0.9937, respectivamente, indicando buena linealidad de ambos intervalos. Además, los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron mediante los coeficientes de regresión de la curva de calibración [6], resultando en 2.53 y 7.96 mg GAE mL<sup>-1</sup> para el ensayo FC, y de 1.08 y 3.29  $\mu$ mol GAE L<sup>-1</sup> para el ensayo DPPH, respectivamente. Por su parte, la repetibilidad resultó aceptable, a tres niveles, con %DER entre 3.93-11.32 % para ambos ensayos, estando en concordancia con los lineamientos de la AOAC [2]. En el caso del método por HPLC-UV, los valores de las ecuaciones de regresión, los LD y LC, y la repetibilidad inter-corrída se presentan en la Tabla 3, siendo aceptables en todos los casos.

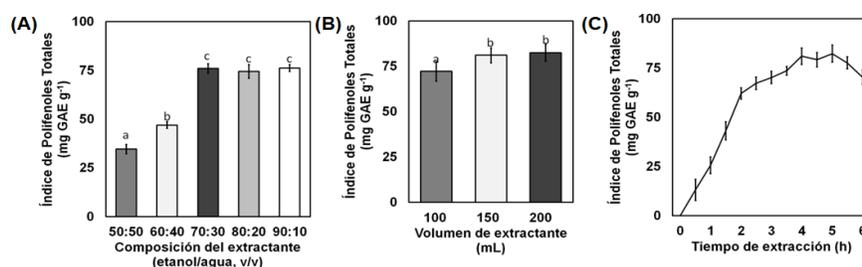
**Tabla 3.** Coeficientes de regresión, LD y LC, y repetibilidad del método por HPLC-UV. (n = 3).

Polifenol	Ecuación	$r^2$	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Repetibilidad*
Ácido gálico	$y = 648910 (\pm 6425) [x] + 161928 (\pm 1949)$	0.9984	0.99	3.00	0.26-2.37
Ácido cafeico	$y = 12592 (\pm 2426) [x] - 64366 (\pm 736)$	0.9979	1.14	3.46	0.49-1.86
Ácido clorogénico	$y = 114000 (\pm 11167) [x] + 7903 (\pm 3388)$	0.9984	0.97	2.96	0.22-2.20
Quercetina	$y = 232734 (\pm 2373) [x] - 181207 (\pm 7200)$	0.9983	1.02	3.09	1.04-7.42
Kaempferol	$y = 855754 (\pm 16593) [x] - 143000 (\pm 5035)$	0.9940	1.94	5.88	0.46-6.29

\*Expresada como porcentaje de desviación estándar relativa del área de los picos cromatográficos de las diferentes disoluciones estándar de cada polifenol (n = 9)

### 3.2. Optimización del método SOX

Se evaluaron las condiciones de la composición del extractante, el volumen del extractante y el tiempo de extracción, realizando los experimentos por triplicado con 5 g de muestra y 70 °C de temperatura. La figura 2 muestra un resumen de los resultados.



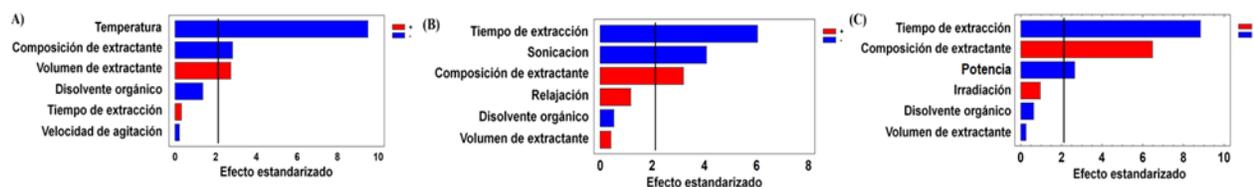
**Figura 2.** Efecto de la composición del extractante (A), el volumen de extractante (B) y el tiempo de extracción (C) en la eficiencia de extracción del método Soxhlet. (n = 3)

En la figura 2A se observa que a partir del 70 % de etanol en la mezcla, incrementó el índice total de polifenoles alrededor del 30%, indicando una presencia alta de polifenoles mayoritariamente polares y medianamente polares. La figura 2B muestra un incremento del índice de polifenoles totales conforme el volumen de extractante también aumenta. Con respecto al tiempo de extracción, se evaluó durante 6 h, midiendo el índice de polifenoles en el extracto cada 30 minutos (figura 2C). La extracción de los polifenoles aumentó en un 80 % hasta las 4 h, y disminuyendo después porque la temperatura provoca la degradación de los polifenoles. Las condiciones de extracción finales para el método SOX fueron: 5 g de muestra en 200 mL de etanol/agua 70/30 (v/v) durante 4 h a 70 °C en un aparato Soxhlet. Adicionalmente, la precisión fue buena con %DER en el intervalo de 11.39-15.34 %, y la recuperación resultó aceptable con un 117.10 %.

### 3.3. Optimización de los métodos AGI, US y MO 3.3.1. Diseño PB

En la figura 3 se muestran los resultados de las matrices de los diseños PB para la identificación de las variables con influencia significativa en los tres métodos mediante un diagrama de Pareto. *Composición de extractante:* Se evaluó variando el porcentaje de disolvente orgánico y agua durante la preparación de la mezcla hidroalcohólica usando metanol y etanol, sin observarse diferencias significativas entre ellos. Se seleccionó etanol para la comparación de los resultados con el método SOX. El contenido de agua fue significativo en todos los casos, pero el efecto fue distinto dependiendo del tipo extracción. El índice de polifenoles totales mejoró alrededor de 5 % en AGI cuando se usó un contenido de agua bajo, pero, para US y MO el índice aumentó 12 % a porcentajes de agua altos. En los tres métodos, la composición final de extractante se optimizó posteriormente.

*Volumen de extractante:* este factor no mostró influencia significativa para US y MO, eligiendo 20 mL de extractante. Sin embargo, en AGI, el índice de polifenoles totales incrementó 9.5 % cuando el volumen de extractante fue alto, ya que esta técnica necesita un largo período de contacto de la muestra con el extractante. Por ello, para esta técnica, este factor se optimizó posteriormente.



**Figura 3.** Diagramas de Pareto estandarizados para la identificación de factores influyentes en los métodos de extracción con agitación (A), ultrasonidos (B) y microondas (C). (n = 2)

*Tiempo y temperatura de extracción:* Para AGI, el tiempo de extracción, así como la velocidad de agitación, no mostraron diferencias significativas, por lo que se seleccionaron 1 h y 150 rpm, respectivamente. En el caso de la temperatura, tanto para AGI como para SOX, se presentó un incremento inversamente proporcional en el sistema, donde el índice de polifenoles totales aumentó cuando la temperatura fue más baja. Por lo tanto, este factor se optimizó posteriormente. En el caso de US, el índice de polifenoles mejoró alrededor del 50 % cuando el tiempo de extracción fue corto, y el tiempo de sonicación también lo fue. Si bien, un tiempo prolongado de sonicación mejora la presencia de fenómenos de cavitación, un elevado número de burbujas puede impedir la permeabilidad del extractante. Por lo anterior, se optimizaron el tiempo de extracción y de sonicación posteriormente. El período de relajación no fue significativo y se seleccionó 10 s para experimentos posteriores.

En el método MO, los extractos mostraron un incremento en el índice de polifenoles totales cuando el tiempo de extracción y la potencia fueron bajos. En este caso, la potencia de las

microondas se relaciona con la amplitud de la onda, donde su aumento permite una fácil disrupción celular, pero, al mismo tiempo, una elevación drástica de la temperatura, degradando los polifenoles. Ambos factores se optimizaron posteriormente.

### 3.3.2. Diseño BB

Los factores que resultaron significativos en los tres casos se optimizaron mediante un diseño BB, empleando una función de deseabilidad. La información del efecto de dichos factores sobre la eficiencia de cada extracción fue similar a la obtenida por el diseño PB, por lo cual, se seleccionaron como condiciones óptimas aquellas presentes en el experimento que obtuvo mayor valor de la función de deseabilidad.

Los valores óptimos fueron 0.5 g de muestra en 30 mL de etanol/agua 75/25 (v/v) durante 1 h a 37 °C y 150 rpm para AGI; 0.5 g de muestra en 20 mL de etanol/agua 75/25 (v/v) durante 5 min con ciclos de sonicación/relajación de 10 s y 45 % de amplitud para US; y 0.5 g de muestra en 20 mL de etanol/agua 50/50 (v/v) durante 20 min con ciclos de radiación/irradiación de 1 min a 30 W para MO. Los %DER estuvieron entre 6.79-15.68 % y las recuperaciones en el intervalo de 80.48-119.85 % para todos los métodos.

### 3.4. Caracterización y comparación de los extractos obtenidos por los diferentes métodos

A partir de los extractos obtenidos bajo las condiciones óptimas de los cuatro métodos, se determinaron el índice de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y la concentración de los polifenoles modelo.

La tabla 4 muestra el índice de polifenoles totales, el índice de capacidad antioxidante y el porcentaje de recuperación de sólidos, y la tabla 5 las concentraciones de los polifenoles en los diferentes extractos.

**Tabla 4.** Índice de polifenoles totales, índice de capacidad antioxidante y porcentaje de recuperación de sólidos en extractos de subproductos del jitomate usando cada método propuesto. (n = 6).

Método	Índice de polifenoles totales	Índice de capacidad antioxidante	Recuperación de sólidos
	mg GAE g <sup>-1</sup>	μmol GAE g <sup>-1</sup>	%
SOX	73.79 ± 1.42 <sup>a</sup>	81.09 ± 1.95 <sup>a</sup>	22.41 ± 3.42 <sup>a</sup>
AGI	253.14 ± 5.96 <sup>b</sup>	86.20 ± 1.63 <sup>b</sup>	21.64 ± 4.51 <sup>a</sup>
US	178.20 ± 2.99 <sup>c</sup>	82.64 ± 2.11 <sup>a</sup>	20.56 ± 2.89 <sup>a</sup>
MO	146.57 ± 4.11 <sup>d</sup>	75.02 ± 2.61 <sup>c</sup>	22.15 ± 3.67 <sup>a</sup>

La misma letra dentro de un grupo indica que no existe diferencias significativas ( $\alpha = 95\%$ ).

**Tabla 5.** Concentración de los polifenoles, por HPLC-UV, en los extractos de subproductos del jitomate obtenidos por los diferentes métodos propuestos. (n = 6).

Método	Ácido gálico	Ácido cafeico	Ácido clorogénico	Quercetina	Kaempferol
	mg g <sup>-1</sup> de muestra seca				
SOX	0.25 ± 5x10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	0.03 ± 4x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	0.05 ± 1.8x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	No detectado
AGI	3.38 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.57 ± 1.8x10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup>	0.55 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>a</sup>
US	3.36 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.56 ± 1.5x10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup>	0.67 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>
MO	2.39 ± 6x10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	0.36 ± 6x10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	0.29 ± 1.0x10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>b</sup>

La misma letra dentro de un grupo indica que no existe diferencias significativas ( $\alpha = 95 \%$ ).

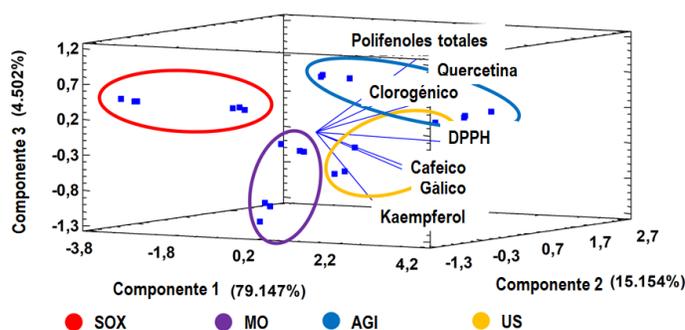
### Concentración de polifenoles

El orden ascendente del índice de polifenoles totales de los extractos fue SOX < MO < US < AGI ( $p = 0.002$ ), y del índice de capacidad antioxidante fue MO < SOX = US < AGI ( $p = 0.0004$ ). En ambos casos, los extractos obtenidos con agitación mostraron los valores más altos. Para el caso de la recuperación de sólidos, no se observaron diferencias significativas.

Los métodos AGI y US no mostraron diferencias significativas en la concentración individual de polifenoles, siendo US 92 % más rápido (5 min vs 60 min) debido a los fenómenos de cavitación. En cuanto a MO, fue 66 % más rápido que AGI, sin embargo, las concentraciones de los polifenoles disminuyeron un 30 %.

### Evaluación por PCA

El efecto de los diferentes métodos sobre la extracción de polifenoles se estudió utilizando un PCA con 3 componentes a partir de los resultados de las tablas 4 y 5 (figura 4), exceptuando el porcentaje de sólidos.



**Figura 3.** Gráfico de componentes principales para la comparación del efecto de los métodos de extracción en la determinación de polifenoles en subproductos del jitomate

La variabilidad acumulada del modelo fue de 95.80 %. Los extractos de SOX y MO se separaron a lo largo del componente 1, mientras que los extractos de AGI y US mostraron una superposición. Las puntuaciones de los métodos AGI y US se acercan a los índices de capacidad antioxidante y a todos los polifenoles analizados, lo que significa que se producen cambios significativos en la composición fenólica de los extractos cuando se utilizan esos métodos.

En cuanto a las cargas, el índice de polifenoles totales se dirigió al mismo lado que todos los polifenoles, junto con el componente 1, indicando una buena correlación entre este índice y la concentración de los polifenoles. Además, es posible concluir que los métodos AGI y US mejoran tanto los índices antioxidantes como la concentración individual de polifenoles. Sin embargo, el índice de capacidad antioxidante se distribuye a lo largo del componente 2, opuesto a la concentración de la mayoría de los polifenoles, indicando una posible falta de correlación entre los datos.

#### 4. Conclusiones

Los resultados demostraron que los diferentes métodos de extracción influyen en la composición fenólica de los extractos de subproductos del jitomate. Los extractos obtenidos con AGI mostraron los valores más altos de los índices de polifenoles totales y capacidad antioxidante, utilizando un mínimo de material de laboratorio.

Sin embargo, el PCA demostró que la concentración individual de polifenoles de dichos extractos era similar a aquellos obtenidos en los extractos del método US, siendo éste 90 % más rápido.

Por otro lado, el método MO redujo 66 % el tiempo de extracción en comparación con el método por agitación, pero las concentraciones de todos los polifenoles e índices antioxidantes disminuyeron 30 %, atribuido a que este tipo de energía favorece la oxidación de los polifenoles, formando radicales. En el caso de los extractos obtenidos por SOX, se notó un incremento significativo en la capacidad antioxidante de los extractos por la presencia de otros antioxidantes no polifenólicos.

Los métodos AGI, US y MO tuvieron los mejores resultados, siendo fácil implementarlos para la obtención de extractos ricos con polifenoles antioxidantes como estrategias de aprovechamiento de la piel y las semillas del jitomate, pero el método elegido depende del objetivo de cada investigación.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a Dirección General de Apoyo al Personal Académico (Grant No. PAPIIT IT200718 and IN211521) y a la Facultad de Química – UNAM (Grant No. 5000-9029) por los apoyos financieros. JMLT agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca nacional para doctorado (CVU 957048). Las tablas y figuras adjuntas en este trabajo se adaptaron con permiso de López-Téllez, J.M., del Pilar Cañizares-Macías, M. Evaluation of Tomato (*Lycopersicon esculentum* P. Mill.) By-product Extracts Obtained by Different Extraction Methods as Exploitation Strategy of High-Value Polyphenols, Food Bioprocess Technol, 2024, <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03293-w>.

## 6. Referencias

- [1] <https://www.europarl.europa.eu/topics/es/article/20151201STO05603/economia-circular-definicion-importancia-y-beneficios> Consultada el 05 de septiembre de 2024.
- [2] <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> Consultada el 05 de septiembre de 2024.
- [3] Kemper, K., Hickey, V., Ahuja, P. S., & Kneller, C. Mexico: Conceptual framework for a national strategy on food loss and waste (2019).
- [4] Kiralan, M., & Ketenoglu, O. Utilization of Tomato (*Solanum lycopersicum*) by-Products: An Overview. In M. F. Ramadan & M. A. Farag (Eds.), *Mediterranean Fruits Bio-wastes: Chemistry, Functionality and Technological Applications*, pp. 799–818 (2022).
- [5] López-Yerena, A., Domínguez-López, I., Abuhabib, M. M., Lamuela-Raventós, R. M., Vallverdú-Queralt, A., & Pérez, M. Tomato wastes and by-products: upcoming sources of polyphenols and carotenoids for food, nutraceutical, and pharma applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–18 (2023).
- [6] Miller, J. N., & Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 4th ed. Prentice Hall (2000).
- [7] AOAC. *Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals* (2019).

## Estudio de las propiedades químico-analíticas del cacao

Luis Ángel Moreno García<sup>a</sup>, Eugenio Octavio Reyes Salas<sup>a\*</sup>, Ulrich Briones Guerash<sup>a</sup>,  
Edgar Islas Ortíz<sup>a</sup>, Gerardo Reyes García<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Departamento de Química Analítica. Ciudad Universitaria. Alcaldía Coyoacán. 04510 Ciudad de México. México +525554210938 E-mail: [octavio\\_reyessalas@yahoo.de](mailto:octavio_reyessalas@yahoo.de) , [luisangelmorenog96@gmail.com](mailto:luisangelmorenog96@gmail.com)

### Resumen

En este proyecto, se determinaron parámetros fisicoquímicos de semillas del cacao sin tostar, con el fin de relacionarlos con la calidad del cacao. Se determinaron: porcentaje de humedad, contenido de azúcares reductores, capacidad antioxidante, porcentaje total de manteca de cacao, porcentaje de ácido oleico en la manteca y el contenido de teobromina y cafeína. Se utilizaron técnicas electroquímicas y potenciométricas para determinar algunos de estos parámetros y aprovechar las propiedades redox de los analitos de interés como los azúcares, los antioxidantes, cafeína y teobromina, además de que estos métodos analíticos cuentan con alta precisión, son trazables y son más económicos respecto a otros como la cromatografía de líquidos (HPLC) y la de gases (CG).

**Palabras clave.** *Cacao, Cuantificación, Potenciometría, Voltamperometría, Polarografía*

### Abstract

In this project, physicochemical parameters of unroasted cocoa beans were determined to relate them to the quality of the cocoa, which are the following: moisture percentage, sugar content, antioxidant capacity, total percentage of cocoa butter, percentage of oleic acid in the butter and the determination of theobromine and caffeine content. This project had the purpose of using electrochemical and potentiometric techniques to determine some of these parameters and take advantage of the redox properties of the analytes of interest such as sugars, antioxidants, caffeine and theobromine. In addition, these analytical methods have high precision, are traceable and are more economical than others such as HPLC and GC.

**Keywords.** *Cocoa, Quantification, Potentiometry, Voltammetry, Polarography*

## 1. Introducción

El cacao es un producto con alto valor comercial en la industria alimentaria, debido a que es un importante componente en diversos alimentos populares como dulces, postres y bebidas, por lo que es importante su estudio a lo largo de la cadena de producción.

Las semillas de cacao contienen teobromina y cafeína, que son alcaloides con efectos neuro estimulantes, por lo cual es importante identificarlos y cuantificarlos, además de que contienen compuestos de importancia nutricional como los antioxidantes, lípidos y azúcares. Es importante resaltar que el contenido de estos componentes afecta los aspectos sensoriales del cacao (por ejemplo, un mayor contenido de teobromina dará una mayor sensación de amargor). Sin embargo, en la actualidad el análisis sensorial no se relaciona con la composición del cacao y las determinaciones de los componentes principales tampoco se asocian con la calidad sino solamente con las normas sobre contenidos mínimos o máximos de estos componentes.

Así pues, un concepto más global de la calidad del cacao ha de buscar relacionar el contenido de los diferentes compuestos de la semilla de cacao con las propiedades sensoriales propias de este producto [1,2].

En el presente trabajo, se determinó el contenido de los principales componentes del cacao por distintos métodos analíticos, de cinco muestras de semillas de cacao sin tostar, provenientes de Tabasco, Oaxaca y Quintana Roo.

Cada una de las muestras de grano se molió para después realizar la extracción Soxhlet y el desengrasado para determinar los parámetros de la siguiente manera: primero se determinó el porcentaje de humedad y la cantidad de manteca en la semilla de cacao por métodos gravimétricos [2]; después, la determinación de azúcares reductores, sacarosa y el porcentaje de ácido oleico en la manteca se realizaron por titulación volumétrica por monitoreo potenciométrico [2,3,4,5]. La cuantificación de antioxidantes se realizó por voltamperometría de barrido lineal; la capacidad antioxidante se expresa comúnmente como equivalentes de Ácido Ascórbico (EAA) por gramo de semilla seca de cacao (mg de ácido ascórbico/g de semilla seca de cacao); también se suele expresar como equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de semilla seca de cacao (mg de ácido gálico/g de semilla seca de cacao) [6,7]. Finalmente, para la determinación simultánea de cafeína y teobromina en el cacao se utilizó la técnica de polarografía diferencial de impulsos en medio de buffer de boratos, con el fin de aportar una metodología complementaria para la determinación de estos parámetros y aprovechar las propiedades redox de los analitos del cacao.

## 2. Experimental

Las muestras son provenientes de México y todas son de la variedad del cacao criollo. El procedimiento experimental se llevó a cabo en condiciones ambientales de Ciudad Universitaria, CDMX. El equipo utilizado fue el Polarógrafo Metrohm Computrace 797 (con una resolución de 0.1 nA) para las determinaciones de cafeína y teobromina utilizando la técnica de polarografía diferencial de impulsos, Polarógrafo Voltalab MDE150 acoplado a un potencióstato Radiometer Analítico POL150 TraceLab acoplado a un electrodo de disco de platino marca Radiometer/Copenhagen EDI101 (con una resolución de 0.0001  $\mu$ A en esta técnica) para la

determinación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica de voltamperometría lineal, Potenciómetro Metrohm 827 pH lab (Resolución de 0.01) para medir el pH en la determinación del % de ácido oleico en las mantecas extraídas y el multímetro Steren MUL40 (Resolución de 0.1 mV) para medir el potencial de celda durante el seguimiento de la titulación volumétrica en la determinación de azúcares por el método de Fehling.

### *2.1. Determinación de humedad*

Las semillas de cacao sin tostar se descascarillaron, se molieron en un molino eléctrico para café y se pesó el polvo de cacao molido. La semilla de cacao molido se almacena en un frasco para posteriores análisis. A la temperatura de 107.0 °C, las muestras de cacao molidas se secaron durante 3 horas en un horno, posteriormente, se llevaron al vacío durante al menos una hora y finalmente se pesaron de nuevo.

### *2.2. Desengrasado de la muestra*

Se pesaron 10 g de cacao molido y se dejó a reflujo por 1 hora con 50 mL de cloroformo, con el fin de extraer la grasa de la muestra. Después del reflujo, se secó la muestra al vacío durante 1 hora con una trampa para atrapar el cloroformo y se pesó la manteca de cacao obtenida. Este paso se repitió de igual manera para todas las muestras de semilla de cacao molidas que se analizaron.

### *2.3. Extracción Soxhlet*

Para realizar las determinaciones de azúcares y capacidad antioxidante, se pesó 6.4068 g de cacao molido y se sometió a una extracción por Soxhlet con 100 mL de agua desionizada, con el polvo de cacao contenido en un cartucho de tela de algodón envuelto en un filtro de papel de cafetera. La extracción se realizó hasta completar 12 ciclos, después el extracto se dejó enfriar y se centrifugó por 20 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se separó del sedimento y se llevó al aforo a 100.0 mL con agua desionizada (extracto 1). De esta disolución, se separaron 50.0 mL para la determinación de azúcares reductores y de antioxidantes.

### *2.4. Determinación de azúcares reductores*

La determinación se realizó con el método de Fehling modificado para análisis potenciométrico [3, 5]. Se montó una celda, utilizando un electrodo de referencia ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ) y uno indicador (Cu); se agregaron 2.0 mL de disolución Fehling A ( $0.22 \text{ mol L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ ) y 2.0 mL de disolución Fehling B ( $1.2 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH y  $2 \text{ mol L}^{-1}$  de tartrato de sodio y potasio). Después de calentar a temperatura de ebullición, se agregó 5.0 mL del extracto de la muestra; el cobre en exceso que no reaccionó se tituló en la celda con glucosa estandarizada  $0.0123 \text{ mol L}^{-1}$  y se monitoreó con un multímetro.

### *2.5. Determinación de sacarosa invertida*

Se tomó 5.0 mL del extracto de muestra, se le agregaron 3 gotas de HCl concentrado y se dejó en reposo toda la noche para hidrolizar la sacarosa. Se repitió el mismo procedimiento que en la determinación de azúcares reductores con la reacción de Fehling, pero ahora agregando este extracto hidrolizado en la celda con 2.0 mL de Fehling A y 2.0 mL de Fehling B. [5,6,7]

### 2.6. Determinación de antioxidantes

Se utilizaron técnicas voltamperométricas con una celda electroquímica con tres electrodos: electrodo de referencia (ER) de  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ , un electrodo auxiliar (EA) de alambre de platino (Pt) y uno de trabajo (ET) de disco de Pt, se agregaron 10.0 mL de electrolito soporte ( $\text{KNO}_3$   $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) y  $400 \mu\text{L}$  de  $\text{I}_3^-$   $8.24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  disuelto en agua con exceso de yoduros [6,7], se trazaron los voltamperogramas con un potenciostato Voltalab MDE150 acoplado a un potenciostato Radiometer Analítico POL150 TraceLab con el electrodo de disco de platino y las siguientes condiciones: potencial de inicio: 0.2 V, potencial final: 0.6 V, tiempo de pulso: 0.25 s, velocidad de barrido: 2 mV/s. Posteriormente se hicieron adiciones de muestra de extracto Soxhlet del cacao y se realizó el respectivo voltamperograma para cada adición en las mismas condiciones de trabajo, esto con el fin de realizar una titulación amperométrica.

### 2.7. Porcentaje de manteca de cacao

Se pesaron 10 g de cacao molido descascarillado y se dejó a reflujo por 1 hora con 50 mL de cloroformo, para extraer la grasa de la muestra. Terminado el reflujo, se secó la muestra al vacío durante 1 hora con una trampa para recuperar el cloroformo y se pesó la manteca de cacao obtenida [2].

### 2.8. Determinación del % de ácido oleico de la manteca de cacao

Se pesó 1 g de manteca de cacao, que se disolvió en 20 mL de etanol al 96%, a 55 °C, agregando gotas de hexano, en agitación constante, hasta que la mezcla fue homogénea. Posteriormente se agregó 1 gota de fenoltaleína al 1% en la disolución y se tituló volumétricamente con una micropipeta con adiciones de  $50 \mu\text{L}$  de  $\text{KOH}$  etanólico  $0.2383 \pm 0.0006 \text{ mol L}^{-1}$ ; el seguimiento de la valoración se realizó midiendo el pH con un potenciómetro y un electrodo combinado de vidrio (referencia:  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ). El índice de acidez se calculó con el volumen gastado al punto de equivalencia.

### 2.9. Estudio electroquímico de la cafeína y teobromina por polarografía diferencial de impulsos

En una celda electroquímica con electrodo de referencia (ER) de  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ , electrodo auxiliar (EA) de Pt y electrodo de trabajo (ET) de gota de mercurio (EGM), se agregaron 25.0 mL de electrolito soporte ( $\text{B(OH)}_3/\text{B(OH)}_4^-$   $\text{C}=0.15 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}=9$ ) y por polarografía diferencial de impulsos con las siguientes condiciones: potencial de inicio: 0.1 V, potencial final: -0.4 V, amplitud de pulso: -0.05 V, tiempo de pulso: 1 s, velocidad de barrido:  $5 \text{ mV s}^{-1}$ ; para obtener la curva patrón, se realizaron adiciones de  $75 \mu\text{L}$  de una disolución de cafeína  $9.99 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , hasta un total de 8 adiciones.

En las mismas condiciones experimentales de celda para el análisis de cafeína, se realizaron adiciones de  $100 \mu\text{L}$  de una disolución de teobromina  $1.39 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , hasta un total de 8 adiciones, para obtener la curva de calibración.

### 2.10. Determinación de cafeína y teobromina en muestras de semillas de cacao

Se pesaron 50 g de semilla de cacao molido dentro de una camisilla de tela, envuelta con papel filtro, se sometió a extracción por Soxhlet con 100 mL de agua desionizada, a ebullición hasta completar 12 ciclos, para posteriormente centrifugarlo a 3000 rpm durante 20 min. 50 mL del extracto se sometieron a extracción con 10 mL de cloroformo, agregando aproximadamente 0.1 g de  $\text{KNO}_3$ , reservando 500  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa y agregando 500  $\mu\text{L}$  de agua desionizada.

El paso anterior, se repitió otras 3 veces sobre la misma fase acuosa.

La fase orgánica se destiló a 80 °C, hasta que se evaporó casi en su totalidad el cloroformo, después, el sólido resultante de la destilación se transfirió a un sublimador. El sólido se sublimó con el sublimador sumergido en arena con una temperatura de 325 °C en la parrilla de calentamiento, donde el sólido adherido al dedo frío (cafeína) se recolectó en un vaso de precipitados (la cafeína sublima a 174 °C).

El paso anterior se repitió dos veces más, y después se pesó el sólido obtenido en total.

Las alícuotas reservadas de las extracciones se analizaron por polarografía diferencial de impulsos en  $\text{B(OH)}_3/\text{B(OH)}_4^-$   $\text{C}=0.15 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}=9$ , con las siguientes condiciones: potencial de inicio: 0.1 V, potencial final: -0.35 V, amplitud de pulso: -0.05 V, tiempo de pulso: 1 s, velocidad de barrido: 5  $\text{mV s}^{-1}$ ; el contenido del alcaloide se determinó por el método de adiciones estándar con adiciones de 75  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón del alcaloide ( $9.99 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en el caso de cafeína y  $1.39 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de teobromina).

## 3. Resultados y Discusión

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones, salvo las de cafeína y teobromina.

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos determinados para las muestras de semilla de cacao sin tostar

	%Humedad	% Azúcares reductores	% Sacarosa	
<b>Muestra 1</b>	4.01±0.21%	2.82±0.29%	0.423±0.045 %	
<b>Muestra 2</b>	3.32±0.12%	2.18±0.22%	<LD	
<b>Muestra 3</b>	4.07±0.20%	1.42±0.14%	0.660±0.067%	
<b>Muestra 4</b>	3.63±0.19%	2.27±0.23%	0.009±0.001%	
<b>Muestra 5</b>	3.31±0.17%	2.33±0.24%	0.35±0.036%	
	EAA (mg AA /g cacao)	EAG(mg AG /g cacao)	% Manteca	% Ácido oleico
<b>Muestra 1</b>	4.76±0.36	1.53±0.12	47.81±0.96	0.781±0.012
<b>Muestra 2</b>	2.56±0.17	0.82±0.05	49.66±0.99	0.703±0.011
<b>Muestra 3</b>	2.44±0.17	0.79±0.06	46.83±0.94	0.629±0.001
<b>Muestra 4</b>	3.88±0.46	1.25±0.15	47.47±0.95	1.058±0.016
<b>Muestra 5</b>	4.00±0.39	1.29±0.13	50.10±1.00	0.750±0.003

### 3.1 Porcentaje de humedad

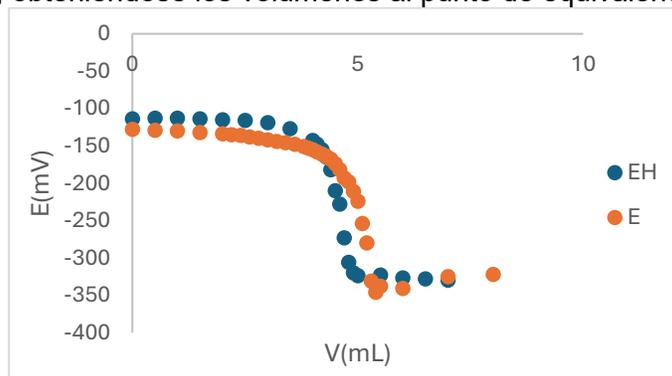
Todas las muestras analizadas se encuentran dentro del límite máximo permitido por la norma [2], que tiene un máximo del 7.5 % de humedad; es importante conocer el contenido de agua en la semilla para evitar el posible crecimiento de microorganismos como hongos o bacterias que afecten la integridad de la semilla mientras se encuentra en almacenamiento, que debe ser lejos de la luz solar y que esté sellada la bolsa donde se encuentre resguardada.

El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{m_{\text{muestra húmeda}} - m_{\text{muestra seca}}}{m_{\text{muestra húmeda}}} \times 100\% = \frac{m_{\text{agua}}}{m_{\text{muestra húmeda}}} \times 100\% \quad (2)$$

### 3.2. Porcentaje de azúcares

La determinación por reacción de Fehling es un método probado que ya se utiliza regularmente en el laboratorio, en este caso fue una titulación volumétrica con glucosa (GL) sobre una celda en condiciones de Fehling con excedentes de Cu(II) [7] después de la reacción con la muestra de extracto de cacao, obteniéndose los volúmenes al punto de equivalencia de la tabla 2.



**Figura 1.** Curva de titulación por retroceso de la muestra 3 utilizando el método de Fehling. E: extracto de cacao y EH: extracto de cacao hidrolizado.

**Tabla 2.** Volúmenes al punto de equivalencia calculados utilizando el método de Gran de las muestras de cacao analizadas y las respectivas muestras hidrolizadas.

Muestras	V <sub>PE</sub> (mL)
Muestra 1	3.519
Muestra 2	4.424
Muestra 3	5.278
Muestra 4	4.203
Muestra 5	4.167
Muestra 1 H	3.202
Muestra 2 H	4.474
Muestra 3 H	4.808
Muestra 4 H	4.196
Muestra 5 H	3.959

El contenido de azúcares reductores y sacarosa se determinó de la siguiente manera, como ejemplo utilizando los volúmenes de titulación de la muestra 3:

Azúcares reductores:

$$2.0 \text{ mL} \left( \frac{0.2289 \text{ mol Cu}^{2+}}{1000 \text{ mL}} \right) = 4.568 \times 10^{-4} \text{ mol Cu}^{2+} \quad (3)$$

$$4.568 \times 10^{-4} \text{ mol Cu}^{2+} \left( \frac{1 \text{ mol GL}}{5 \text{ mol Cu}^{2+}} \right) = 9.156 \times 10^{-5} \text{ mol GL reaccionante total} \quad (4)$$

$$5.278 \text{ mL} \left( \frac{0.01259 \text{ mol GL}}{1000 \text{ mL}} \right) = 6.645 \times 10^{-5} \text{ mol GL exceso} \quad (5)$$

$$9.156 \times 10^{-5} \text{ mol GL reaccionante total} - 6.645 \times 10^{-5} \text{ mol GL exceso} = 2.511 \times 10^{-5} \text{ mol GL en extracto} \quad (6)$$

$$2.511 \times 10^{-5} \text{ mol GL} \left( \frac{180.156 \text{ g AzRed}}{1 \text{ mol GL}} \right) \left( \frac{100 \text{ mL extracto}}{5 \text{ mL celda extracto}} \right) = 0.09047 \text{ g AzRed} \quad (7)$$

$$\left( \frac{0.09047 \text{ g AzRed}}{6.1964 \text{ g muestra}} \right) \times 100\% = 1.46\% \text{ Azúcares reductores} \quad (8)$$

Sacarosa:

$$4.808 \text{ mL} \left( \frac{0.01259 \text{ mol GL}}{1000 \text{ mL}} \right) = 6.053 \times 10^{-5} \text{ mol GL exceso} \quad (9)$$

$$9.156 \times 10^{-5} \text{ mol GL reaccionante total} - 6.053 \times 10^{-5} \text{ mol GL exceso} = 3.103 \times 10^{-5} \text{ mol GL en extracto hidrolizado} \quad (10)$$

$$3.103 \times 10^{-5} \text{ mol GL en extracto hidrolizado} - 2.416 \times 10^{-5} \text{ mol GL en extracto} = 6.870 \times 10^{-6} \text{ mol GL por sacarosa} \quad (11)$$

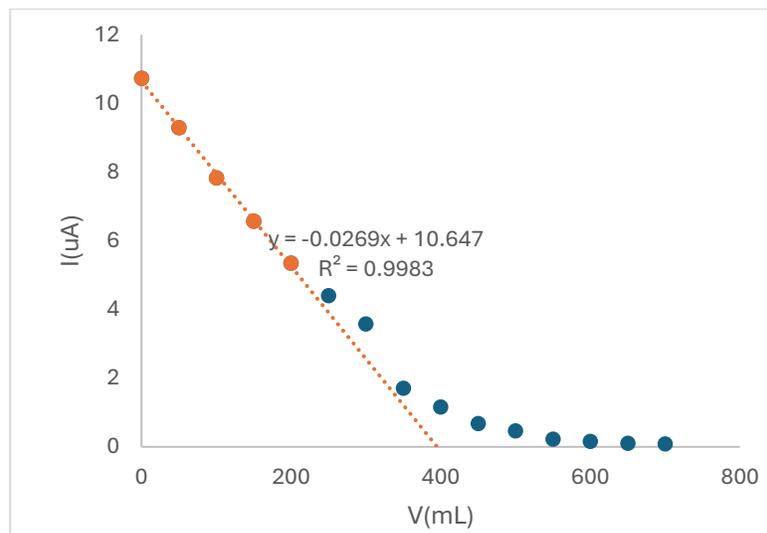
$$6.870 \times 10^{-6} \text{ mol GL} \left( \frac{1 \text{ mol sacarosa}}{1 \text{ mol GL}} \right) \left( \frac{342.296 \text{ g sacarosa}}{1 \text{ mol sacarosa}} \right) \left( \frac{100 \text{ mL}}{5 \text{ mL extracto}} \right) = 0.04703 \text{ g sacarosa en la semilla de cacao molida} \quad (12)$$

$$\left(\frac{0.04703 \text{ g sacarosa}}{6.1964 \text{ g muestra}}\right) \times 100\% \approx 0.76 \% \text{ sacarosa} \quad (13)$$

Hay fuentes que citan el perfil de contenido total de azúcares en semillas de cacao sin tostar, donde estiman hasta un 4-5% del total de la masa de la semilla [4], por lo que las muestras analizadas presentan una baja cantidad de azúcares totales; sin embargo, no hay una norma que guíe un límite máximo o mínimo que concluya si presenta una baja cantidad de azúcares. Las muestras con el mayor contenido de azúcares reductores son la 1, la 5 y la 4.

### 3.3 Capacidad antioxidante

El cálculo de antioxidantes en los extractos se desarrolla primero, con la intersección entre la recta generada por los primeros puntos de adición que son representativos de la reacción redox:



**Figura 2.** Curva amperométrica del extracto de la muestra 2, de  $I_3^-$  valorado con extracto de semillas de cacao de la muestra 2.

Con la recta generada por los primeros puntos del amperograma de la figura 2, se determina el volumen al punto de equivalencia con la intersección de la recta con el eje x, cuando la corriente es cero; como ejemplo se realiza el cálculo de la capacidad antioxidante de la muestra 2:

$$0 = y = -0.0269x + 10.647 \quad (14)$$

$$v_{p.eq}(\mu L) = x = \frac{10.647}{-0.0269} = 395.8 \mu L \quad (15)$$

$$400 \text{ uL} \left( \frac{8.24 \times 10^{-3} \text{ mol } I_3^-}{10^6 \text{ uL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol Ac. Asc.}}{1 \text{ mol } I_3^-} \right) \left( \frac{100 \text{ mL} \left( \frac{1000 \text{ uL}}{1 \text{ mL}} \right) \text{ extracto}}{395.8 \text{ uL al p. equiv}} \right) = 8.99 \times 10^{-5} \text{ mol Ac. Asc. en el extracto} \quad (16)$$

$$8.99 \times 10^{-5} \text{ mol Ac. Asc. en el extracto} \left( \frac{176.12 \text{ g Ac. Asc.}}{1 \text{ mol Ac. Asc.}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) =$$

$$15.83 \text{ mg de Ac Asc en la muestra de cacao} \quad (17)$$

$$400 \text{ uL} \left( \frac{8.24 \times 10^{-3} \text{ mol } I_3^-}{10^6 \text{ uL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol Ac. Gal.}}{3 \text{ mol } I_3^-} \right) \left( \frac{100 \text{ mL} \left( \frac{1000 \text{ uL}}{1 \text{ mL}} \right) \text{ extracto}}{395.8 \text{ uL al p. equiv}} \right) =$$

$$2.997 \times 10^{-5} \text{ mol Ac. Gal. en el extracto} \quad (18)$$

$$2.997 \times 10^{-5} \text{ mol Ac. Gal. en el extracto} \left( \frac{170.12 \text{ g Ac. Gal.}}{1 \text{ mol Ac. Gal.}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) =$$

$$5.09 \text{ mg de Ac. Gal. en la muestra de cacao} \quad (19)$$

El % humedad de la muestra 2 de semilla de cacao es del 4.069%, según los resultados obtenidos en este proyecto de porcentaje de humedad, por lo que se referirá a la masa seca como masa de semilla seca:

$$6.1964 \text{ g semilla} - 6.194 \text{ g semilla} \left( \frac{3.319 \text{ g agua}}{100 \text{ g muestra}} \right) = 6.0018 \text{ g semilla seca} \quad (20)$$

$$EAA = \frac{15.83 \text{ mg de Ac. Asc.}}{6.0018 \text{ g semilla seca}} = \frac{2.56 \text{ mg Ac. Asc.}}{1 \text{ g semilla seca}} \quad (21)$$

$$EAG = \frac{5.09 \text{ mg de Ac. Gal.}}{6.0018 \text{ g semilla seca}} = \frac{0.82 \text{ mg Ac. Asc.}}{1 \text{ g semilla seca}} \quad (22)$$

De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras 1, 5 y 4 presentan una mayor cantidad de antioxidantes, siendo éste un criterio de mayor importancia en la calidad del cacao dados sus beneficios en su consumo. Otro factor en la determinación de la capacidad antioxidante en las muestras es la extracción de antioxidantes, dado que es posible que el mismo proceso de extracción pueda promover su degradación; en este caso, la extracción fue realizada por el método de extracción Soxhlet [6, 7], que se realiza a temperatura de ebullición del agua, por lo que es posible que se degrade una parte de los antioxidantes que se extraen.

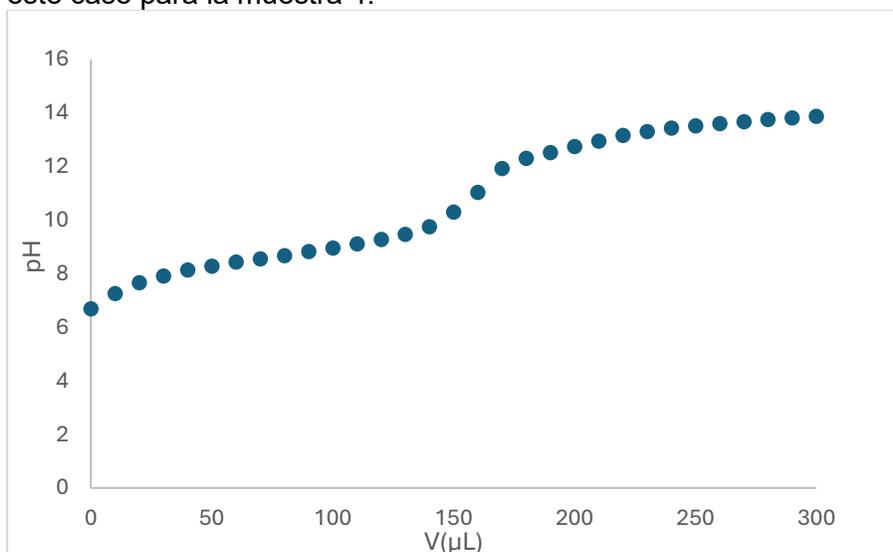
### 3.4 Porcentaje de manteca de cacao y de ácido oleico en la manteca

Las muestras de cacao presentan porcentajes entre el 46 y 50 % del total de la semilla de cacao, aunque destacan las muestras 5, 2 y 1; estos porcentajes son similares al del cacao de otras regiones del mundo, por ejemplo, África Occidental y Sudamérica, correspondiente a la especie de cacao criollo, que es la que se cosecha en México; sin embargo, se presentan variaciones mínimas entre los porcentajes determinados.

El porcentaje de manteca se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ manteca} = \frac{m_{\text{manteca extraída}}}{m_{\text{cacao molido}}} \times 100\% \quad (23)$$

El porcentaje de ácido oleico se determina por monitoreo de pH con curvas de titulación como la siguiente, en este caso para la muestra 4:



**Figura 3.** Titulación potenciométrica de la manteca de cacao de la muestra 4 disuelta en etanol-hexano utilizando KOH etanólico.

**Tabla 3.** Volúmenes al punto de equivalencia de las titulaciones potenciométricas ácido-base, calculados por el método de Gran.

	V <sub>PE</sub> (µL)
<b>Muestra 1</b>	116.16
<b>Muestra 2</b>	99.11
<b>Muestra 3</b>	91.98
<b>Muestra 4</b>	158.70
<b>Muestra 5</b>	111.64

$$\% \text{ Ác. oléico} = \frac{\left(\frac{0.2383 \text{ mol KOH}}{L}\right)(158.704 \mu\text{L})\left(\frac{1 L}{10^6 \mu\text{L}}\right)\left(\frac{1 \text{ mol Ac.Oléico}}{1 \text{ mol KOH}}\right)\left(\frac{282.46 \text{ g Ac.Oléico}}{1 \text{ mol Ac.Oléico}}\right)}{1.0098 \text{ g manteca}} \times 100\% =$$

$$1.058 \% \text{ de Ác. Oléico en la manteca de cacao} \quad (24)$$

Como se observa en los resultados de la tabla 1, todas las mantecas extraídas de las muestras analizadas contienen menos del 1.75% de ácido oleico [8], siendo un indicador de buena calidad, pues las determinaciones de acidez en la manteca se hicieron justo después de ser extraída para evitar que la manteca esté expuesta a la luz y al aire y que la acidez no aumente en la manteca de cacao por el mayor tiempo de almacenaje.

### 3.5. Estudios de cafeína y teobromina

#### 3.5.1. Extracción de cafeína y teobromina en cloroformo

Para determinar tanto la cafeína como la teobromina, se procedió a extraerlas con cloroformo y separarlas después por sublimación, ya que la cafeína sublima a 174 °C a presión atmosférica. En este trabajo se emplearon tanto una muestra de cafeína pura, como la cafeína mezclada con teobromina, para confirmar la posibilidad de emplear la sublimación como determinación de cafeína en una muestra natural de cacao después de la extracción con cloroformo. Los siguientes resultados son para la recuperación de cafeína por extracción orgánica, a partir de una muestra de cafeína estándar (CF) 0.1089 g/50 mL en agua y de una muestra sintética de cafeína con teobromina (MS) (0.1033 g cafeína + 0.0183 g teobromina) /50 mL en solución acuosa).

**Tabla 4.** Recuperación de cafeína por sublimación después de cuatro extracciones sucesivas orgánicas con cloroformo en dos soluciones acuosas: en una de cafeína en solución acuosa (CF) y en una mezcla sintética de cafeína con teobromina (MS).

	CF	MS
<b>Masa inicial de cafeína(g)</b>	0.1089	0.1033
<b>Masa recuperada de cafeína (g)</b>	0.1011	0.0899
<b>% recuperación de cafeína</b>	92.34%	87.02%

De acuerdo con la tabla anterior, los porcentajes de recuperación de la cafeína son favorables, siendo un indicador real de la concentración de la masa de cafeína en fase acuosa y que se extrae de forma efectiva con cloroformo, para ser recuperada de manera cuantitativa por sublimación, para posteriormente ser aplicados en las muestras de cacao.

#### 3.5.2. Determinación electroquímica de cafeína y teobromina en agua

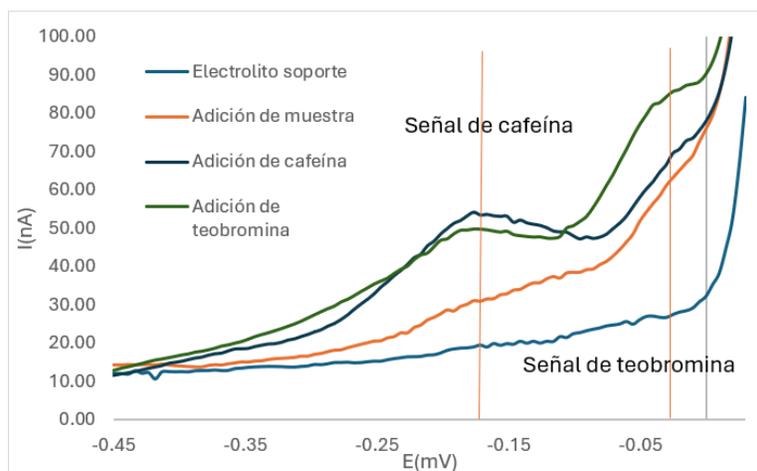
La cafeína y la teobromina se analizaron con la técnica de polarografía diferencial de impulsos con varios electrolitos soporte en medio acuoso; sin embargo las señales no se resuelven. En cambio, en el medio de boratos  $\text{B(OH)}_3/\text{B(OH)}_4^-$   $\text{C}=0.16 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}=9$  las señales de ambas sustancias sí se resuelven y se encuentran lo suficientemente separadas para cuantificarlas simultáneamente.

En medio de buffer de boratos ambas sustancias presentan señales lo suficientemente separadas como para poder determinarlas de manera simultánea. Ambos alcaloides presentan límites de detección muy bajos, menores a 0.5 ppm; para la cafeína es de 293 ppb y para la teobromina de 479 ppb; estos límites de detección y de cuantificación son suficientemente pequeños para asegurar la cuantificación de cafeína y de teobromina en diferentes muestras reales; en la literatura se menciona que en cacao el contenido de teobromina oscila generalmente entre un 1.5-3% [9] y para la cafeína es menor al 1% [10]. Este método electroquímico es relativamente sencillo y permite la determinación simultánea de cafeína y teobromina en los extractos de los granos del cacao sin tostar.

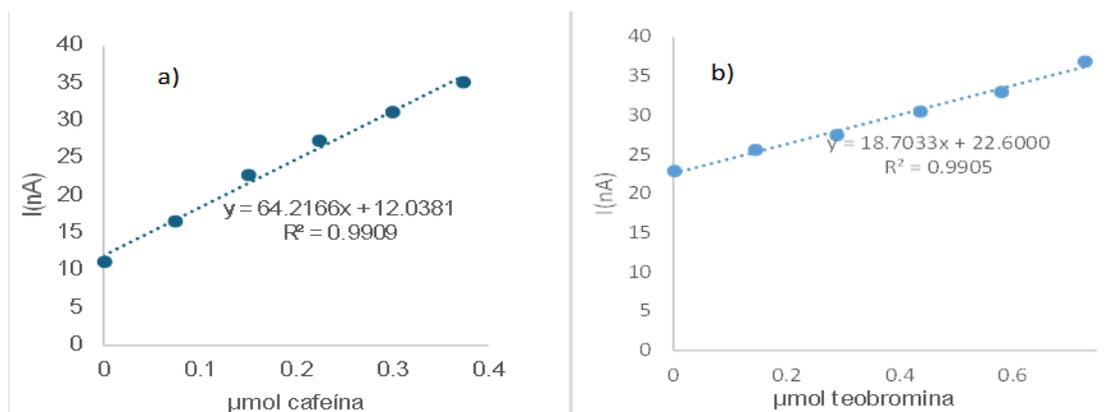
**Tabla 5.** Límites de detección y cuantificación de cafeína y teobromina en  $B(OH)_3/B(OH)_4^-$   $C=0.16 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=9$ .

	<b>Cafeína</b>	<b>Teobromina</b>
<b>Electrolito</b>	$B(OH)_3/B(OH)_4^-$ $C=0.16 \text{ mol L}^{-1}$ $pH=9$	$B(OH)_3/B(OH)_4^-$ $C=0.16 \text{ mol L}^{-1}$ $pH=9$
<b>Límite detección (LD) (ppm)</b>	0.2928	0.4793
<b>Límite cuantificación (LQ) (ppm)</b>	1.5309	2.2921

### 3.6 Determinación simultánea de cafeína y teobromina en el cacao



**Figura 4.** (a) Polarograma diferencial de impulsos del extracto de cacao de la muestra 4 en  $B(OH)_3/B(OH)_4^-$   $C=0.16 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=9$  con adiciones de estándar de cafeína ( $0.375 \mu\text{mol}$ ) y de teobromina ( $0.727 \mu\text{mol}$ ). Programa empleado: (a) potencial de inicio: 0.2 V, potencial final: -0.6 V, amplitud de pulso: -0.05 V, tiempo de pulso: 1 s, velocidad de barrido:  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 5.** Curva de adiciones estándar sobre extracto de cacao de la muestra 4 de cafeína (a) y teobromina (b) con las señales de corriente máxima de cafeína y teobromina.

**Tabla 6.** Porcentajes de teobromina y cafeína obtenidos para las muestras de semilla de cacao analizadas.

	% Teobromina	% Cafeína
<b>Muestra 1</b>	1.92±0.046	0.55±0.035
<b>Muestra 2</b>	2.72±0.043	0.37±0.017
<b>Muestra 3</b>	1.57±0.019	0.47±0.028
<b>Muestra 4</b>	2.18±0.054	0.36±0.032
<b>Muestra 5</b>	4.53±0.109	0.50±0.014

El porcentaje de cafeína y teobromina se calculó de la siguiente manera a partir de las ecuaciones de las rectas de adiciones patrón de la figura 4, correspondientes al análisis del extracto de la muestra 4; cuando la corriente es cero, se interpreta como la ausencia de analito, por lo que se hace el tratamiento matemático debido:

$$0 = 64.2166 \mu\text{mol}_{caf\ agr} + 12.0381 \quad (25)$$

$$\mu\text{mol}_{caf\ agr} = \left| \frac{12.0381}{64.2166} \right| = 0.1875 \mu\text{mol\ cafeína} \quad (26)$$

$$0.1875 \mu\text{mol\ cafeína} \left( \frac{0.1\ L}{20\ \mu\text{L} \left( \frac{10^{-6}\ L}{1\ \mu\text{L}} \right)} \right) = 937.30 \mu\text{mol\ cafeína en el extracto} \quad (27)$$

$$937.30 \mu\text{mol}_{caf} \left( \frac{1\ \text{mol}}{10^6\ \mu\text{mol}} \right) \left( \frac{194.19\ \text{g}_{caf}}{1\ \text{mol}} \right) = 0.1820\ \text{g\ cafeína en el extracto} \quad (28)$$

$$\frac{0.1820\ \text{g\ cafeína en el extracto}}{48.8810\ \text{g\ semilla de cacao}} \times 100\% = 0.3649\ \% \text{ cafeína en la semilla de cacao} \quad (29)$$

Ahora, se calcula el % de teobromina para la muestra 4:

$$0 = 18.7033 \mu\text{mol}_{\text{teo agr}} + 22.6000 \quad (30)$$

$$\mu\text{mol}_{\text{teo agr}} = \left| \frac{22.6000}{18.7033} \right| = 1.2083 \mu\text{mol teobromina} \quad (31)$$

$$1.2083 \mu\text{mol teobromina} \left( \frac{0.1 \text{ L}}{20 \mu\text{L} \left( \frac{10^{-6} \text{ L}}{1 \mu\text{L}} \right)} \right) = 6041.7 \mu\text{mol teobromina en el extracto} \quad (32)$$

$$6041.7 \mu\text{mol teobromina} \left( \frac{1 \text{ mol}}{10^6 \mu\text{mol}} \right) \left( \frac{194.19 \text{ g caf}}{1 \text{ mol}} \right) = 1.0884 \text{ g teobromina en el extracto} \quad (33)$$

$$\frac{1.0884 \text{ g teobromina en el extracto}}{48.8810 \text{ g semilla de cacao}} \times 100\% = 2.1821 \% \text{ teobromina en la semilla de cacao} \quad (34)$$

En la literatura no se asocian los valores de determinaciones fisicoquímicas con la calidad del cacao. Sin embargo, los valores presentados en este trabajo permiten considerar como principales factores de calidad el contenido de teobromina, el de azúcares, de antioxidantes y el de manteca; de esta forma, es posible establecer una calidad relativa de las muestras analizadas y decir que la mejor calidad con relación al contenido de los componentes de estudio, se encuentra en la muestra 5; el orden de calidad relativa sería:

Calidad de muestra de cacao:  $5 > 2 > 1 > 4 > 3$

La muestra 5 contiene una mayor cantidad de teobromina y de manteca que las demás muestras y un alto contenido de antioxidantes y azúcares.

### 3.7 Determinación de incertidumbres

Las incertidumbres se calcularon de acuerdo con el método utilizado por la EMA (Entidad Mexicana de Acreditación [11]) con la siguiente ecuación:

$$U_{rel} = \sqrt{s_{est}^2 + (u_1)^2 + (u_2)^2 + (u_3)^2 + \dots + (u_i)^2} = \frac{u_p}{p} \quad (35)$$

$$u_i = \frac{u_m}{m} \quad (36)$$

La incertidumbre expandida debe expresarse de acuerdo con la ecuación 35. La incertidumbre estimada ( $u_{rel}$ ), deberá combinarse con las incertidumbres que considere el laboratorio significativas y que no se encuentren incluidas dentro del diseño de la validación, por ejemplo: el material de referencia certificado, la resolución del material, etc, y al error asociado a las medidas ( $s_{est}$  que puede ser la desviación estándar de las medidas o bien el error típico asociado a la curva de calibración  $s_{y/x}$  o el error  $s_{x0}$ ) donde  $u_i$  es la incertidumbre relativa del parámetro medido ( $m$ ), es decir, la razón de la incertidumbre del parámetro ( $u_m/m$ ).

#### 4. Conclusiones

El porcentaje de humedad en las muestras de semilla de cacao analizadas se encuentra dentro del límite máximo permitido. El porcentaje de manteca en las muestras de semilla de cacao también es un indicador de su calidad, siendo de mejor calidad si tiene altos porcentajes de manteca, en todas las muestras el porcentaje es mayor al 46% de la masa total.

La potenciometría es una técnica que permite cuantificar el % de azúcares en el cacao y el % de ácido oleico en la manteca, siendo ambos parámetros que permiten deducir la calidad del cacao. El método de voltamperometría lineal es un método adecuado dado que permite cuantificar la capacidad antioxidante de manera directa, con una valoración inversa, valorando directamente el yodo yodurado patrón con el extracto del cacao.

La cafeína y la teobromina se cuantificaron simultáneamente en el medio de  $B(OH)_3/B(OH)_4^-$   $C=0.16 \text{ mol L}^{-1}$   $pH=9$  con la técnica de polarografía diferencial de impulsos.

La muestra de cacao con mayor calidad de las analizadas es la muestra 5, con los mayores porcentajes de manteca de cacao y teobromina, además de presentar valores elevados de antioxidantes y azúcares respecto a las otras muestras analizadas y también de tener dentro de los límites permitidos el porcentaje de humedad y de ácido oleico de su manteca.

Los métodos electroquímicos utilizados son adecuados para determinar parámetros fisicoquímicos del cacao, que nos permiten concluir acerca de su calidad.

#### 5. Agradecimientos

Se agradece al CONAHCYT por apoyar el desarrollo de este trabajo a través de la beca otorgada (CVU: 1257096) para estudios de Maestría en Ciencias Químicas.

#### 6. Referencias

- [1]. Renato Meireles dos Santos, Analysis of the Sensory Profile and Physical and Physicochemical Characteristics of Amazonian Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans Produced in Different Regions, *Foods*, 13(14), 2171(2024).
- [2]. Secretaría de Salud, NORMA Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2013, Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. México. SSA.
- [3]. J. Preza de la Vega. Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles (tesis de Licenciatura); Universidad Nacional Autónoma de México, México, (2007).
- [4]. S. Perrez Akoa, Sugar profile and volatile aroma composition in fermented dried beans and roasted nibs from six controlled pollinated Cameroonian fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids, *Food Bioscience* 53, 102603(2023).
- [5]. E. Sánchez. Estudio comparativo de mieles mexicanas y extranjeras a través de métodos electroquímicos y la reacción de Fehling. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México, (2019).

- [6]. J. Martínez, Determinación por métodos analíticos de la calidad de la miel de abejas nativas sin aguijón (apidae: meliponini) en la cuenca del Balsas, Michoacán, México. (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México, (2016).
- [7]. G. Reyes García, Aporte al estudio de la calidad del café con base en sus propiedades químico-analíticas. (Tesis de Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, México, (2019).
- [8]. ISO-660:2020, Animal and vegetable fats and oils — Determination of acid value and acidity, ISO, Cuarta edición, Suiza.
- [9]. Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 51.) Theobromine (1991).
- [10] B. Kruszewski, M. W. Obiedziński, Multivariate analysis of essential elements in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. *LWT* 2018, 98, 113–123.
- [11] Entidad Mexicana de Acreditación, a. c. FECHA DE EMISION FECHA ENTRADA VIGOR HOJA MOTIVO: REVISIÓN 2013-04-12 2013-04-18 1 DE 16 DOCTO N. MP-CA005-05 ema-001 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS INCERTIDUMBRE DE MEDICIONES.

## Estudio electroquímico sobre la formación de complejos de ácido carmínico con cationes $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Al}^{3+}$ y $\text{Cu}^{2+}$ .

Aranza Roldán González, Gerardo Reyes García, Edgar Islas Ortíz,  
Ulrich Briones Guerash Silva, Octavio Reyes Salas\*.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Departamento de Química Analítica. Ciudad Universitaria. Alcaldía Coyoacán. C.P. 04510 Ciudad de México, CDMX, México. Tel: +52 (55) 54 21 09 38, e-mail: [roldangonzalezaranza@gmail.com](mailto:roldangonzalezaranza@gmail.com), [gerrancio@gmail.com](mailto:gerrancio@gmail.com), [islasortize@gmail.com](mailto:islasortize@gmail.com), [ulrichbgs@quimica.unam.mx](mailto:ulrichbgs@quimica.unam.mx), [oresal@quimica.unam.mx](mailto:oresal@quimica.unam.mx).

### Resumen

El ácido carmínico (representado como AC) es el compuesto colorido extraído del insecto originario de México, grana cochinilla (*Dactylopius coccus Costa*), que ha sido utilizado históricamente como colorante natural, al aprovechar su capacidad de formar quelatos con diferentes iones metálicos y dependiendo de la proporción del colorante, del pH y del ion metálico, se pueden obtener colores variados, además de mejorar la estabilidad para su aplicación en productos finales ya sean alimentos (yogures, embutidos y bebidas), cosméticos o fármacos. Conocer las estequiometrías y constantes de formación de los complejos de ácido carmínico representa una ventana de oportunidad para mejorar su aplicación en distintos productos finales e incentivar la recuperación del cultivo de grana cochinilla; la grana cochinilla crece y se cultiva en algunas variedades de nopal (como *Opuntia ficus-indica variedad Atlixco* o variedad *San Gabriel*). En este trabajo se presenta, el estudio de la estequiometría de los complejos formados entre ácido carmínico y cationes metálicos como cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), así como sus correspondientes constantes de formación, mediante el uso de técnicas electroquímicas como la potenciometría y la polarografía.

**Palabras clave.** *Colorante natural, Electroquímica, constantes de formación.*

### Abstract

Carminic acid (represented as AC) is the colorful compound extracted from the insect originating in Mexico, Cochineal (*Dactylopius coccus Costa*), which has historically been used as a natural dye by taking advantage of its ability to form chelates with different metal ions and depending on the proportion of the dye, the pH and the metallic ion, various colors can be obtained, in addition to improving stability for its application in final products such as foods (yogurts, sausages and drinks), cosmetics or pharmaceuticals. Knowing the stoichiometries and formation constants of carminic acid complexes represents a window of opportunity to improve their application in different final products and encourage the recovery of the cochineal farming and the application of the carminic acid as a national product. This work presents the study of the stoichiometry of the complexes formed (in acidic medium without buffer) between carminic acid and metal cations such as copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ), aluminum ( $\text{Al}^{3+}$ ) and calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), as well as its corresponding formation constants, through the use of electrochemical techniques such as potentiometry and polarography.

**Keywords.** *Natural dye, Electrochemistry, formation constants.*

## 1. Introducción

Actualmente, existe la tendencia de utilizar colorantes alimentarios de origen natural en lugar de productos sintéticos [1] debido a potenciales efectos tóxicos o incluso cancerígenos; Sin embargo, los pigmentos naturales pueden ser más complejos y costosos de producir [2].

Bajo esta perspectiva la grana cochinilla es una gran opción como colorante natural, ya que tiene sus orígenes en Mesoamérica al menos desde el siglo II a. C. [3]. Los antiguos mesoamericanos aprovechaban las propiedades de este colorante para textiles, escritura, para ilustrar mapas, pintura mural, y su gastronomía; se referían a la grana cochinilla como “nocheztli” o “sangre de tunas” [3]. La zona Mixteca y Puebla destacaban por su producción de cochinilla y tanto los aztecas como los mayas producían, comerciaban y exportaban el tinte de cochinilla que además era uno de los más valiosos artículos extraídos como tributo de los pueblos conquistados [4], solo después del oro y la plata en importancia.

El extracto de cochinilla es el producto concentrado obtenido de la grana cochinilla hembra (*Dactylopius coccus Costa*); el macho vive de dos a tres días y muere después de la fecundación, mientras que la hembra deposita sus huevecillos y vive entre 3 y 4 meses. Este extracto de cochinilla tiene propiedades colorantes debidas principalmente al ácido carmínico (AC), quien posee la capacidad de formar quelatos con diferentes iones metálicos [5]. Dependiendo del catión metálico y su concentración, así como de la composición del medio, se pueden obtener complejos con una coloración y estabilidad muy variada.

En este sentido, el estudio de la estequiometría de los complejos formados entre ácido carmínico y cationes metálicos, así como de sus correspondientes constantes de formación representa una ventana de oportunidad para su aplicación en distintos productos [6].

## 2. Experimental

### 2.1. Obtención de los extractos de ácido carmínico

Los extractos se obtuvieron de una muestra comercial de polvo de cochinilla, que consiste en el insecto femenino seco y molido, este se diferencia del insecto masculino por su tamaño, al ser más grande (mide alrededor de 3 a 6 mm de largo y de 2.5 a 4.5 mm de ancho) además de que el macho presenta alas y vive no más de tres días. Se tomó una cantidad definida de este polvo (alrededor de 325 g) y se realizaron 4 extracciones Soxhlet de 10 ciclos cada extracción, en solvente etanol:agua 50:50, seguido de un filtrado con vacío y llevado a un volumen definido (1.0 L para las dos primeras y 0.5 L para las dos últimas).

Realizar la extracción en agua como solvente requiere una temperatura de evaporación más alta que una mezcla etanol:agua y este aumento de temperatura favorece la desnaturalización de proteínas propias del insecto, que se arrastran en el reflujo del solvente; por ello, para reducir la presencia de proteínas, se eligió la extracción en solvente etanol:agua y se realizó un filtrado para

eliminar la proteína que pudo haber precipitado. Posteriormente se cuantificó el ácido carmínico en el extracto.

### 2.2. Valoración de los extractos de ácido carmínico

La concentración de estos extractos de ácido carmínico fue determinada mediante un potenciómetro Metrohm 827 pH Lab usando un electrodo de vidrio sensible a iones  $H^+$  y una disolución valorada de NaOH  $0.0213 \pm 0.0003$  mol/L con lo que se obtuvieron curvas de valoración; los puntos de equivalencia se determinaron por método gráfico, siendo la concentración del ácido carmínico proporcional a la diferencia entre dos puntos de equivalencia ya que el ácido carmínico presenta 3 valores de  $pK_{a1}=3.2$ ,  $pK_{a2}=6.2$  y  $pK_{a3}=8.92$  [6], pero debido al pH inicial del extracto, que fue mayor a 4, solo se observan  $pK_{a2}$  y  $pK_{a3}$ .

### 2.3. Estudio electroquímico fundamental

Se aplicaron las técnicas de polarografía clásica y polarografía diferencial de impulsos tanto al ácido carmínico como a sus correspondientes complejos con los cationes de  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Cu^{2+}$ ; estas técnicas se realizaron en el potencióstato 797 VA Computrace de Metrohm. De los extractos valorados de ácido carmínico se tomó una alícuota que se añadió a la celda con 10 mL de una disolución amortiguadora de  $NH_4^+/NH_3$   $0.2$  mol·L<sup>-1</sup> a pH=10 y que nos permitió tener una concentración en celda de ácido carmínico de aproximadamente de  $2 \times 10^{-4}$  mol/L; se usaron los siguientes parámetros de barrido en el equipo: Velocidad de barrido  $5$  mV·s<sup>-1</sup>. Amplitud de impulso 50 mV. Tiempo de pulso 40 ms. Potencial de inicio 0 mV. Potencial final -1700 mV; de esta forma se obtuvieron polarogramas por diferencial de impulsos.

### 2.4. Síntesis de complejos de ácido carmínico

De acuerdo con las posibles estequiometrías de formación de complejos de ácido carmínico con los iones metálicos Calcio, Aluminio y Cobre determinadas por potenciometría y polarografía, se seleccionaron algunos complejos con cada ion para su síntesis, que se realizó colocando el extracto de ácido carmínico previamente valorado, en agitación constante durante 15 minutos con la sal del catión requerido en estado sólido, a temperatura ambiente ( $24 - 27$  °C), en las cantidades estequiométricas calculadas correspondientes para cada complejo, después de dejar en reposo durante un día en temperatura ambiente; los complejos formados con calcio y con cobre precipitaron fácilmente y se recuperaron por filtración al vacío. Los complejos formados con aluminio fueron secados por evaporación y se recuperó raspando las paredes del vaso de precipitados. Los 6 complejos se dejaron secar en desecador hasta obtener un peso constante. Cada complejo sintetizado se pulverizó en mortero, se pesó y se colocó en vial de vidrio etiquetado para su posterior análisis.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Valoración de los extractos de grana cochinilla.

La concentración de los extractos de ácido carmínico obtenidos fue determinada mediante un potenciómetro Metrohm 827 pH Lab usando un electrodo de vidrio sensible a iones  $H^+$  y una disolución valorada de NaOH con lo que se obtuvieron curvas de valoración como la que se muestra a continuación.

La concentración de ácido carmínico corresponde a la diferencia entre ambos puntos de equivalencia que se determinaron por método gráfico y tras realizar la valoración por triplicado se obtiene una concentración promedio de  $0.0405 \pm 0.0006$  mol/L

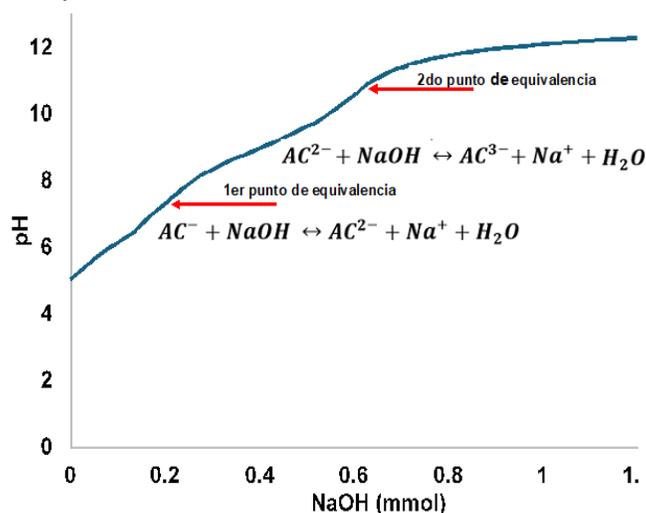
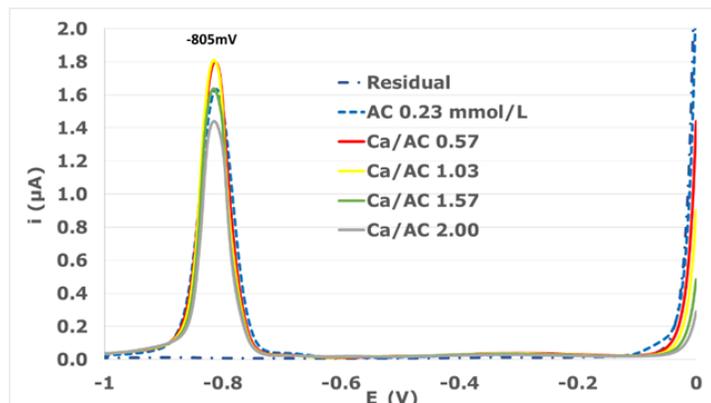


Figura 1. Valoración ácido-base de ácido carmínico extraído en medio etanol-agua (50:50).

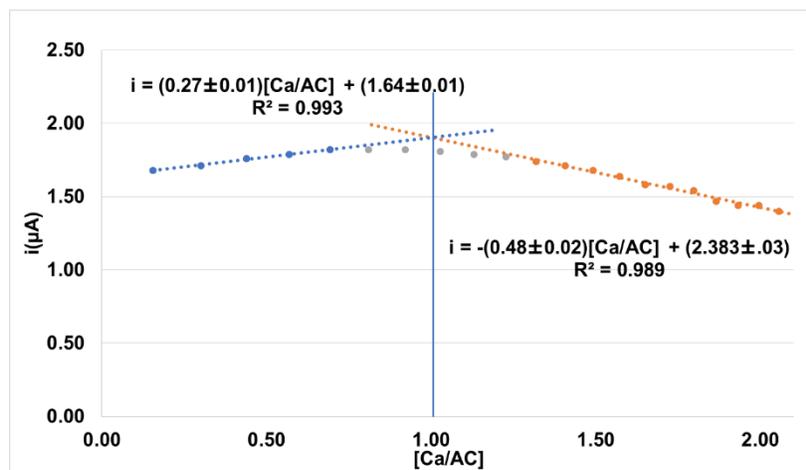
#### 3.2. Estudio electroquímico fundamental del ácido carmínico y sus complejos con $Ca^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Cu^{2+}$ .

Se realizaron adiciones de 100  $\mu$ L de un extracto valorado de ácido carmínico y después se realizaron adiciones de una disolución valorada de los distintos cationes metálicos y se observaron los cambios en las señales obtenidas, en el caso de las adiciones del catión  $Ca^{2+}$  al ácido carmínico se observaron las siguientes curvas polarográficas.



**Figura 2.** Polarogramas diferenciales de impulsos del ácido carmínico, concentración en celda  $2.30 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>, con adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$   $1.039 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; se presentan las diferentes relaciones molares entre el Ca(II) y el ácido carmínico.

Al realizar las mediciones de corriente sobre la señal en -815 mV se pudo obtener la siguiente curva



**Figura 3.** Amperometría de la señal en -815mV. i corriente (A) vs relación molar Ca/AC.

Como se puede observar por las líneas de tendencia trazadas sobre la curva, ocurre un cambio cuando la proporción de Ca/AC es 1.0, lo que indicaría la formación del complejo con estequiometría ML; un experimento posterior muestra que solo existe el complejo ML y que la zona donde casi no cambia la corriente, se debe a la proporción del complejo disociado ( $\alpha$ ) del complejo 1:1 a baja concentración, lo que permite el cálculo del grado de disociación.

Por la naturaleza de la polarografía sabemos que las corrientes registradas por el equipo corresponden a los analitos y son proporcionales a las concentraciones de los mismos de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$i_{teo} = nK_D Co \quad (1)$$

$$i_{exp} = nK_D Co(1 - \alpha) \quad (2)$$

Donde:

$i$   $\equiv$  corriente medida en el electrodo

$n$   $\equiv$  cantidad de electrones de intercambio

$K_D$   $\equiv$  constante de difusión de la especie química

$C$   $\equiv$  concentración de la especie química

$\alpha$  = proporción del complejo disociado

Entonces el cociente de estos valores representa el nivel de disociación  $(1 - \alpha)$

$$\frac{i_{exp}}{i_{teo}} = \frac{nK_D C(1-\alpha)}{nK_D C} = 1 - \alpha \quad (3)$$

Como la estequiometría del complejo de Calcio – ácido Carmínico es 1:1, se propone la siguiente tabla de variación de especies:

**Tabla 1.** Tabla de variación de especies para la reacción de formación del complejo  $Ca(AC)$  (1:1)

	$AC$	+	$Ca^{2+}$	$\leftrightarrow$	$Ca(AC)$
Inicio	Co		----		----
Se agrega	----		Co		Co
Equilibrio	$\alpha Co$		$\alpha Co$		$Co(1-\alpha)$

Por ley de acción de masas

$$K'_{F CaAC} = \frac{|Ca \text{ Ác. Carmínico}|}{|Ca||\text{Ác. carmínico}|} = \frac{Co(1-\alpha)}{\alpha^2 Co^2} = \frac{(1-\alpha)}{\alpha^2 Co} \quad (4)$$

En este caso la corriente experimental ( $i_{exp}$ ) es  $1.82 \times 10^{-6}$  A mientras que la corriente teórica ( $i_{teo}$ ) es  $1.9097 \times 10^{-6}$  A entonces

$$\frac{i_{exp}}{i_{teo}} = 1 - \alpha = \frac{1.82 \times 10^{-6}}{1.91 \times 10^{-6}} = 0.9504 \quad (5)$$

$$K'_{F CaAC} = \frac{(1-\alpha)}{\alpha^2 Co} = \frac{0.9504}{(0.0496)^2 (2.58 \times 10^{-4})} = 1.49 \times 10^6 \quad (6)$$

$$\log K'_{F CaAC} = 6.18$$

Para los otros cationes se realizó el mismo procedimiento y se obtuvieron los siguientes resultados.

### Aluminio-Ácido carmínico

En el polarograma diferencial de impulsos de la adición de  $\text{Al}^{3+}$  al AC se seleccionó la señal representativa en -960 mV.

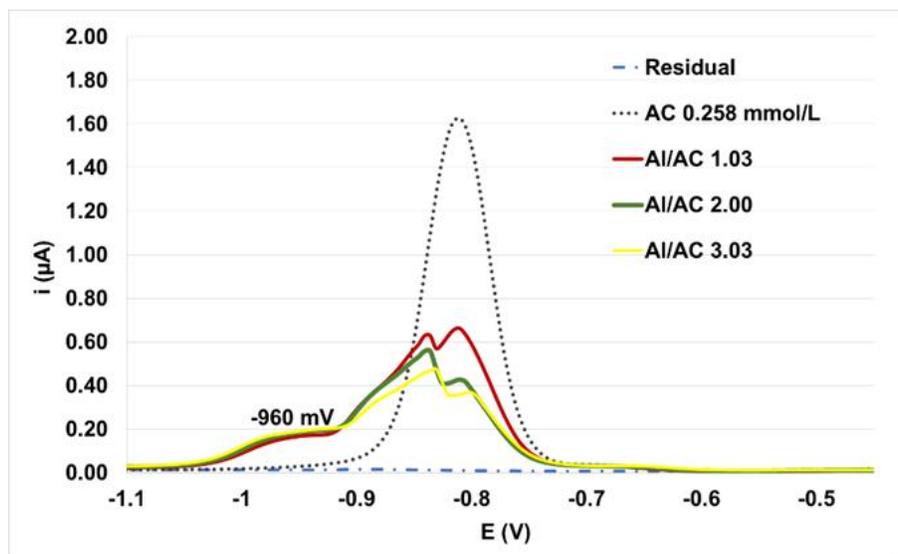


Figura 4. Polarograma diferencial de impulsos Al / AC. Se observan las señales en -841 mV y -960 mV.

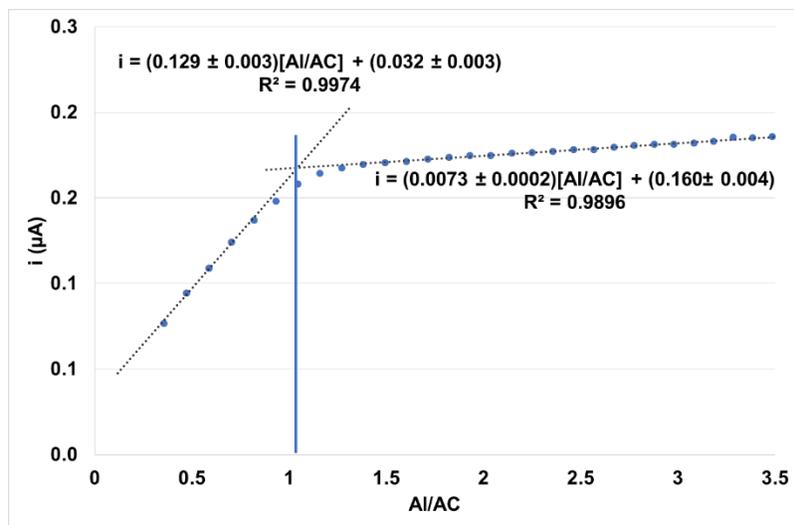
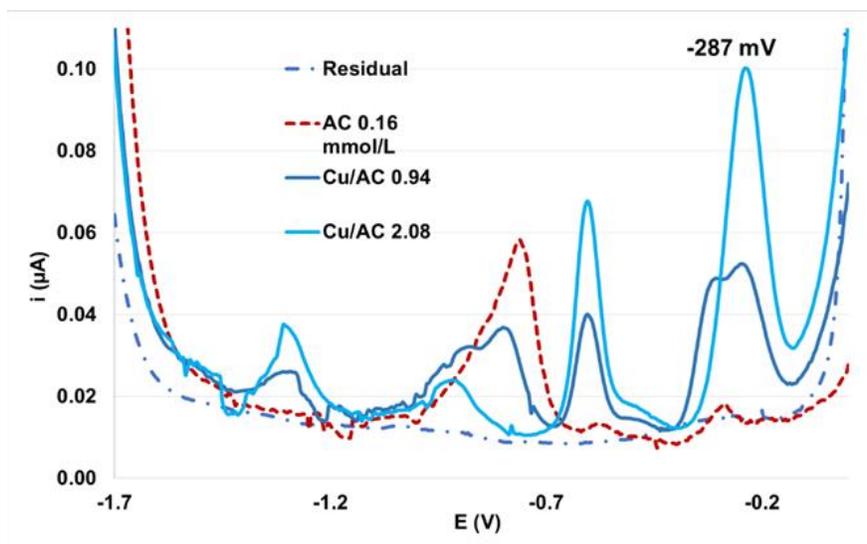


Figura 5. Amperometría de la señal en -960 mV.  $i$  corriente (A) vs relación molar Al/ AC.

En esta gráfica se observa un cambio de pendiente en la proporción 1.05, es decir, se forma el complejo AlAC (estequiometría 1:1).

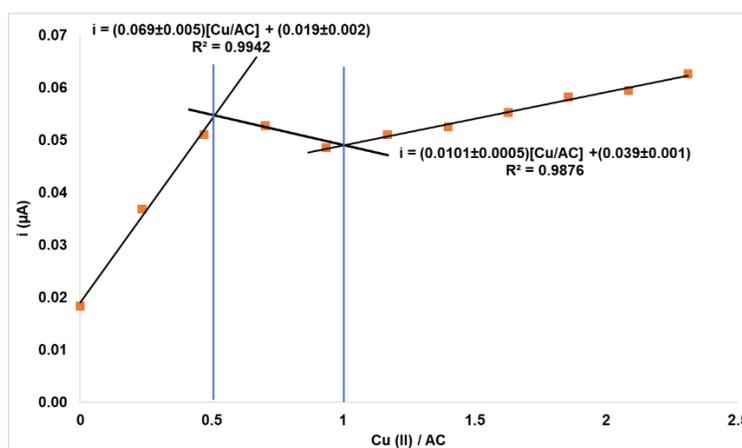
### Cobre – Ácido Carmínico

En el polarograma diferencial de impulsos de la adición de  $\text{Cu}^{2+}$  al ácido carmínico se observaron distintas señales de las cuales se seleccionó la señal representativa en  $-287 \text{ mV}$ .



**Figura 6.** Polarograma diferencial de impulsos Cu – AC. Ácido carmínico en celda  $1.57 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  con diferentes concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$ .

La curva amperométrica de la señal en  $-287 \text{ mV}$  nos muestra 2 cambios de pendiente uno ocurre en la proporción 0.47 (es decir, estequiometría 1:2, complejo  $\text{Cu}(\text{AC})_2$ ) y el otro en proporción 1.03 (estequiometría 1:1, complejo  $\text{CuAC}$ )



**Figura 7.** Amperometría de la señal en  $-287 \text{ mV}$ . I corriente (A) vs. relación molar Cu/AC.

Después de realizar los cálculos para las constantes de formación se obtuvieron los valores en la siguiente tabla; en un trabajo previo publicado [7] se mostró que el ácido carmínico se reduce con 2 electrones en su señal principal por lo que se considera que los complejos también se reducen con dos electrones.

**Tabla 2.** Estequiometrías y constantes de formación condicional identificadas mediante polarografía diferencial de impulsos.

Ion metálico	Estequiometría	Constante de formación $K_f$	Constante de formación $\log K_f$
Calcio	1:1 (CaAC)	$(1.49 \pm 0.06) \times 10^6$	6.17
Aluminio	1:1 (AlAC)	$(1.14 \pm 0.07) \times 10^6$	6.06
Cobre	1:2 (CuAC <sub>2</sub> )	$(1.02 \pm 0.08) \times 10^4$	4.01
	1:1 (CuAC)	$(1.53 \pm 0.03) \times 10^{13}$	13.18

### 3.3. Síntesis de los Complejos de Ácido Carmínico.

La síntesis de los complejos de ácido carmínico con Calcio y Cobre, presentan porcentajes de rendimiento menores al 50%, mientras que los complejos de ácido carmínico con Aluminio presentan un rendimiento mayor al 60% que se puede atribuir a la estabilidad de los complejos, la forma de secado y principalmente la forma de recuperación del complejo sintetizado.

Cabe señalar que, al realizar la síntesis en otras condiciones de temperatura y mayor concentración de los analitos, se han podido obtener mejores porcentajes de rendimiento en su síntesis, como puede observarse en la segunda síntesis del complejo CaAC (1:1) donde se obtuvo un rendimiento de 63.82% al modificar las siguientes condiciones:

- Temperatura de reacción: 70 °C (el ácido carmínico es estable aún a temperaturas mayores)
- Concentración del ácido carmínico: en la primera síntesis se empleó una concentración  $4.32 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> y en la segunda fue de  $6.26 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>.
- Adición del ion metálico: en la primera síntesis se agregó en estado sólido y en la segunda se agregó disuelto en un poco de agua desionizada.
- Precipitación: después de la reacción se indujo la precipitación en baño de hielo.
- Recuperación: se filtró al vacío; las aguas madre se dejaron precipitar nuevamente y se volvieron a filtrar.

En la Tabla 3 se presenta el rendimiento de la síntesis de los complejos estudiados.

**Tabla 3.** Síntesis de complejos y solubilidad aproximada en medio buffer acético-acetato  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , a un pH de 5.

Complejo	Masa teórica (g) del complejo	Masa del complejo Sintetizado (g)	Rendimiento (%)	Color
CaAC	10	2.9289	29.29	café rojizo
CaAC (2 <sup>a</sup> . Síntesis)	7	4.4677	63.82	café rojizo
AlAC	10	6.1470	61.47	violeta
CuAC	10	3.4424	34.42	azul
CuAC <sub>2</sub>	10	2.8597	28.60	morado

#### 4. Conclusiones

El empleo de técnicas electroquímicas ha permitido el estudio de complejos metálicos del ácido carmínico. Se han identificado los complejos 1:1 para Ca(II), Al(III) y Cu(II), además del complejo CuAC<sub>2</sub>; también se han evaluado sus respectivas constantes de formación. Estos resultados han permitido realizar la síntesis de los complejos y comprobar que, efectivamente, el color de cada uno de ellos es diferente, lo que permite predecir mayores aplicaciones del ácido carmínico como colorante.

#### 5. Referencias

- [1] M. Attokaran. Natural Food Flavors and Colorants (2017). <https://doi.org/10.1002/9781119114796>
- [2] C. Socaciu. Food colorants. En *CRC Press eBooks*. (2007). <https://doi.org/10.1201/9781420009286>
- [3] L. Arroyo. Tintes Naturales Mexicanos: su aplicación en algodón, henequén y lana. UNAM (2008).
- [4] <https://www.worldhistory.org/trans/es/1-21002/cochinilla/>. Consultado el 11 de septiembre de 2024.
- [5] A. Mortensen. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure And Applied Chemistry*, 78(8), 1477-1491 (2006). <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>
- [6] E. Islas-Ortíz. Aporte analítico al estudio de colorantes naturales. Tesis maestría UNAM (2016)
- [7] O. Reyes-Salas *et al* JMex.Chem. Soc. **55** [2] 89-93 (2011).

## Elaboración e implementación de materiales didácticos interactivos para la enseñanza de Química Analítica

Luis Manuel González Rodríguez, Silvia Citlalli Gama González, Norma Ruth López Santiago

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad Universitaria, Circuito Escolar S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, Ciudad de México, CP 04510. Tel: +52 (55) 56 22 37 54., e-mail: [silviacitlalli@quimica.unam.mx](mailto:silviacitlalli@quimica.unam.mx)

### Resumen

Se diseñaron y aplicaron materiales didácticos interactivos para la enseñanza de temas de Química Analítica, empleando metodologías activas como aula invertida y gamificación. Los materiales, creados con herramientas como Genially, Wordwall y PowerPoint, incluyeron recursos interactivos y dinámicas lúdicas, como una ruleta para fomentar la participación de los alumnos en clase. La evaluación se realizó mediante cuestionarios para estudiantes y profesores, así como pruebas de conocimiento. Los resultados mostraron que los materiales fueron bien recibidos, con un alto porcentaje de alumnos considerándolos didácticos y afines a su estilo de aprendizaje. Las evaluaciones reflejaron que la mayoría de los estudiantes adquirieron satisfactoriamente los conocimientos requeridos. Se concluyó que estas estrategias y recursos promovieron un aprendizaje más autónomo, activo y efectivo, recomendándole su uso continuo para mejorar la enseñanza de Química Analítica.

**Palabras clave.** *Material didáctico, Química Analítica, Aprendizaje activo.*

### Abstract

Interactive teaching materials were designed and applied for teaching Analytical Chemistry topics, using active methodologies such as flipped classroom and gamification. The materials, created with tools such as Genially, Wordwall and PowerPoint, included interactive resources and fun dynamics, such as a roulette wheel to encourage student participation in class. The assessment was carried out through questionnaires for students and teachers, as well as knowledge tests. The results showed that the materials were well received, with a high percentage of students considering them didactic and in line with their learning style. The evaluations reflected that most students satisfactorily acquired the required knowledge. It was concluded that these strategies and resources promoted more autonomous, active and effective learning, recommending their continued use to improve the teaching of Analytical Chemistry.

**Keywords.** *Analytical Chemistry, Teaching materials, Active learning.*

## 1. Introducción

La Química Analítica ha ido ampliando sus objetivos y recursos con el paso de los años y del desarrollo científico, lo que permite considerarla una disciplina encaminada a la resolución de problemas reales de la sociedad actual. En esta área se deben adquirir los conocimientos y destrezas que permitan desarrollar distintas estrategias para la resolución de diversas problemáticas que afectan al bienestar de la sociedad. tanto en la investigación como en la industria [1,2]. La necesidad de resultados con un alto rendimiento, rapidez, simplicidad y bajo costo, requiere la formación continuada y multidisciplinar para cumplir las expectativas no sólo del mercado laboral sino del mundo de la investigación y el desarrollo. Ante estos cambios, como educadores debemos responder con una vuelta de tuerca del rol tradicional, pasando de ser el centro del proceso enseñanza-aprendizaje a ser un conductor del proceso de aprendizaje autónomo [3]. En las metodologías activas, esta estrategia se distingue por centrarse en el aprendizaje del alumno e incentivar su participación consciente en el proceso educativo. La comprensión del material a utilizar es crucial para la ejecución del aprendizaje activo, diseñado para gestionar la experiencia didáctica como una jornada que parte del alumno y no solo como una respuesta a lo que plantea el docente. Los ejemplos más comunes del aprendizaje activo son: El aprendizaje basado en problemas, Aprendizaje basado en proyectos, Aula invertida y Gamificación [4].

El objetivo de este trabajo fue diseñar y aplicar materiales didácticos para la enseñanza de temas de Química Analítica I que se imparten en la Facultad de Química-UNAM.

## 2. Experimental

Para la creación del material didáctico se emplearon diversos softwares para realizar las láminas y problemas. Estos materiales cumplieron con las características del aprendizaje activo que es la participación del alumno en todo momento, que el profesor esté presente a manera de guía, el enfoque de desarrollo de las propias habilidades del alumno y la construcción del aprendizaje por medio de la experiencia. La metodología que se empleó fue la siguiente:

- **Definir la estrategia activa.** Las estrategias de aprendizaje activo que se utilizaron fueron el aula invertida y la gamificación. El aula invertida permite a los alumnos usar sus propios conocimientos al tener la oportunidad de explicar ellos mismos el tema en cuestión del que se va a tratar, por medio del uso de la participación. La gamificación se utilizó para agilizar la dinámica de la participación puesto que para aprovechar el tiempo en el aula se desarrolló una ruleta donde la persona asignada por la misma tenía oportunidad de ganar un incentivo a su calificación de la práctica por medio de su participación.
- **Elaboración del material didáctico.** Para la elaboración del material se emplearon las siguientes plataformas: a) Genially, es una buena herramienta para hacer materiales didácticos, pues tiene múltiples funciones para la interactividad, como lo podrían ser, inserción de links, ampliación y presentación de imágenes extras, incrustar ejercicios, animaciones, etc.; b) Wordwall, es una herramienta para la creación de actividades, la

versatilidad de plataforma es ideal pues dispone de múltiples maneras de presentar una actividad; y c) Powerpoint, para la creación de láminas de las prácticas correspondientes a los temas de compuestos de coordinación y solubilidad/precipitación.

- **Revisión del por parte de profesores del departamento de analítica.** El material debe ser aprobado antes de ser presentado. Esto se hace mediante la revisión de los mismos por parte de diferentes docentes que brindan sus observaciones acerca del contenido o la modificación de la manera de abordar ciertos temas.
- **Aplicación con los alumnos en grupos piloto aplicando las estrategias de aula invertida y gamificación.** El material está diseñado para ser interactivo y adaptable, permitiendo su uso tanto dentro como fuera del aula. En caso de que el profesor esté presente, actúa como un apoyo para facilitar la comprensión del contenido, que fue en la totalidad de los casos. La forma en la que se impartió fue de manera lúdica ya que se elaboró una ruleta en la que los alumnos salían escogidos al azar para participar y que así la información quedará más clara.  
En este caso la estrategia de aplicación fue compartir los materiales con los alumnos vía Classroom, previo a la clase; durante la clase se implementó la estrategia lúdica usando la ruleta, se dio la indicación de que se harán preguntas y se ganarían 0.25 puntos sobre la calificación del informe de la práctica si se respondía correctamente, pero también se podrían perder hasta 0.25 puntos sobre el informe si no se respondía o se respondía de forma incorrecta.
- **Evaluación de la actividad por profesores y alumnos.** La evaluación de las actividades fue mediante cuestionarios en Google Forms, uno para profesores y otro para alumnos donde se recopila la experiencia que tuvieron con las presentaciones y los problemas. Se realiza un test de conocimientos que engloba todo lo que se vio en el tema impartido. Con la información recopilada se hace un análisis de si la información está siendo correctamente asimilada.

### 3. Resultados y Discusión

Para apoyar el aprendizaje de los estudiantes que cursan Química Analítica I en la FQ-UNAM, se elaboraron diferentes recursos didácticos. En la Figura 1 se presentan los materiales interactivos de tres de los temas abordados en la asignatura, por ejemplo los equilibrios de intercambios de partículas o de solubilidad. Estos recursos tienen incrustados ejercicios y enlaces a otras actividades y recursos con el objetivo de que los alumnos puedan reafirmar los conceptos. Esta actividad se probó en el semestre 2024-1 y 2024-2, con los grupos 11 y 22, de 28 alumnos.

Se elaboraron actividades sencillas para reafirmar y consolidar los conocimientos de cómo expresar las constantes de equilibrio, en la Figura 2 se presentan ejemplos de los ejercicios elaborados en la plataforma de Wordwall, algunos de estos ejercicios están incrustados como

enlaces en los materiales de Genially. Esta actividad se probó en el semestre 2024-1 y 2024-2, con los grupos 11 y 22, de 28 alumnos.

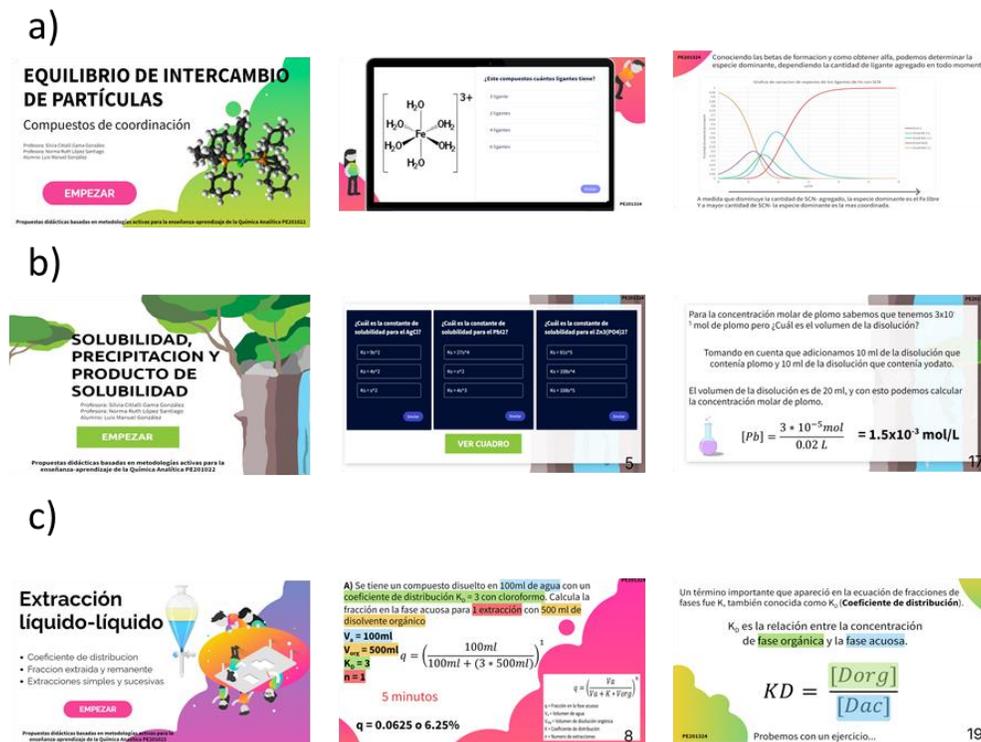


Figura 1. Materiales generados para los temas de a) Compuestos de coordinación, b) Solubilidad/Precipitación y c) Extracción Líquido-líquido. Elaboración propia con la aplicación de Genially.



Figura 2. Ejercicios elaborados con Wordwall para repasar la expresión de las constantes de equilibrio

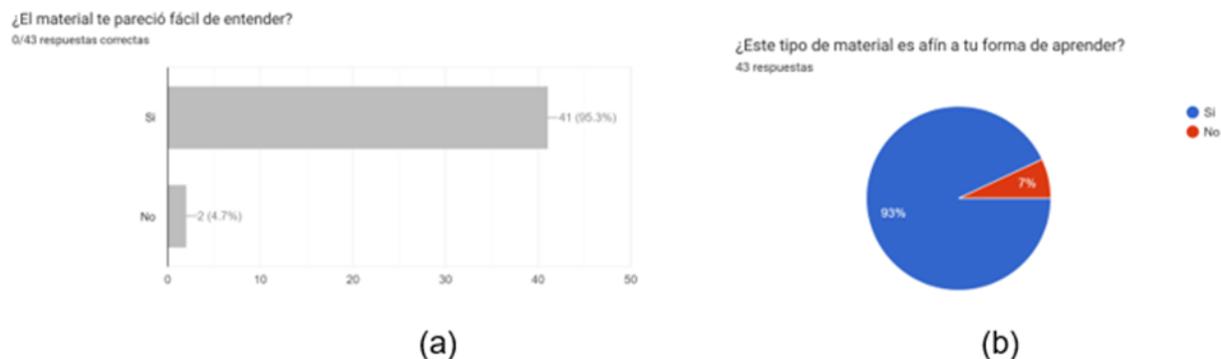
Como parte de las dinámicas en la clase se empleó una ruleta al inicio de las clases, para la participación de los estudiantes, Figura 3. Esta actividad se probó en el semestre 2024-2, con el grupo 22, de 28 alumnos.



**Figura 3.** Ejemplo de la ruleta utilizada para la gamificación de la participación en clase.

Posterior a la aplicación de las actividades, se efectuó la evaluación de estas, con los cuestionarios de Googleforms, con los siguientes rubros: indica a grandes rasgos que se preguntó para evaluar la actividad. Se hizo el análisis estadístico de las respuestas obtenidas con los Forms de google para cada uno de los temas, empezando por Compuestos de coordinación. En este caso participaron 28 alumnos que contestaron el cuestionario, a 26 alumnos les pareció que el material era didáctico, representando estos un 92.9%. El 96.4% de los alumnos estuvieron de acuerdo que el material era afín a su forma de aprender. El 100% de los alumnos afirmaron que utilizarían este material como una forma de reforzar sus conocimientos.

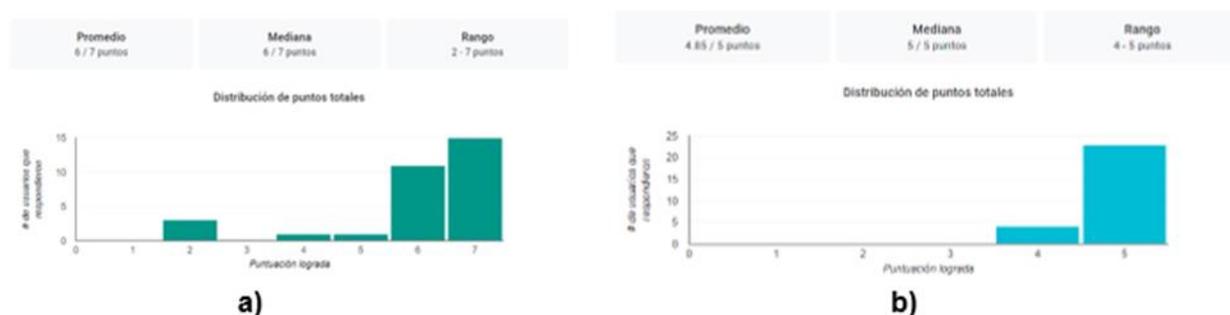
En la Figura 4 se muestran las estadísticas del Forms acerca del tema Solubilidad/Precipitación. De los 43 alumnos que contestaron el cuestionario, a 41 alumnos les pareció que el material era didáctico, representando estos un 95.3%. El 93% de los alumnos estuvieron de acuerdo que el material era afín a su forma de aprender. El 100% de los alumnos afirmaron que utilizarían este material como una forma de reforzar sus conocimientos.



**Figura 4.** Gráficas de las opiniones de los alumnos sobre el material de Solubilidad/Precipitación de una

muestra de 43 alumnos consultados. a) Pregunta: ¿El material te pareció fácil de entender? b) Pregunta ¿Este tipo de material es afín a tu forma de aprender?

Al final de cada uno de los temas se realizó una evaluación acerca de la comprensión sobre el tema que se está abordando, en la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos. De 31 alumnos evaluados en el tema de compuestos de coordinación 84.3% obtuvieron 6 o 7 puntos de un total de 7 y para el tema de Solubilidad/Precipitación, de los 27 alumnos evaluados 82.1 % obtuvieron 5 puntos de un total de 5.



**Figura 5.** Gráficas de respuestas correctas de los ejercicios de conceptos acerca del tema de: a) Compuestos de coordinación y b) Solubilidad/Precipitación.

Al final del curso se efectuó una evaluación de los tres temas, los resultados se muestran en la Figura 6. De los 26 alumnos la mayoría tuvo resultados aprobatorios acerca de los conceptos.



**Figura 6.** Gráfica de respuestas correctas de los tratamientos de conceptos acerca del tema de Compuestos de coordinación, Solubilidad/Precipitación y Extracción líquido-líquido.

#### 4. Conclusiones

El material realizado tuvo buena aceptación por parte de los alumnos, teniendo como confirmación que utilizan este material como un método de refuerzo a los conocimientos adquiridos en clase.

Se tuvo una mayor proximidad al alumno al hacer las correcciones correspondientes al material realizado posteriormente (Solubilidad y precipitación) y que este fuera mejor recibido.

De acuerdo con las respuestas de los alumnos se promovió el uso recurrente de este tipo de materiales para la impartición de los temas de Química Analítica.

Con respecto a las evaluaciones de conceptos cada cierre de tema se denota que los alumnos adquirieron de manera satisfactoria los conocimientos necesarios respecto a la asignatura.

Las actividades de química basadas en metodologías activas presentadas involucraron a los estudiantes de manera práctica y colaborativa en su aprendizaje.

## 5. Agradecimientos

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo otorgado a través de los proyectos PAPIME PE201022 (actividades Wordwall) y PE201324.

## 6. Referencias

[1] D. V. Guillén de Vera. Empleo de metodologías de aprendizaje activo con estudiantes matriculados en química analítica I, de las carreras Ciencia y Tecnología de Alimentos y Química Industrial, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción. (2017)

[2] Manuel, D. C. J., Eliana, R. R., Núría, S. I. P., & Xavier, S. I. V. Aprendizaje basado en estrategias de clase inversa en la asignatura de Química Analítica. (2020)

[3] C. V., Del Pilar Balverdi, M., Marchisio, P. F., & Sales, A. M. El modelo “clase invertida” en química analítica. *Educación Química*, 31(3), 15. (2020)

[4] E. Jiménez Vaquerizo. Metodologías activas de aprendizaje en el aula: Apuesta por un cambio de paradigma educativo. España. (2019)

# Determinación de nitritos en embutidos mediante análisis digital de imagen

Florencia Esmeralda Santiago-Martínez<sup>a</sup>, Jorge Lopez-Tellez<sup>a</sup>, Eva M. Santos<sup>a</sup>, Jose A. Rodríguez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química, Laboratorio de Química Analítica. Ciudad Universitaria, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42181. Tel: +52 (771) 717 2000 ext. 40101, \*e-mail: josear@uaeh.edu.mx

## Resumen

Los nitritos son aditivos comúnmente empleados en productos cárnicos durante el proceso de curado, sin embargo, su uso y aplicación ha sido limitado debido a que presenta diversos efectos nocivos a la salud y al ambiente. La NOM-213-SSA1-2018 regula su uso y establece un límite máximo de  $156 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , proponiendo su determinación mediante espectrometría UV-Vis. A pesar de ser efectivo presenta la desventaja de requerir equipo que puede resultar poco accesible en algunas regiones. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas económicas, miniaturizadas y sostenibles. Bajo este contexto, el presente trabajo plantea la determinación de nitritos en jamón mediante el análisis digital de imagen como metodología alternativa a la espectrometría UV-Vis tradicional, empleando una técnica miniaturizada que disminuye el consumo de reactivos. El análisis digital de imagen mostró una adecuada linealidad obteniendo un límite de detección de  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , el método propuesto mostro una adecuada precisión ( $<10\%$  RSD), no obstante los resultados del análisis de muestras mostraron diferencias significativas entre ambos métodos.

**Palabras clave.** Nitritos, Miniaturización, Muestra de alimentos, Análisis de imagen

## Abstract

Nitrites are additives commonly used in meat products during curing process, however, their use and application has been limited because of their harmful effects on health and the environment. Therefore, NOM-213-SSA1-2018 regulates their use and establishes a maximum limit of  $156 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , employing UV-Vis spectrophotometry. Although this method is effective, it has the disadvantage of requiring equipment which is inaccessible in some regions. This has prompted the search for more economical and sustainable alternatives. In this context, the present work proposes the determination of nitrites in ham by digital image analysis as an alternative methodology to traditional UV-Vis spectrometry, employing a miniaturized technique which reduces reagents consumption. Digital image analysis showed adequate linearity obtaining a limit of detection of  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , the proposed method showed adequate precision ( $<10\%$  RSD), nevertheless, sample analysis results showed significant differences between both methods.

**Keywords.** Nitrites, Miniaturization, Food Sample, Imagen Analysis

## 1. Introducción

Los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) son aditivos ampliamente utilizados en el proceso de curado de alimentos debido a que permiten la conservación, procesamiento, formación y estabilización de un color rosa característico en productos cárnicos. En los alimentos aportan sabor, aroma y actúan como agente antioxidante y antimicrobiano, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos, entre los que destaca el *Clostridium botulinum* [1]. No obstante, se han descritos diversos efectos nocivos a la salud ya que disminuyen la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno, también pueden ser precursores en la formación de N-nitrosaminas, compuestos carcinogénicos que pueden generarse en los alimentos y el organismo [2]. A pesar de que, se han explorado diversas alternativas para reemplazar los nitritos en la producción de productos cárnicos procesados y otros alimentos, hasta la fecha, las diversas funciones que desempeñan no han podido ser sustituidas por otros aditivos [3]. Debido a los riesgos que representan, se han desarrollado diferentes métodos cualitativos y cuantitativos que permitan la determinación de nitritos en las concentraciones que son regulados por instancias nacionales e internacionales destacando métodos electroquímicos, cromatográficos, fluorimétricos y electroforesis capilar. En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018 establece un límite máximo de  $156 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$  en productos cárnicos, así como un método estandarizado para su determinación mediante espectrofotometría Ultravioleta-Visible, en el cual, el analito forma una sal de diazonio que, al acoplarse a aminas aromáticas produce un compuesto azoico detectable a  $520 \text{ nm}$  [4]. A pesar de ser un método efectivo y adecuado, presenta desventajas como: elevado consumo de reactivos y muestra, así como un equipo que puede representar un costo elevado, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas más accesibles y sostenibles.

Una de estas alternativas es el análisis digital de imagen, una técnica que ha mostrado potencial como método de cuantificación en diversas aplicaciones analíticas debido a su simplicidad y bajo costo [5]. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es comparar la espectrometría UV-Vis con el análisis digital de imagen, una herramienta rápida y viable que puede realizarse empleando cámaras digitales, escáneres o smartphones en conjunto con software de uso libre para el análisis. Además, la metodología miniaturizada reduce el consumo de reactivos, lo que resulta beneficioso desde una perspectiva económica y ambiental.

## 2. Experimental

### 2.1 Reactivos y equipos

Todas las soluciones se disolvieron en agua desionizada ( $18.0 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ), purificada mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Se utilizaron ácido acético glacial obtenido de J:T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, Estados Unidos) y 1-naftilamina por Fluka (Charlotte, Carolina del Norte, Estados Unidos). El sulfato de zinc, hidróxido de sodio y nitrito de sodio fueron obtenidos por Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Se preparó una solución madre de  $\text{NaNO}_2$  con una concentración de  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El análisis espectrofotométrico se realizó empleando un equipo Perkin Elmer Lambda 40 UV-Vis (Perkin Elmer, Madrid, España). El análisis digital de imagen empleó un smartphone equipado con una cámara de  $48 \text{ mpx}$  para la captura de las imágenes sin ningún aumento. Posteriormente las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa ImageJ (Versión 1.51).

### 2.2 Análisis de la muestra

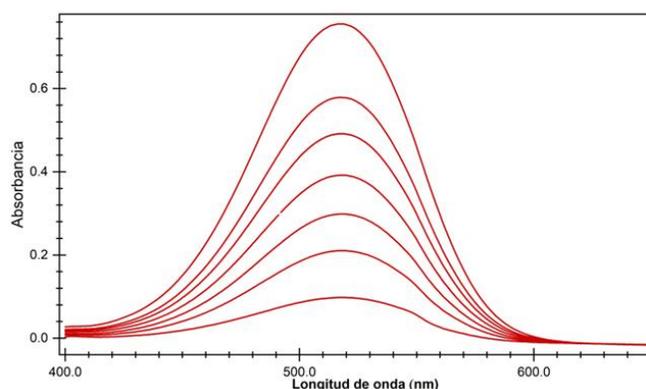
El tratamiento de la muestra se realizó de acuerdo con el método modificado de Grau y Mirna, descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018 [4]. Se calentó el agua desionizada hasta ebullición y se empleó sin dejar enfriar en el proceso de tratamiento de la muestra. Se pesaron 2.0 g de jamón de puerco y se trituraron en mortero. La muestra triturada se colocó en un vaso de precipitado y se añadieron 10 mL de agua desionizada previamente calentada. El mortero se lavó con 2 porciones de 5 mL de agua desionizada previamente calentada. El agua empleada en los lavados se adicionó en el vaso de precipitado que contenía la muestra. Posteriormente la mezcla se colocó en un baño de vapor durante 90 minutos, transcurrido el tiempo, se añadieron 10 mL de la solución de sulfato de zinc  $0.42 \text{ mol L}^{-1}$  y 12 mL de hidróxido de sodio al 2.0 % con agitación constante, la mezcla se mantuvo en el baño de vapor por 10 minutos. Transcurrido el tiempo de calentamiento, se dejó enfriar la solución hasta alcanzar temperatura ambiente, se llevó a un aforo de 50.0 mL y se filtró empleando papel filtro de poro fino.

Se preparó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de  $0.25\text{-}2.0 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (equivalentes  $0.05\text{-}0.40 \text{ mg L}^{-1}$  en solución) de  $\text{NaNO}_2$ . La preparación de cada estándar se realizó colocando un 1.0 mL del reactivo de Griess (sulfanilamida  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , ácido acético 20 % v/v y 1-naftilamina  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$ ), el volumen correspondiente de la solución madre para obtener la concentración (entre  $0.05$  y  $0.40 \text{ mg L}^{-1}$  en solución) final deseada (o 1.0 mL de la muestra filtrada), posteriormente se llevó a un aforo de 10.0 mL con agua desionizada. Las soluciones se dejaron reposar durante 20 minutos y se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 520 nm.

Para el análisis de imágenes, se utilizó una microplaca de 24 pocillos, a cada pocillo se adicionaron  $10.0 \mu\text{L}$  del reactivo de Griess, el volumen correspondiente de la solución madre y se completaron a un volumen total de  $40.0 \mu\text{L}$ , los pocillos se dejaron reposar durante 20 minutos, y posteriormente las imágenes fueron digitalizadas empleando un smartphone, previo al análisis, se realizó un tratamiento de las fotografías, que consistió en colocar una plantilla para recortar únicamente el área de interés, con el objetivo de homogeneizar el tamaño y facilitar la medición. El análisis se realizó mediante la herramienta Gel Analyzer de ImageJ.

### 3. Resultados y Discusión

Se realizó un análisis espectroscópico, realizando un barrido de 400 a 650 nm para la selección de la longitud de onda de absorción. Obteniendo un máximo de absorción de 520 nm, además se observa una tendencia lineal entre la concentración del analito respecto a la absorción (Figura 1). Se construyó una curva de calibrado obteniendo un intervalo lineal de  $0.15$  a  $2.0 \text{ mg Kg}^{-1}$  y un límite de detección (LOD) de  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (Tabla 1).



**Figura 1.** Espectro de absorción del compuesto formado entre los nitritos ( $0.25\text{-}2.0\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) y el reactivo de Griess.

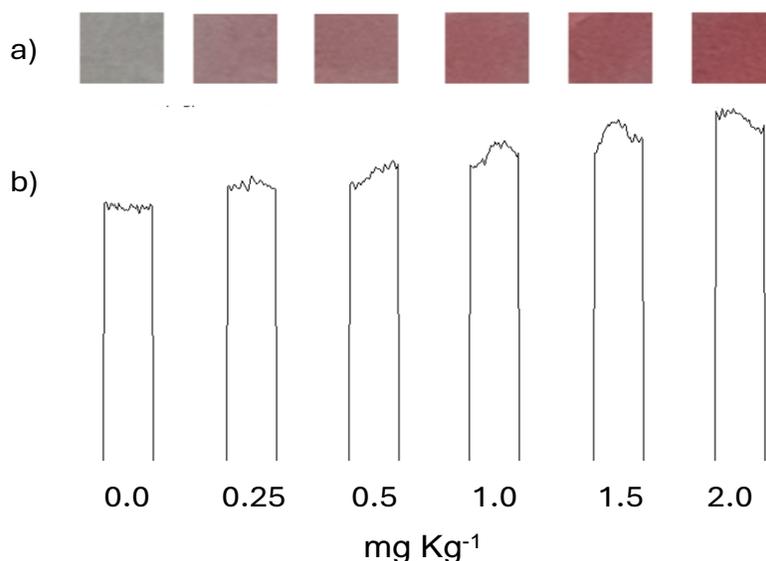
### 3.1 Optimización de la digitalización.

La toma de la imagen se optimizó con el objetivo de minimizar interferencias y garantizar imágenes homogéneas entre cada análisis. Por lo cual, las imágenes se tomaron en un entorno controlado lo que permitió reducir la presencia de reflejos o sombras provocan la alteración entre imágenes podrían afectar la interpretación de los datos. Las imágenes se capturaron con un smartphone, ubicado a una distancia fija de 20 cm entre la cámara y la superficie de la placa. El mejor ángulo de captura se logró en un ángulo perpendicular de  $90^\circ$  apoyado sobre un soporte universal y anillo para evitar las vibraciones al momento de la toma, permitiendo imágenes más consistentes y uniformes de las áreas de interés dentro de cada pocillo. Además, se mantuvieron condiciones de iluminación constantes durante todo el proceso para evitar variaciones en la intensidad o dirección de la luz, lo cual es fundamental para mantener la precisión de los colores y tonalidades que se analizan en el procesamiento digital de imagen.

Obtenida la imagen, se realizó un tratamiento de las fotografías, que consistió en colocar una plantilla para recortar únicamente el área de interés, con el objetivo de homogeneizar el tamaño y facilitar la medición, tal como se muestra en la Figura 2a. Este procedimiento se aplicó tanto a los estándares utilizados para la curva de calibración como al análisis de las muestras. Posterior al tratamiento se obtuvo un perfil de intensidad mediante el programa ImageJ (Figura 2b), este perfil permite generar un área específico para cada estándar o muestra que se relaciona con la concentración del analito. Bajo estas condiciones se construyó una curva de calibrado obteniendo un intervalo lineal de  $0.6$  a  $2.0\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  obteniendo un  $R^2=0.994$  lo que nos indica el ajuste de la curva de calibrado a un sistema lineal. Además se obtuvo un LOD de  $0.15\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  calculados para una relación señal-ruido igual a 3.29 y un LOQ de  $0.45\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  calculados para una relación señal-ruido igual a 10 acorde a criterios de la IUPAC [6] (Tabla 1), concentración que permite detectar al analito en jamón que ha sido descrito en concentraciones superiores a los  $22.0\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  [7].

El análisis digital imágenes digitales (o colorimetría de imágenes digitales) es una técnica analítica prometedora para cuantificar especies químicas [8]. El método es simple, de bajo costo y permite

la determinación de nitritos en muestras de jamon. Sin embargo, un punto crítico que debe destacarse son los errores asociados con la imagen debido a que esto esta relacionado con límites de detección menos competitivos en comparación con los obtenidos por UV-Vis.



**Figura 2.** a) Imagen de los estándares preparados sobre la plantilla, b) perfil de intensidad obtenido mediante el análisis con ImageJ

### 3.2 Validación de la metodología de análisis de imagen

La precisión de la metodología fue estimada como repetitividad y reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (%RSD, n=3) en tres niveles de concentración (1.0, 1.5 y 2.0 mg Kg<sup>-1</sup>). La repetitividad en todos fue menor al 5.0%, mientras que la reproducibilidad se mantuvo en valores menores al 10.0 %, indicando una adecuada precisión de los resultados basados en criterios de la IUPAC [6].

La exactitud de la metodología se evaluó comparando la metodología propuesta con la metodología oficial de análisis [4], una muestra se analizó por triplicado por ambas metodologías obteniendo concentraciones de 29.01±0.12 mg Kg<sup>-1</sup> (UV-Vis) y 24.51±0.54 mg Kg<sup>-1</sup> (análisis de imagen), los métodos fueron comparados utilizando la prueba t-Student, observando diferencia estadísticamente significativa entre las metodologías. Esta diferencia puede atribuirse a varios factores relacionados con el proceso de digitalización de la imagen como: condiciones de iluminación, distancia desde la que se toma la fotografía y posición del objeto en el marco son elementos críticos que afectan la calidad de la imagen analizada [9]. Una iluminación inadecuada o variaciones en la distancia pueden introducir ruido o distorsiones en la imagen, lo que a su vez influye en las mediciones obtenidas. Algunos autores señalan realizar la toma de las fotografías en una caja de luz con la finalidad de estandarizar el proceso de digitalización [10]. Por otro lado algunos métodos describen el uso de minicámaras específicas, microscopios o cámara

especiales para mejorar los resultados obtenidos [11], no obstante, utilizado un smartphone es la manera más accesible, sencilla y de menor costo. A pesar de las ventajas que presenta el análisis digital de imágenes puede no ser adecuada para aplicaciones que requieren detección a nivel de trazas [8]. De manera general se ha descrito las metodologías que emplean el análisis digital de imagen caracen exactitud adecuada lo disminuye la confiabilidad de los resultados y limita su aplicación [11]. Esto subraya la importancia de estandarizar las condiciones de captura de imágenes para minimizar la variabilidad y mejorar la confiabilidad de los resultados.

**Tabla 1.** Parámetros analíticos de la determinación de  $\text{NO}_2^-$  por ambas metodologías empleadas.

Parámetros analíticos	UV-Vis	Análisis digital de imagen
Sensibilidad	1.102±0.044	8482.888±1172.003
Ordenada	0.010±0.011	854.608±288.275
R <sup>2</sup>	0.999	0.994
LOD (mg Kg <sup>-1</sup> )	0.05	0.15
LOQ (mg Kg <sup>-1</sup> )	0.15	0.45

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que existen diferencias significativas entre los métodos de espectrometría UV-Vis y el análisis digital de imagen para la determinación del contenido nitritos en muestras de jamón. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  obtenida mediante el método oficial reporta 29.01±0.12 mg Kg<sup>-1</sup>, en comparación con el análisis digital de imagen que reportó una concentración de 24.51±0.54 mg Kg<sup>-1</sup>, lo que sugiere que se requiere estandarizar las condiciones de obtención de la imagen con la finalidad de mejorar la exactitud. Aspectos como las condiciones de iluminación, la distancia de captura y la posición del objeto en el encuadre son fundamentales para garantizar la calidad de la imagen analizada y mejorar la confiabilidad de los resultados. Considerando estos factores, es posible optimizar el análisis digital de imagen, haciéndolo una metodología más precisa y confiable para la cuantificación de nitritos en productos cárnicos y al ser adaptable a diferentes recursos, podría contemplarse como una alternativa a los análisis espectroscópicos en laboratorios o instituciones con acceso limitado a instrumentos de análisis.

#### 5. Referencias

- [1] K. Jo, S. Lee, H. Yong, Y. Choi, S. Jung. Nitrite sources for cured meat products. *LWT - Food Science and Technology*. **109**, 109583 (2020).
- [2] M. Karwowska, A. Kononiuk. Nitrates/nitrites in food-risk for nitrosative stress and benefits. *Antioxidants*. **9**, 241 (2020).
- [3] Y. Zhang, Y. Zhang, J. Ji, H. Peng, Q. Qian, Z. Pan, D. Liu. Nitrite and nitrate in meat processing: Functions and alternatives. *Current Research in Food Science*. **6**, 1-10 (2023).
- [4] Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018, productos y servicios. productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. **DOF 1**. 1-81 (2018).

- [5] M.S. Woolf, L.M. Dignan, A.T. Scott, J.P. Landers. Digital postprocessing and image segmentation for objective analysis of colorimetric reactions. *Nature protocols*. **16**, 218-238 (2021).
- [6] L. A. Currie. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*. **67**, 1699-1723 (1995).
- [7] L. Iacumin, P. Cattaneo, C. Zuccolo, S. Galanetto, A. Acquafredda, G. Comi. Natural levels of nitrites and nitrates in San Daniele dry cured ham PDO, and in meat, salt and sugna used for its production. *Food Control*, **100**, 257-261 (2019).
- [8] L. B. Santos, J. A. Barreto, J. J. Coutinho, S. L. C. Ferreira, R. S. Assis, V. A. Lemos. Green chemistry advances: integrating digital images and microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **181**, 118022 (2024).
- [9] M.A. Vargas-Muñoz, J. Morales, V. Cerdá, L. Ferrer, E. Palacio. Sensor-based method using a portable 3D-printed platform and smartphone-assisted colorimetric detection for ammonia and sulfide monitoring in anaerobic digesters and wastewater. *Microchemical Journal*. **188**, 108469 (2023).
- [10] R.I.F. Agunos, D.V.M. Mendoza, M.A.S. Rivera. Anthocyanin colorimetric strip for volatile amine determination. *International Journal of Food Science*. **2020**, 1672851 (2020).
- [11] H. Li, H. Xu, Y. Li, X. Li. Application of artificial intelligence (AI)-enhanced biochemical sensing in molecular diagnosis and imaging analysis: Advancing and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **174**, 117700 (2024).

## Cuantificación de fenoles totales en extracto acuoso de *Caléndula Officinalis L.*

Linesy Figueroa Verdin <sup>a</sup>, Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo\* <sup>a</sup>, José Manuel Cornejo  
Bravo <sup>a</sup>, Aracely Serrano Medina <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Baja California, FCQI, Universidad 14418, UABC, Parque Internacional Industrial Tijuana, 22390 Tijuana, B.C. Tel. 686 233 5035 email: [linesy.figueroa@uabc.edu.mx](mailto:linesy.figueroa@uabc.edu.mx), [gaby@uabc.edu.mx](mailto:gaby@uabc.edu.mx).

### Resumen

*Caléndula officinalis L.* ha sido utilizada con fines médicos debido a sus propiedades terapéuticas, principalmente su actividad antioxidante, calmante, antiinflamatoria y cicatrizante, destacando su efecto antiinflamatorio y calmante en la piel, estas propiedades se le atribuyen principalmente a su contenido en compuestos fenólicos [1] [2]. En el presente estudio se realizó la extracción acuosa de *Caléndula officinalis L.*, se utilizaron cosolventes de grado cosmético para favorecer la extracción de aceites u otros componentes insolubles en agua, posteriormente, para confirmar el potencial del extracto acuoso de ser utilizado en una formulación de crema tópica emoliente para tratamiento de dermatitis atópica, se realizó la cuantificación del contenido de fenoles totales. Para la determinación de fenoles totales, se utilizó el método de la 4-aminoantipirina, el cual consiste en la adición de 4-aminoantipirina en presencia de agente oxidante alcalino, en este caso, ferricianuro de potasio, a un pH de 10, formando una quinona-imina N-sustituida de color rojo. La quinona-imina N-sustituida presenta una longitud de onda máxima de absorción a 474 nm [3]. La determinación de fenoles totales mostró un contenido de  $9.33 \pm 1.39$  mg ácido gálico/g planta seca.

**Palabras clave.** Fenoles totales, 4-aminoantipirina, *Caléndula officinalis L.*, Dermatitis atópica

### Abstract

*Calendula officinalis L.* has been used for medical purposes due to its therapeutic properties, mainly its antioxidant, soothing, anti-inflammatory and healing activity, these properties are mainly attributed to its content of phenolic compounds [1] [2]. In the present study, cosmetic grade cosolvents were used to promote the extraction of oils or other water-insoluble components. Subsequently, to confirm the potential of the aqueous extract to be used in an emollient topical cream formulation for the treatment of atopic dermatitis, the quantification of the content of total phenols was carried out. For the determination of total phenols, the 4-aminoantipyrine method was used, which consists of the addition of 4-aminoantipyrine in the presence of an alkaline oxidizing agent, in this case, potassium ferricyanide, at a pH of 10, forming a red N-substituted quinone-imine. The N-substituted quinone-imine has a maximum absorption wavelength at 474 nm [3]. The determination of total phenols showed a content of  $9.33 \pm 1.39$  mg gallic acid/g dry plant.

**Keywords.** Total phenols, 4-aminoantipyrine, *Calendula officinalis L.*, Atopic dermatitis

## 1. Introducción

La dermatitis atópica es una enfermedad prevalente a nivel mundial que predomina en la edad pediátrica; sin embargo, un porcentaje de la población la padece en la adultez. La dermatitis atópica se manifiesta como una patología crónica e inflamatoria que presenta brotes y remisiones, sumamente pruriginosa y en la que el paciente sufre una afectación importante en la calidad de vida [4]. El pilar en el tratamiento para dermatitis atópica, independientemente del nivel de severidad que se presente, es la hidratación continua de la piel mediante la aplicación de emolientes. [4], [5], [6]. Hasta el momento, la aplicación de corticosteroides tópicos ha resultado ser el tratamiento más común y eficaz, sin embargo, su uso prolongado puede aumentar el riesgo de recurrencia y efectos adversos como atrofia y adelgazamiento de la piel [7]. Por lo anterior, ha surgido el interés en desarrollar productos seguros y eficaces para el tratamiento de la dermatitis atópica, haciendo uso de extractos botánicos con actividad farmacológica reconocida como *Caléndula officinalis L.*

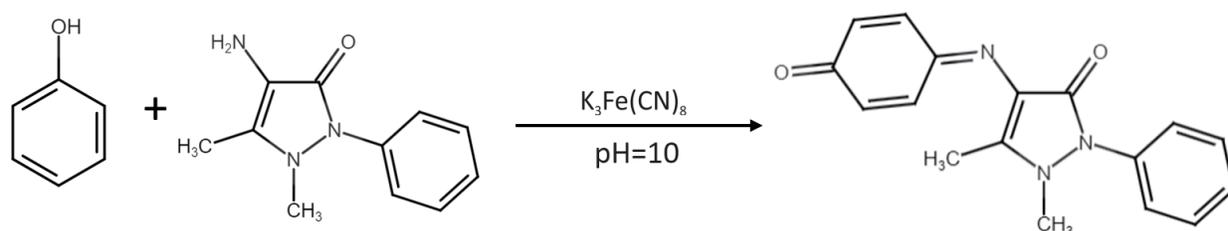
De acuerdo con investigaciones farmacológicas realizadas previamente, *Caléndula officinalis L.*, tiene un amplio espectro de propiedades biológicas, de las cuales algunas son particularmente promisorias para el desarrollo de futuras medicaciones basadas en preparaciones botánicas, para el presente estudio destaca su efecto antiinflamatorio y calmante en la piel [2]. Según Montané et. al (2020), los extractos acuosos de las flores de *Caléndula officinalis L.*, poseen propiedades farmacológicas como: Cicatrizante, antiinflamatorio, antibacteriano y tranquilizante, muchas de las cuales podrían estar relacionadas al contenido de compuestos fenólicos [1].

En su estudio, Montané y colaboradores realizaron la cuantificación de fenoles totales en un extracto blando de *Caléndula officinalis L.*, con el objetivo de validar el uso de este extracto como principio activo de una formulación destinada a la aplicación estomatológica. Por otro lado, en 2004, Pommier y colaboradores evaluaron el efecto de la aplicación tópica de un ungüento de *Caléndula officinalis L.* en el tratamiento de dermatitis aguda durante la radioterapia para el cáncer de seno. Los resultados mostraron que la aparición de dermatitis aguda de grado 2 o superior fue de 41 % frente a 63 % con el uso del ungüento de *Caléndula Officinalis L.* y trolamina como medicamento de referencia, además se observó que los pacientes que recibieron caléndula experimentaron menos interrupciones en la radioterapia y una reducción significativa del dolor inducido por la radiación [8].

Recientemente, en 2023 Garrido y colaboradores evaluaron el efecto de diversas formulaciones de crema emulsionadas de aceite en agua utilizando el extracto acuoso de flores de Caléndula como ingrediente farmacéutico activo en concentraciones del 5%, 10% o 30% (p/p). El estudio se centró en evaluar su efecto tópico sobre el comportamiento relacionado con el dolor en un modelo de dolor persistente en ratas. Los resultados mostraron que la crema de Caléndula al 10% fue la más efectiva, con una inhibición del 28% [9]. Las investigaciones citadas anteriormente, han generado interés en desarrollar una formulación de crema tópica emoliente a base del extracto acuoso de *Caléndula officinalis L.*, destinada al tratamiento emoliente y calmante de la dermatitis atópica.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, que comparten una estructura molecular similar, caracterizada por la presencia de uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo enlazado. Su diversidad estructural da lugar a un amplio grupo de

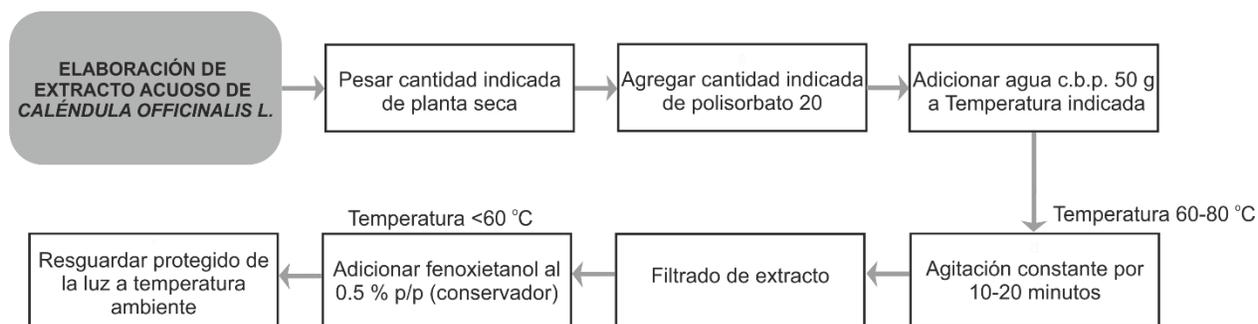
moléculas pertenecientes a este grupo, que van desde estructuras simples hasta compuestos complejos. Diversos estudios han buscado identificar compuestos fenólicos con propiedades farmacológicas de interés, tales como capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana, antineoplásica y anticancerígena. Estas propiedades posicionan a los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos, como ingredientes valiosos para el desarrollo de nuevos productos en la industria farmacéutica, cosmética y otras áreas [10]. La presente investigación tiene como objetivo el determinar la composición química cuantitativa de fenoles totales en el extracto acuoso de flores de *Caléndula officinalis* L., para confirmar su potencial para ser utilizado en una formulación de crema tópica destinada al tratamiento emoliente y calmante de dermatitis atópica. Una alternativa para la cuantificación de compuestos fenólicos es el método del 4-aminoantipirina, procedimiento establecido por la normatividad mexicana para la determinación de fenoles totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Este método se basa en el acoplamiento oxidativo del grupo fenol con 4-aminoantipirina en presencia de un agente oxidante alcalino, en este caso, ferricianuro de potasio, a un pH de 10, formando una quinona-imina N-sustituida de color rojo. La quinona-imina N-sustituida presenta una longitud de onda máxima de absorción a 474 nm, que es susceptible de detectar espectrofotométricamente en la región del visible [3].



**Figura 1.** Acoplamiento oxidativo de la quinona-imina [4-(p-benzoquinonaimina)-antipirina] [11].

## 2. Experimental

Para la obtención del extracto de *Caléndula officinalis* L., se seleccionó el método de extracción acuosa por decocción, debido al grado de sensibilidad característica de la piel que padece dermatitis atópica, además de la facilidad de incorporar un extracto acuoso en una formulación en crema. Siguiendo la tendencia de la sustitución de disolventes tóxicos o contaminantes, por alternativas ecológicas, se propone el diseño de sistemas de extracción acuosa con la incorporación de cosolventes comúnmente utilizados en la industria cosmética, lo que permite obtener extractos listos para usar e integrarse directamente en formulaciones cosméticas [12]. El trabajo se realizó a partir de flores secas provenientes de Egipto, adquiridas a través de un proveedor nacional de materia prima para la industria cosmética.



**Figura 2.** Procedimiento utilizado para elaboración del extracto acuoso de *Caléndula officinalis L.*

Para la optimización del proceso de extracción se trabajó sobre un diseño factorial fraccionado  $2^4$  con dos 2 puntos centrales y 7 grados de libertad, de acuerdo con la tabla 1 se elaboraron 18 corridas experimentales etiquetadas como lotes de extracto acuoso de flores de *Caléndula officinalis L.*

**Tabla 1.** Experimentos del diseño factorial  $2^4$  para la obtención del extracto acuoso de flores de *Caléndula officinalis L.*

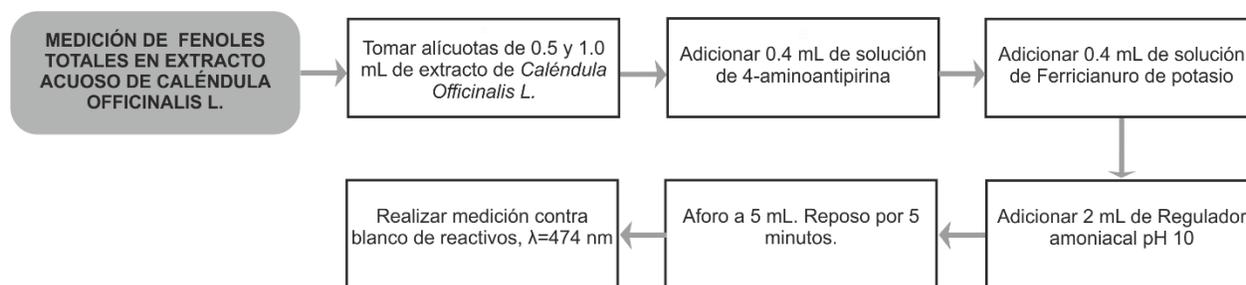
Experimento	Tiempo de decocción (Minutos)	Concentración de Polisorbato 20 (%peso)	Temperatura (°C)	Peso de planta (%peso)
1	20	3	80	2.0
2	10	3	60	0.5
3	20	1	80	0.5
4	10	1	80	2.0
5	10	3	60	2.0
6	20	3	60	2.0
7	10	1	60	0.5
8	20	3	60	0.5
9	20	1	80	2.0
10	20	1	60	2.0
11	10	3	80	0.5
12	20	1	60	0.5
13	15	2	70	1.25
14	15	2	70	1.25
15	10	1	80	0.5
16	20	3	80	0.5
17	10	1	60	2.0
18	10	3	80	2.0

En el diseño factorial fraccionado  $2^4$  con dos 2 puntos centrales y 7 grados de libertad se evaluaron 4 factores como lo indica la tabla 2.

**Tabla 2.** Factores evaluados en su nivel alto y bajo.

Factores	Bajo	Alto	Unidades
A: Tiempo decocción	10	20	Minutos
B: Concentración de polisorbato 20	1	3	% peso
C: Temperatura	60	80	°C
D: Peso de planta	0.5	2	% peso

Para la determinación cuantitativa de fenoles totales, se utilizó el método de la 4-aminoantipirina, que se basa en el acoplamiento oxidativo del grupo fenol con 4-aminoantipirina en solución alcalina, para formar una quinona-imina N-sustituida de color rojo, susceptible de detectar espectrofotométricamente a longitud de onda máxima de 474 nm [3]. El procedimiento utilizado para analizar cada muestra de extracto se describe en la Figura 3.



**Figura 3.** Procedimiento utilizado para la cuantificación de fenoles totales en el extracto acuoso de *Caléndula officinalis L.*

### 3. Resultados y Discusión

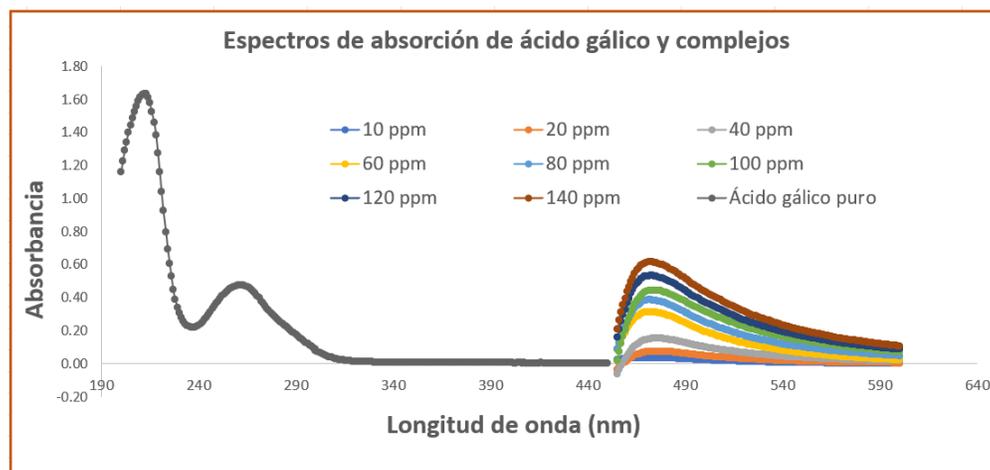
Se realizó el análisis de diseño de experimentos mediante el software Statgraphics Centurion XVI.I., el cual mostró que los factores de temperatura y peso de planta son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95.0% de acuerdo con la tabla 3.

El análisis del diseño de experimentos también establece los parámetros óptimos para maximizar la extracción de fenoles totales, siendo los siguientes: Tiempo de decocción 20 minutos, Concentración de polisorbato 20: 1 % p/p, Temperatura 80 °C, Peso de planta: 2 % p/p.

La ecuación polinomial con  $r^2 = 0.9936$  y su modelo ajustado se representa de acuerdo a la ecuación 1:

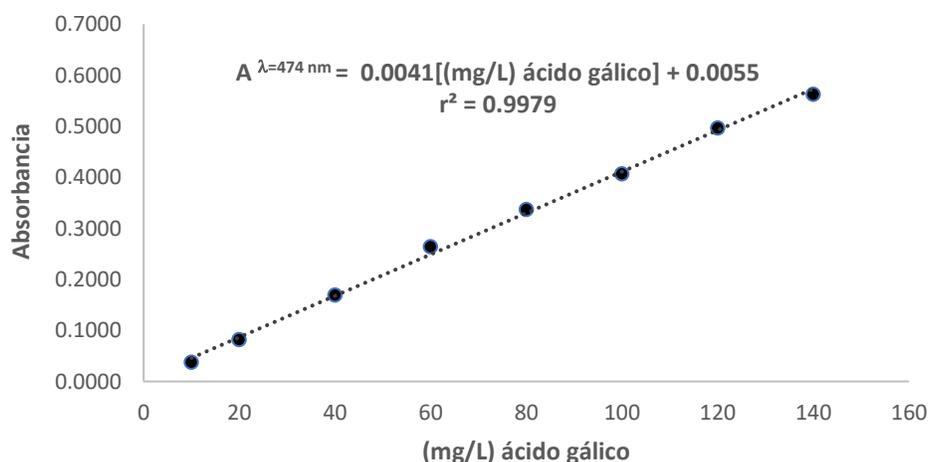
$$\begin{aligned}
 \text{Fenoles totales} = & -0.802 + 0.130 * A - 0.0501 * B + 0.001 * C \mp 1.227 * D - 0.0270 * A * B - 0.001 * A * C \\
 & + 0.007 * A * D + 0.007 * B * C - 0.17 * B * D + 0.046 * C * D
 \end{aligned}
 \quad (1)$$

Para determinar la longitud de onda máxima de absorción se realizaron los espectros de absorción de la formación del compuesto 4-(p-benzoquinonaimina)-antipirina, utilizando al ácido gálico como estándar primario, en la Figura 4 se observa que la longitud máxima de absorción es de 474 nm.



**Figura 4.** Espectros de absorción de ácido gálico y acoplamiento oxidativo de la quinona-imina [4-(p-benzoquinonaimina)-antipirina]

En la Figura 5 se representa la elaboración de la curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar, en un intervalo de concentración que va de 10 a 140 mg/L. La ecuación de regresión lineal obtenida es de  $A_{\lambda=474 \text{ nm}} = 0.0041[(\text{mg/L}) \text{ ácido gálico}] + 0.0055$  con un coeficiente de regresión lineal de  $r^2 = 0.9979$ .

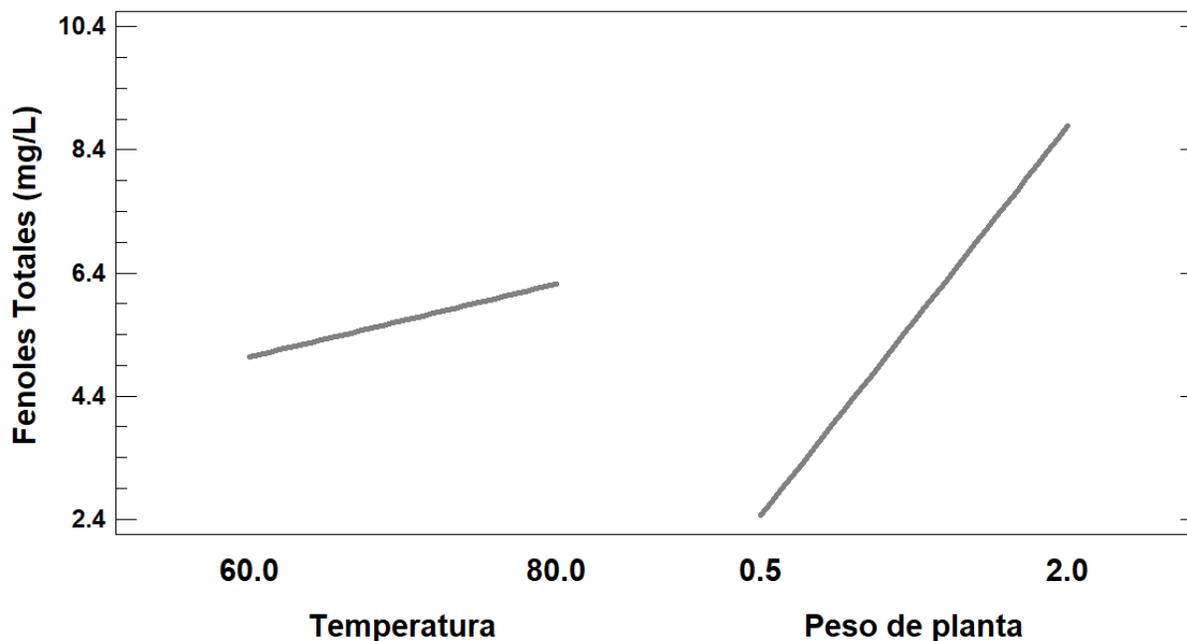


**Figura 5.** Curva de calibración utilizado el estándar de ácido gálico

**Tabla 3.** Análisis de Varianza para contenido de fenoles totales (mg/L)

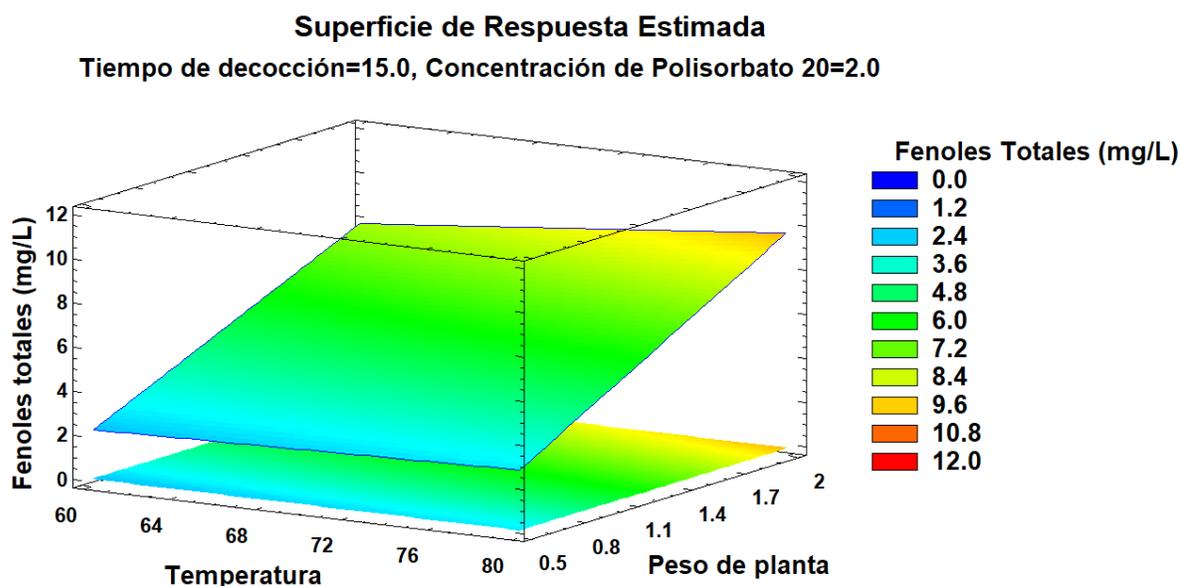
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: Tiempo decocción	0.114	1	0.114	0.74	0.4187
B: Concentración de polisorbato 20	0.429	1	0.429	2.77	0.1399
C: Temperatura	5.641	1	5.641	36.45	0.0005
D: Peso de planta	160.314	1	160.314	1035.90	0.0000
AB	0.292	1	0.292	1.89	0.2118
AC	0.037	1	0.037	0.24	0.6396
AD	0.010	1	0.010	0.06	0.8066
BC	0.083	1	0.083	0.54	0.4872
BD	0.260	1	0.260	1.68	0.2359
CD	1.921	1	1.921	12.41	0.0097
Error total	1.083	7	0.155		
Total (corr.)	170.184	17			

Los efectos principales son representados en la Figura 6, donde se puede apreciar la relación entre los factores estadísticamente significativos, con un valor óptimo de 80 grados centígrados y 2.0 %p de planta, para maximizar la obtención de Fenoles Totales.



**Figura 6.** Gráfico de efectos principales para contenido de fenoles totales (mg/L)

En el gráfico de superficie de respuesta estimada, de acuerdo con la Figura 7, se puede apreciar una estimación de 8.4-9.6 mg/L de contenido de fenoles totales en el extracto acuoso en la obtención, al utilizar los parámetros óptimos para los factores Temperatura y Peso de planta.



**Figura 7.** Gráfico de superficie de respuesta estimada

#### Determinación de la linealidad del método

Para la determinación de la linealidad del método (ver tabla 4) se debe reportar la cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados se calcula el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC\beta_1$ ), el intervalo de confianza para la ordenada en el origen ( $IC\beta_0$ ), y el coeficiente de variación de la regresión ( $CV_{y/x}$ ), los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método se determinan en base a las ecuaciones 2 y 3, [13].

LD con base en la curva de calibración y desviación estándar de la regresión ( $S_{y/x}$ ).

$$LD = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1} \quad (2)$$

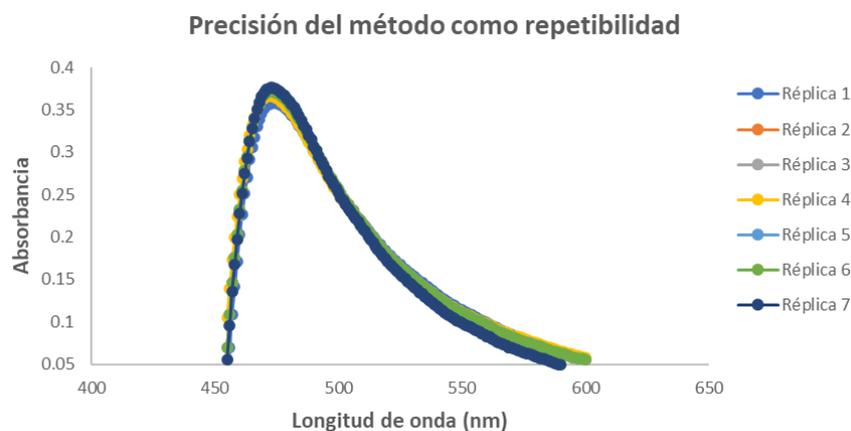
LC con base en la curva de calibración y desviación estándar de la regresión ( $S_{y/x}$ ).

$$LC = \frac{10 * S_{y/x}}{b_1} \quad (3)$$

**Tabla 4.** Linealidad del método de la 4-aminoantipirina

Parámetro	Valor obtenido
Pendiente ( $b_1$ )	0.0041
Ordenada en el origen ( $b_0$ )	0.0055
Coefficiente de determinación lineal ( $r^2$ )	0.9979
Coefficiente de correlación lineal ( $r$ )	0.9989
Intervalo de confianza para la pendiente ( $IC\beta_1$ )	$0.0041 \pm 6.0E^{-05}$
Intervalo de confianza para la ordenada en el origen ( $IC\beta_0$ )	$0.0055 \pm 5.2E^{-03}$
Coefficiente de variación de la regresión ( $CV_{y/x}$ )	2.3
Límite de detección	5.6 mg/L ácido gálico
Límite de cuantificación	17.0 mg/L ácido gálico

Para la precisión del método expresado como repetibilidad en la determinación de fenoles totales, se prepararon siete estándares de ácido gálico a 90 mg/L realizado por triplicado, y los espectros de absorción de una réplica se muestra en la Figura 8. La variabilidad analítica se expresó en términos de desviación estándar relativa (% RSD). Para mayor precisión, los valores aceptables de RSD se consideran menores o iguales al 3%. Los porcentajes de concentración encontrados para las soluciones fortificadas estaban en el intervalo 98.7-102.3. Los valores de la distribución t para evaluar la precisión del método propuesto fueron inferiores a los valores de la distribución t crítica. Distribución  $t = 0.272$ ,  $gl = 20 \leq t \text{ crítica} = 2.086$ ,  $gl = 20$



**Figura 8.** Espectro de absorción de una repetición

#### 4. Conclusiones

Por medio del método descrito, se confirma la presencia de fenoles totales en el extracto acuoso de *Caléndula officinalis* L., por lo que se considera viable su incorporación en una formulación de crema emoliente para tratamiento de dermatitis atópica. Los resultados de la cuantificación mostraron un contenido de  $9.33 \pm 1.39$  mg equivalentes de ácido gálico por cada gramo de planta seca.

El diseño de experimentos mostró que los factores Temperatura y % peso de la planta son estadísticamente significativos, recomendando utilizar los valores altos de estos factores para maximizar la extracción de fenoles totales en el extracto acuoso.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Baja California (<https://ror.org/05xwqc167>) por su apoyo a través de la 23va. Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación a Cuerpos Académicos reconocidos ante PRODEP, con numero de proyecto 4295.

#### 6. Referencias

- [1] C. Montané Ojeda, D. Arias Ramos y I. Chil Núñez. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en un extracto blando de flores de *Calendula officinalis* Linn, *Orange Journal*, **2**, 3, 20-31 (2020).
- [2] S. I. Abdelwahab, M. M. Elhassan Taha, S. M. Elhassan Taha y A. Ahmed Alsayegh. Fifty-year of Global Research in *Calendula Officinalis* L. (1971–2021): A Bibliometric Study, *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, **2**, 4, 1-10 (2022).
- [3] E.G. Carrillo-Cedillo, M.P. Haro-Vázquez, G.C. Díaz Trujillo y M.P. Cañizares-Macías. Plackett-Burman Factorial Design for the Optimization of a Spectrophotometric Flow Injection Method for Phenol Determination in Tap and Bottled Water Using 4-Aminoantipyrine, *J. Mex. Chem. Soc.*, **58**, 2, 99-105 (2014).
- [4] S. López Vargas, E. Núñez Picado y G. Chaverri Padilla. Actualización en dermatitis atópica: líneas de tratamiento, *Revista Medica Sinergia*, **5**, 11, e596 (2020).
- [5] M. Rivas Calderón, L. Orozco Covarrubias y M. Saez de Ocariz. Atención y tratamiento integral de la dermatitis atópica, *Acta Pediátr Mex*, **41**, 6, 286-292 (2020).
- [6] R. Arenas Guzmán, *Dermatología Atlas, diagnóstico y tratamiento*, 113 (2013)
- [7] V. K. Dey. Misuse of topical corticosteroids: A clinical study of adverse effects, *Indian Dermatology Online Journal*, **5**, 4, 436-440 (2014).
- [8] P. Pommier, F. Gómez, M.P. Sunyach, A. D'Hombres, C. Carrie, X. Montbarbon. Phase III Randomized Trial of *Calendula Officinalis* Compared With Trolamine for the Prevention of Acute Dermatitis During Irradiation for Breast Cancer, *Journal of clinical oncology*, **22**, 8, 1147-1453 (2004).

- [9] B. Garrido Suárez, G. Garrido, A. Bellma Menéndez, N. Merino, O. Valdés, N. De la Paz, A. Romero, L. Delgado, M. D. Fernández, O. Piñeros y R. Delgado Hernández. Topical Calendula officinalis L. inhibits inflammatory pain through antioxidant, anti-inflammatory and peripheral opioid mechanisms, *Journal of Integrative Medicine*, **21**, 1, 34-46 (2023).
- [10] E. Valencia Avilés, I. I. Figueroa, E. Sosa Martínez, M. C. Bartolomé Camacho, H. E. Martínez-Flores y M. E. García-Pérez. Polifenoles: Propiedades antioxidantes y toxicológicas, *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, **16**, 15-29 (2017).
- [11] C. Varadaraju, G. Tamiselvan, I. Enoch y P. Mosae Selvakumar. Phenol Sensing Studies by 4-Aminoantipyrine Method—A Review, *Organic and Medicinal Chemistry International Journal*, **5**, 2, 1-7 (2018)
- [12] K. M. Jeong, J. Ko, J. Zhao, Y. Jin, D. E. Yoo y S. Y. Han. Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products, *Journal of cleaner production*, **151**, 87-95 (2017).
- [13] M.A García, E. Soberón, M. Cortés, R. Rodríguez, J.L Herrera, A. Alcántara, A. Chárvel, R. Mota, A. Grazón. Métodos Analíticos. Guía de Validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. (2002).

# Síntesis de un hidrogel composite para la cuantificación de metales pesados presentes en matrices complejas

Gloria Lopez Flores<sup>a</sup>, María Elena Páez Hernández, Carlos Andrés Galán Vidal, Israel Samuel Ibarra Ortega, Irma Pérez Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Ciudad Universitaria, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo. México. C.P. 42076. Tel: +52 (771) 717 2000 ext 40100, e-mail: [iperez@uaeh.edu.mx](mailto:iperez@uaeh.edu.mx)

## Resumen

El plomo es un metal pesado que se encuentra asociado con diversos problemas de salud por lo que contar con tratamientos eficaces se ha convertido en una necesidad. Una de las técnicas empleadas es el uso de hidrogeles, los cuales son redes poliméricas tridimensionales altamente reticuladas que se utilizan como soporte para la eliminación de diversas especies químicas. Dentro de sus ventajas se encuentra la posibilidad de ser modificados mediante diversos materiales orgánicos y/o inorgánicos con la finalidad de mejorar su estabilidad y capacidad de adsorción dando lugar a los hidrogeles composite (HC). Considerando esto, en el presente trabajo se presentan los resultados preliminares de la síntesis de un HC a base de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida modificado con partículas de aluminio para la adsorción de plomo presente en medios acuosos, logrando hasta un 55.9% de adsorción. Dentro de los parámetros evaluados se encuentra la morfología, el grado de hinchamiento, la cantidad de aluminio con la que se modifica el HC, la masa del hidrogel y el pH de la solución de plomo para finalmente emplearlo en una muestra simulada de una industria de producción de baterías mostrando ser una técnica simple, económica y amigable con el medio ambiente para la adsorción de plomo.

**Palabras clave.** *Hidrogel composite, plomo, partículas de aluminio*

## Abstract

Lead is a heavy metal that is associated with various health problems, making effective treatments a necessity. One of these techniques may be hydrogels, which are highly cross-linked three-dimensional polymer networks used to support the removal of various chemical species. Incorporating various organic and/or inorganic materials into hydrogels enhances their stability and absorption capacity. This produces composite hydrogels (HC). This study shows the first steps in making a hydrogel out of acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, and aluminum particles that can adsorb 55.9% lead. The evaluated parameters include morphology, swelling degree, aluminum quantity used for hydrogel modification, hydrogel mass, and the pH of the lead solution, which were then applied to a simulated sample from the battery manufacturing industry, demonstrating a simple, cost-effective, and environmentally friendly approach to lead adsorption.

**Keywords.** *Composite hydrogel, lead, aluminum particles.*

## 1. Introducción

El plomo es un metal pesado capaz de ocasionar graves problemas a la salud, como daños neurológicos, renales, reproductivos e incluso anemia, y en casos muy extremos puede llegar a la muerte [1]. Dentro de sus características principales se encuentran la persistencia, bioacumulación, biotransformación y alta toxicidad. Lo anterior provoca que se encuentren en los ecosistemas por largos periodos de tiempo ya que su degradación natural es imposible. Debido a su uso excesivo en diversas prácticas industriales y domésticas son considerados un problema actual y un desafío ambiental, por lo que su tratamiento se ha hecho indispensable [2].

Entre las técnicas disponibles, la adsorción emerge como una opción ampliamente utilizada debido a su versatilidad. La adsorción es un proceso superficial que implica la transferencia de moléculas de un fluido a una superficie sólida; su aplicación en la cuantificación de metales pesados ofrece diferentes ventajas como simplicidad operativa, bajo costo y capacidad de tratamiento a escala industrial [3].

Dentro de los adsorbentes que se han desarrollado en los últimos años se encuentran los hidrogeles, estos son redes poliméricas tridimensionales altamente reticuladas que se utilizan como soporte para la eliminación de diversas especies orgánicas como el fenol y el azul de metileno y algunas otras metálicas como el cobre y el cromo. Dentro de estos se encuentran los hidrogeles composite (HC) los cuales se forman mezclando polímeros de origen natural o sintético con la finalidad de proporcionarles una mayor estabilidad y un aumento en su capacidad de adsorción [4]. Lo anterior los convierte en una gran alternativa para ser empleados como adsorbentes que permitan la eliminación de diversas especies químicas.

De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se sintetizó mediante polimerización de radicales libres un HC de acrilamida como monómero, N,N'-metilenbisacrilamida como agente entrecruzante y partículas de aluminio que permita la eliminación de plomo en medios acuosos.

## 2. Experimental

### 2.1 Síntesis del hidrogel composite (HC)

Para la síntesis del hidrogel mediante radicales libres se preparó una solución con el 4 % $v/v$  de acrilamida ( $C_3H_5NO$ , Aldrich  $\geq 99\%$ ) y el 1.6 % $v/v$  de N,N'-metilenbisacrilamida ( $(CH_2CHCONH)_2CH_2$ , Aldrich  $\geq 98\%$ ). A esta solución se le adicionó el 3.2 % $v/v$  de persulfato de amonio ( $(NH_4)_2S_2O_8$ , Meyer  $\geq 98\%$ ) como catalizador de la reacción de polimerización. La mezcla anterior se calentó a 65 °C por 30 min y posteriormente a 25 °C por un intervalo de 16 h obteniendo así el hidrogel (HG) [5]. El HG fue lavado con agua desionizada en repetidas ocasiones y cortado en cubos de aproximadamente 4 mm de largo para posteriormente ser secados a 65°C por 2 h.

Una vez realizado lo anterior, se prosiguió a la formación de las partículas de aluminio in situ. Para lograrlo se pusieron en contacto 3 g de HG seco con 25 mL de una solución de nitrato de aluminio 0.05  $mol/L$  ( $Al_2(SO_4)_3$ , Meyer 98%) por un lapso de 3 días para que pueda absorber los iones aluminio presentes en la solución. Posteriormente, el hidrogel se puso en contacto con una

solución 0.5 mol/L de ácido cítrico ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , JT Baker 100.5%) por un intervalo de 2 h para reducir las partículas de aluminio obteniéndose así el hidrogel composite (HC) [6].

El HC obtenido fue caracterizado por microscopía electrónica de barrido (SEM) con un equipo JEOL JSM-6300 empleando un recubrimiento de oro un potencial de 20 KV a 2000x. Para determinar el grado de hinchamiento (Ecuación 1) se sumergieron 0.01 g de HC seco en 5 mL de agua por un lapso de 24 h [5].

$$\text{Porcentaje de hinchamiento (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

Donde  $w_s$  y  $w_d$  son los pesos del hidrogel hinchado y seco respectivamente.

## 2.2 Pruebas de adsorción

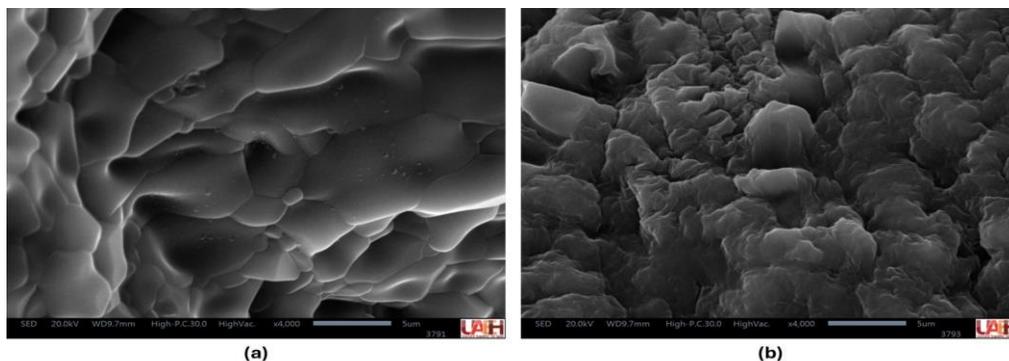
El HC resultante de la etapa anterior, se puso en contacto con 10 mL de una solución acuosa que contenía 5 mg/L de Pb con la finalidad de conocer la influencia que tienen diversos parámetros como el pH, la masa y tiempo de contacto en el proceso de adsorción. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y el análisis de plomo se realizó por espectroscopia de absorción atómica en flama.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Caracterización del hidrogel

#### Morfología

La caracterización del hidrogel se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) tal y como se muestra en la Figura 1. Se puede observar que el HG de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida forman una red tridimensional (Figura 1a), mientras que el HC muestra la deposición de las partículas de aluminio en la superficie con lo que se puede asegurar su modificación (Figura 1b).

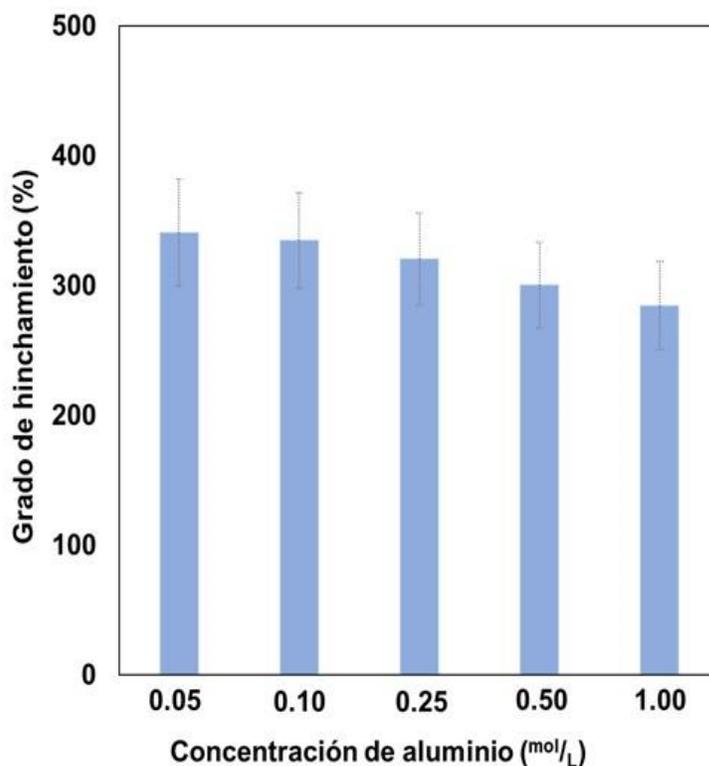


**Figura 1.** Morfología del hidrogel compuesto a) Hidrogel de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida (HG). b) Hidrogel modificado con una solución 0.05 mol/L de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (HC)

### Grado de hinchamiento

Una forma sencilla y económica de conocer cómo es que se encuentra conformado un hidrogel es la determinación del grado de hinchamiento. El grado de hinchamiento se relaciona directamente con el grado de reticulación, las propiedades mecánicas, tasa de degradación del hidrogel y en este caso, la inmovilización de las partículas de aluminio dentro del hidrogel [7].

Para lograr lo anterior se evaluó el grado de hinchamiento del hidrogel después de ponerlo en contacto con una solución de Ag(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en un intervalo de 0.05 M a 1M, obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 2.



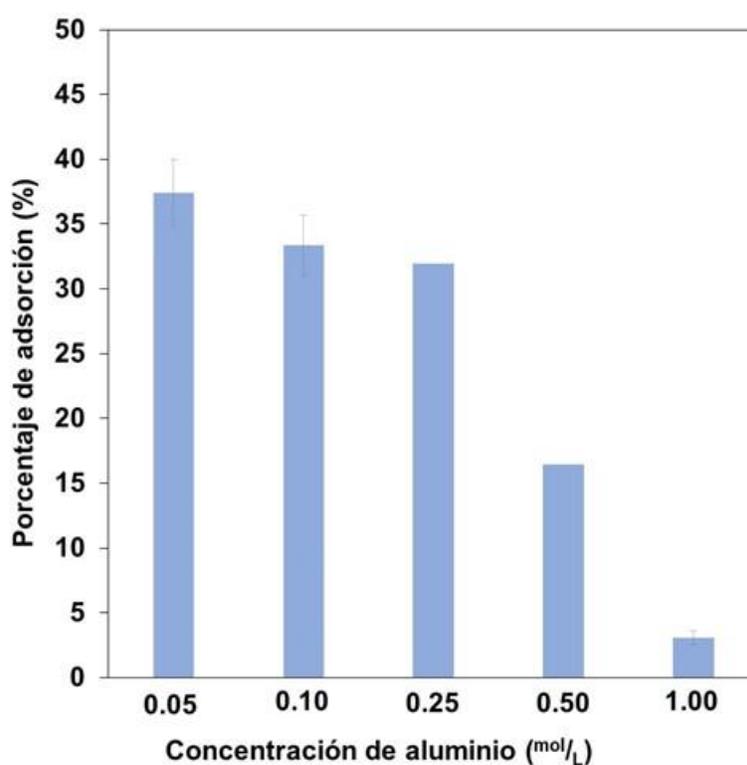
**Figura 2.** Grado de hinchamiento del HC. Tiempo de hinchamiento 24 h.

Como se puede observar en la Figura 2, conforme aumenta concentración de aluminio que se pone en contacto con el hidrogel el grado de hinchamiento disminuye. Lo anterior puede atribuirse a que el aluminio actúa como entrecruzante, por lo que una mayor cantidad de este en el HC disminuye su capacidad de hinchamiento [8].

### 3.2 Pruebas de adsorción

#### Influencia de la concentración de aluminio

Ya que el aluminio inmovilizado en el hidrogel puede ocasionar un mayor entrecruzamiento y modificar así el proceso de adsorción, se evaluó el efecto de la concentración de nitrato de aluminio que se pone en contacto con el HG en un intervalo de 0.05-1 M. Acorde a los resultados de la Figura 3 se puede observar que a mayor concentración de aluminio el porcentaje de adsorción de plomo decrece, esto puede deberse a que al incrementar el grado de entrecruzamiento la permeación en el HC es menor [9]. De acuerdo a lo anterior, se utilizó para experimentos posteriores una concentración de 0.05M de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ .



**Figura 3.** Porcentajes de adsorción de acuerdo con la concentración de nitrato de aluminio Condiciones experimentales: 0.1 g de HC, 5  $\text{mg/L}$  Pb, pH=6.9, tiempo de contacto 2 h

#### Influencia del pH

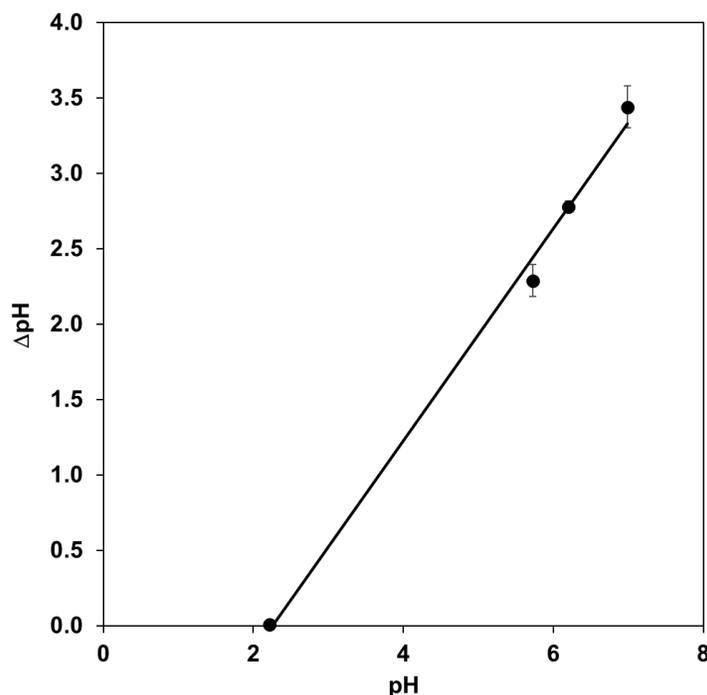
Ya que el pH está relacionado con las propiedades superficiales del HC y las diversas especies que se pueden encontrar en el sistema se llevó a cabo la evaluación de su influencia en el proceso de adsorción. La Tabla 1 muestra que el mejor porcentaje de adsorción se presenta a un pH de 7, lo anterior se puede deber a que en medios ácidos los iones  $\text{H}^+$  entran en competencia con los iones  $\text{Pb}^{2+}$  por los diversos sitios activos del hidrogel, mientras que a condiciones básicas el plomo

tiende a formar hidroxocomplejos ( $\text{Pb}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_2$  o  $\text{Pb}(\text{OH})_3^-$ ) los cuales presentan menor afinidad con el HC [10]. Es importante mencionar que a un pH de  $\sim 1$  la adsorción es muy baja, esto puede ser atribuido a que, de acuerdo al valor de carga cero (Figura 4), en valores de pH inferiores a  $\sim 2.2$  la carga de la superficie del HC es positiva lo cual produce una repulsión entre el analito y el material lo cual dificulta el proceso de adsorción [11].

**Tabla 1.** Efecto del pH en el proceso de adsorción. Condiciones experimentales: 0.1 g de HC, 5 mg/L Pb, tiempo de contacto 2 h

pH	Porcentaje de Adsorción (%) <sup>*</sup>
1.3	1.76 (6.87)
3.1	19.05 (7.63)
4.0	33.21 (10.54)
5.5	36.77 (6.50)
6.9	37.40 (2.46)

<sup>\*</sup>CV entre paréntesis



**Figura 4.** Punto de carga cero para el HC. Condiciones experimentales: 0.1 g de HC, en contacto con 5 mL de 0.03 mol/L NaCl por un tiempo de 48 h.

### Influencia de masa de hidrogel composite

Otro de los parámetros que influye en el proceso de adsorción es la cantidad de masa empleada. Acorde a esto, masas entre 0.05 y 1 g fueron evaluadas. De acuerdo a los resultados de la Tabla 2 se puede observar que un incremento en la masa permite un mayor porcentaje de adsorción de plomo lo cual puede atribuirse a que con una mayor cantidad de adsorbente el área y la cantidad de sitios activos disponible aumenta, sin embargo esta tendencia se pierde cuando se emplea 1 g de HC lo cual puede ser ocasionado por la presencia de sitios de insaturación y la agregación de las partículas ocasionada por la cantidad de adsorbente impidiendo el incremento del área superficial [12].

**Tabla 2.** Efecto de la masa en el proceso de adsorción. Condiciones experimentales: 5 mg/L Pb, pH= 6.9 tiempo de contacto 2 h

Masa (g)	Porcentaje de Adsorción (%)*
0.05	20.80 (2.51)
0.10	37.40 (2.46)
0.20	50.63 (2.02)
0.30	52.68 (1.61)
0.50	55.90 (1.54)
1.00	56.74 (2.24)

\*CV entre paréntesis

### Prueba en agua residual simulada

Finalmente, la evaluación del HC se realizó en un agua residual simulada proveniente de la industria de producción de baterías conforme a lo reportado por Vergili et al. [13]. El agua fue dopada con: Pb, 4.5 mg/L, Mn 0.01 mg/L, Ni 0.097 mg/L, Cu 0.083 mg/L, Cr, 0.070 mg/L Zn, 0.029 mg/L, Ag 0.002 mg/L, Cd 0.003 mg/L. Los resultados arrojaron un porcentaje de extracción del  $56.11 \pm 3.62\%$  del Pb en solución, mientras que con un sistema ideal se obtuvo un  $55.89 \pm 2.76\%$ , sin que se tengan diferencias significativas entre ambos valores. Lo anterior permite observar que no existe una interferencia de los diferentes iones metálicos presentes en la muestra para la adsorción de plomo.

## 4. Conclusiones

De las pruebas preliminares realizadas en la síntesis y evaluación del hidrogel composite de acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida modificado con partículas de aluminio, se puede concluir que es posible llevar a cabo la adsorción de plomo presente en matrices complejas como lo es el agua residual, proveniente de la industria productora de baterías con un porcentaje de adsorción de 59.56%. Para lograr lo anterior es necesario fijar las condiciones de trabajo en un pH~7, 0.5 g de hidrogel y 2h de contacto en la muestra, mientras que la modificación del hidrogel debe realizarse con concentraciones bajas de aluminio ( $0.05 \text{ mol/L}$ ) ya que este puede actuar como agente entrecruzante dificultando la adsorción del plomo.

## 5. Referencias

- [1] H. M. Alraddadi, T. M. Fagieh, E. M. Bakhsh, K. Akhtar, S. B. Khan, S. A. Khan, E. Bahaidarah, & T. A. Homdi. Adsorptive removal of heavy metals and organic dyes by sodium alginate/coffee waste composite hydrogel. *International Journal Of Biological Macromolecules*, **247**, 125708 (2023).
- [2] D. Rodríguez. Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MEDISAN*, **21**(12), 3372-3385 (2017).
- [3] M. Alaqrbeh. Adsorption Phenomena: Definition, Mechanisms, and Adsorption Types: Short Review. *RHAZES: Green And Applied Chemistry*, **13**, 43-51 (2021).
- [4] S. Maji, & H. Lee. Engineering Hydrogels for the Development of Three-Dimensional In Vitro Models. *International Journal Of Molecular Sciences*, **23**[5], 2662 (2022).
- [5] Y. M. Mohan, T. Premkumar, K. Lee, & K. E. Geckeler. Fabrication of Silver Nanoparticles in Hydrogel Networks. *Macromolecular Rapid Communications*, **27** (16), 1346-1354 (2006).
- [6] N. Sahiner, H. Ozay, O. Ozay, & N. Aktas. A soft hydrogel reactor for cobalt nanoparticle preparation and use in the reduction of nitrophenols. *Applied Catalysis. B, Environmental*, **101** (1-2), 137-143 (2010).
- [7] J. Sievers, K. Sperlich, T. Stahnke, C. Kreiner, T. Eickner, H. Martin, R. F. Guthoff, M. Schünemann, S. Bohn, & O. Stachs. Determination of hydrogel swelling factors by two established and a novel non-contact continuous method. *Journal Of Applied Polymer Science*, **138** (18) (2020).
- [8] S. Tang, J. Yang, L. Lin, K. Peng, Y. Chen, S. Jin, & W. Yao. Construction of physically crosslinked chitosan/sodium alginate/calcium ion double-network hydrogel and its application to heavy metal ions removal. *Chemical Engineering Journal*, **393** (124728), 1-11 (2020).
- [9] J. Wu, J. Lin, G. Li, & C. Wei. Influence of the COOH and COONa groups and crosslink density of poly(acrylic acid)/montmorillonite superabsorbent composite on water absorbency. *Polymer International*, **50** (9), 1050-1053 (2001).
- [10] M. Sanyang, W. A. W. A. K. Ghani, A. Idris, & M. B. Ahmad. Hydrogel biochar composite for arsenic removal from wastewater. *Desalination And Water Treatment*, **57** (8), 3674-3688 (2014).
- [11] M.M. Jacob, M. Ponnuchamy, A. Kapoor, P. Sivaraman, P. Bagasse based biochar for the adsorptive removal of chlorpyrifos from contaminated water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **8** (4), 1-9 (2020).

[12] S. L. Ching, M. S. Yusoff, H. A. Aziz, & M. Umar. Influence of impregnation ratio on coffee ground activated carbon as landfill leachate adsorbent for removal of total iron and orthophosphate. *Desalination*, **279** (1-3), 225-234 (2011).

[13] I. Vergili, Z. B. Gönder, Y. Kaya, G. Gürdağ, & S. Çavuş. Sorption of Pb (II) from battery industry wastewater using a weak acid cation exchange resin. *Process Safety And Environmental Protection*, **107**, 498-507 (2017).

## Extracción de Au(III) con sílices funcionalizadas con grupos metilimidazolio

Karla Gabriela Rodríguez Becerra, Adriana Galván Cabrera, Liliana Hernández Perales, Miguel Ángel Vázquez Guevara, Merced Martínez Rosales, Ricardo Navarro Mendoza\*

Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Cerro de La Venada s/n, Col. Pueblito de Rocha, CP 36040. Guanajuato, Gto., México.

Tel.+52(473)7320006 Ext:5410. E-mail\*: [navarm@ugto.mx](mailto:navarm@ugto.mx)

### Resumen

La alta demanda y valor del oro han llevado al desarrollo de métodos para recuperarlo de desechos electrónicos, conocidos como minas urbanas. Los metales preciosos y metales base son lixiviados y para recuperarlos, se necesitan procesos de separación eficientes y selectivos. Una alternativa es utilizando sílices mesoporosas funcionalizadas con líquidos iónicos (LIs). Este trabajo presenta los resultados del estudio de la recuperación de Au(III) de soluciones de HCl, utilizando sílices denominadas MCF (espuma de sílice mesocelular) funcionalizadas con grupos metilimidazolio (MIM). El contacto con agua provoca la pérdida parcial del MIM. Se evaluó el efecto del tiempo de funcionalización (24 o 72 h) y el solvente de lavado (dicloroetano: DCE o tolueno: PhMe), sobre la estabilidad de los materiales y su eficiencia de recuperación de Au(III), antes y después de ser tratados con agua. La eficacia del M24-DCE en la recuperación de Au(III) fue 88.7%, la cual disminuyó a 78.0% después del tratamiento con agua. Al aumentar el tiempo de funcionalización y lavar el material con PhMe (M72-PhMe), se observó mejor funcionalización y menor pérdida del LI, obteniendo extracciones similares de Au(III), antes (88.4%) y después del tratamiento con agua (82.9%), confirmando un enlace MCF-MIM más estable.

**Palabras clave.** *Extracción de oro, Sílice funcionalizada, Metilimidazolio.*

### Abstract

The high demand and value of gold have led to the development of methods to recover it from electronic waste, known as urban mines. Precious and base metals are leached and to recover them, efficient and selective separation processes are needed. An alternative is using mesoporous silicas functionalized with ionic liquids (ILs). This work presents the results of the study of Au(III) recovery from HCl solutions using silicas called MCF (mesocellular silica foam) functionalized with methylimidazolium groups (MIM). The contact with water causes partial loss of MIM. The effect of functionalization time (24 or 72 h) and washing solvent (dichloroethane: DCE or toluene: PhMe) on the material's stability and the Au(III) recovery efficiency was evaluated, before and after treatment with water. The efficacy of M24-DCE in recovering Au(III) was 88.7%, which decreased to 78% after treatment with water. By increasing the functionalization time and washing the material with PhMe (M72-PhMe), improved functionalization and less IL loss were observed, obtaining similar Au(III) extractions before (88.4%) and after water treatment (82.9%), confirming a more stable MCF-MIM bond.

**Keywords.** *Gold extraction, Functionalized silica, Methylimidazolium*

## 1. Introducción

El oro es ampliamente utilizado en sectores como la electrónica, la industria aeroespacial y la catálisis, gracias a su excelente conductividad, estabilidad química y capacidad catalítica. Sin embargo, la creciente escasez de recursos naturales ha generado una crisis de suministro de oro. Al mismo tiempo, la rápida actualización de dispositivos electrónicos ha provocado una gran cantidad de desechos electrónicos. En 2019, se generaron 53.6 millones de toneladas de estos desechos, aumentando 2 millones de toneladas por año. Estos desechos contienen una cantidad de oro significativamente mayor que los minerales tradicionales, lo que hace que su recuperación sea económicamente viable. A pesar de esto, solo se recicla el 17.4% de los desechos electrónicos debido a que las tecnologías actuales no son lo suficientemente eficientes. Por lo tanto, es crucial desarrollar métodos más eficientes para recuperar el oro de los desechos electrónicos [1,2].

Hoy en día, existen varias técnicas para recuperar oro, como la adsorción, la precipitación química, la separación por membranas y la extracción por solventes. Entre ellas, la adsorción se destaca por su simplicidad y alta eficiencia. Se han utilizado diversos materiales, como las estructuras metalorgánicas (MOF), estructuras orgánicas covalentes (COF), carbón activado y resinas de intercambio iónico. Sin embargo, estos materiales tienen desventajas como inestabilidad en ambientes ácidos, alto costo, lenta adsorción y baja reutilización, lo que dificulta su aplicación industrial. Por ello, es esencial seguir investigando nuevos materiales que sean más resistentes, económicos y eficientes [2].

Los materiales mesoporosos ordenados, con su extensa área superficial, alta porosidad y tamaños de poro bien definidos, son ideales para esta tarea. Asimismo, el interés en desarrollar estos materiales funcionalizados con líquidos iónicos (LI) para aplicaciones de adsorción está en constante crecimiento [3].

Los líquidos iónicos son sales orgánicas líquidas formadas por un catión orgánico y un anión, que puede ser orgánico o inorgánico. Debido a las propiedades de sus iones, estos compuestos químicos se adaptan fácilmente a distintos campos de aplicación, como la extracción de iones metálicos de soluciones acuosas, donde el mecanismo más comúnmente propuesto es el intercambio iónico [4]. El líquido iónico Cyphos IL 101 (cloruro de trihexiltetradecilfosfonio,  $L^+Cl^-$ ) soportado en resinas macroporosas sintéticas ha sido ampliamente estudiado para la extracción de Au(III) y otros metales. La extracción se realiza mediante un proceso de intercambio iónico de acuerdo con la siguiente reacción [5]:



Actualmente, se está investigando una alternativa prometedora para hacer más eficiente el proceso de adsorción de oro, haciendo uso de la sílice denominada MCF (espuma de sílice mesocelular) funcionalizada con el líquido iónico cloruro de 1-propiltrimetoxisilano-3-metilimidazolio (MIM), donde el ion cloruro ( $Cl^-$ ) es el anión y el ion del derivado de imidazolio es el catión ( $L^+$ ). Los resultados preliminares muestran que este compuesto tiene una alta afinidad por el complejo de oro  $AuCl_4^-$ , lo cual facilita el proceso de intercambio iónico.

Originalmente, en un estudio previo [6], la funcionalización se llevó a cabo poniendo a reaccionar la sílice MCF con el MIM, durante 24 h y después se lavó con diclorometano (DCM), para eliminar el exceso de MIM sin reaccionar. En dicho estudio, el material se caracterizó mediante fisisorción de nitrógeno (BET), espectroscopía infrarroja (FTIR), resonancia magnética nuclear de estado sólido (NMR), análisis termogravimétrico (TGA) y microscopía electrónica de barrido (SEM), entre otras técnicas, mostrando que la sílice MCF es efectivamente funcionalizada con el MIM [6]. La extracción de Au(III) con estos materiales fue muy rápida y eficiente. Sin embargo, los materiales presentan una rápida disminución de su eficiencia de extracción después de estar en contacto con agua y con soluciones de HCl 0.01, 0.1 y 1 M. Para tratar de entender las causas de la pérdida de eficiencia de extracción de los materiales, se realizó un estudio de los materiales antes y después de ser tratados con agua, mostrando que parte del MIM se pierde al poner en contacto el material con el agua. La pérdida del líquido iónico se evaluó mediante fisisorción de nitrógeno (BET), mostrando cambios en las propiedades texturales de los materiales (área superficial y porosidad). Se observó además la presencia de residuos orgánicos oleosos después de evaporar el agua utilizada para el tratamiento de los materiales. Como una alternativa para reducir la pérdida del líquido iónico, se propuso aumentar los tiempos de funcionalización y analizar el impacto del solvente de lavado en la estabilidad del material. Lo anterior con el propósito de fortalecer la unión entre la sílice MCF y el MIM y eliminar de manera más eficiente el MIM sin reaccionar.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de recuperación de Au(III) con los materiales preparados, con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones de síntesis: tiempo de funcionalización (24 o 72 h) y solvente de lavado (dicloroetano: DCE o tolueno: PhMe), sobre la velocidad y capacidad de extracción de los materiales, antes y después de ser tratados con agua.

## 2. Experimental

### 2.1. Materiales y reactivos

Para la síntesis de la sílice MCF, se emplearon óxido de polietileno-óxido de polipropileno-óxido de polietileno (Pluronic P123), Sigma-Aldrich, tetraetilortosilicato (TEOS), Sigma-Aldrich y mesitileno, Sigma-Aldrich. La preparación del líquido iónico incluyó N-metilimidazol, Sigma-Aldrich y cloropropiltrimetoxisilano, Sigma-Aldrich. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico: ácido clorhídrico al 37% (HCl), Karal, ácido tetracloroáurico trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 49.0\%$ ), Sigma-Aldrich, tolueno (PhMe), Sigma-Aldrich, dicloroetano (DCE), Sigma-Aldrich, diclorometano (DCM), Sigma-Aldrich, etanol y membranas de filtración Durapore® PVDF, tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ , diámetro 47 mm.

### 2.2. Equipo utilizado

Los equipos empleados fueron: balanza analítica marca RADWAG, incubadora orbital INO650V-7, marca SEV, con agitación tipo ping pong y control de temperatura, espectrofotómetro UV-Visible marca VARIAN modelo Cary 50 Probe, analizador de área superficial y porosidad marca Micromeritics, ASAP 2010, horno Air performance marca Dynamica.

### 2.3. Funcionalización de la sílice MCF con el líquido iónico

Para la síntesis de MCF y del líquido iónico se siguió el procedimiento reportado por Galván [6]. La síntesis del material mesoporoso MCF se llevó a cabo utilizando Pluronic P123, mesitileno y tetraetilortosilicato (TEOS), mientras que la preparación del líquido iónico se realizó empleando N-metilimidazol y cloropropiltrimetoxisilano. La funcionalización del MCF, que implica la unión covalente del líquido iónico al material, se realizó también con base en lo reportado por Galván [6], pero se realizaron modificaciones para evaluar el efecto de dos parámetros experimentales: el tiempo de funcionalización (24 o 72 h) y el solvente de lavado final (DCE o PhMe). El procedimiento para la funcionalización consistió en colocar 1.0 g de sílice mesoporosa (MCF), 0.50 g del líquido iónico y 25 mL de PhMe anhidro en un matraz balón de vidrio, seco, de 50 mL equipado con un agitador magnético. La mezcla de reacción se sometió a reflujo en una mantilla de calentamiento con agitación constante durante el tiempo correspondiente (24 o 72 h). Al finalizar, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró a vacío en un matraz Kitasato y en el mismo sistema de filtración, se lavó sucesivamente con 20 mL de PhMe y 20 mL de DCM. A continuación, el sólido fue sometido a un lavado final en un extractor Soxhlet, utilizando como solvente DCE o PhMe, durante 24 horas, con el propósito de eliminar el líquido iónico MIM que no se unió covalentemente al MCF. El solvente utilizado en esta última etapa de lavado fue uno de los parámetros experimentales estudiados. Finalmente, el material se secó a vacío. Como resultado, se obtuvieron tres materiales distintos, denominados M24-DCE, M72-DCE y M72-PhMe, donde la nomenclatura indica el tiempo de funcionalización (24 o 72 h) y el solvente empleado para el lavado final (DCE o PhMe).

### 2.4. Fisisorción de nitrógeno

Las propiedades texturales (área específica, volumen poroso y tamaño promedio de poro) fueron determinadas mediante las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno (método BJH). Las muestras analizadas se secaron a 120°C por 12 h, se desgasificaron a 200°C, bajo flujo de nitrógeno por 3 h y se examinaron a 77 K.

### 2.5. Pretratamiento del material

Para el estudio del tratamiento de los materiales con agua, se pesó 1.0 g de los materiales funcionalizados, M24-DCE, M72-DCE y M72-PhMe. Cada material fue colocado en un frasco de vidrio graduados de 100 mL con tapa de rosca, con 40 mL de agua desionizada, el cual se introdujo en la incubadora orbital, por 24 h, donde permanecieron en agitación constante (150 rpm), tipo ping-pong, con temperatura controlada de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo, el líquido se centrifugó durante 10 min a una velocidad de 13,000 rpm. El sólido se colectó en un vaso de precipitados de vidrio de 50 mL y se secó en horno durante 24 h a 60°C. Los materiales tratados se denominaron con el mismo nombre del material utilizado, añadiendo al final la letra T para facilitar su identificación y diferenciación (M24-DCET, M72-DCET y M72-PhMeT, respectivamente).

### 2.6. Estudios preliminares de extracción de Au(III)

Los materiales tratados con agua (M24-DCET, M72-DCET y M72-PhMeT) y sin tratar (M24-DCE, M72-DCE y M72-PhMe), se emplearon en la extracción de Au(III). Además, se realizó la extracción utilizando la sílica sin modificar (identificada como MCF), para corroborar el efecto de la funcionalización. Se pusieron en contacto 0.040 g de cada material con 10 mL de una solución de Au(III) de 50 mg L<sup>-1</sup> en HCl 0.1 M, durante 1 h. Posteriormente, se separó la solución y se determinó la cantidad de oro extraído.

### 2.7. Estudio termodinámico y cinético de extracción de Au (III)

Para la extracción de Au(III), se obtuvieron las isotermas de sorción y realizaron estudios cinéticos de extracción. Las isotermas de sorción se realizaron poniendo en contacto 0.020 g del material en 5 mL de una solución de Au(III) a concentración variable (20 a 700 mg L<sup>-1</sup>) en HCl 0.1M. Para los experimentos cinéticos, se pesaron 0.40 g del material en 100 mL de Au(III) a 325 mg L<sup>-1</sup>, se tomaron alícuotas a tiempos preestablecidos (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 y 30 min), las cuales fueron filtradas inmediatamente, para lograr la separación de las fases y su posterior análisis.

En todos los experimentos de extracción de Au(III), se utilizaron soluciones de HCl 0.1 M. Para favorecer la transferencia del metal en solución al material, se usó agitación tipo ping pong a una velocidad de 150 rpm, a temperatura controlada (20±1°C). Finalmente, se determinó la concentración inicial de Au(III) y la remanente en la solución.

La concentración de Au(III) en solución se determinó por espectrofotometría UV-VIS, usando una celda de cuarzo y una longitud de onda de 314 nm, en donde se presenta una banda de absorción característica del Au(III) en medio HCl. Las soluciones que estuvieron en contacto con los materiales, fueron previamente separadas, mediante filtración con membranas de PVDF, con tamaño de poro de 0.45 µm.

La concentración de metal retenido en el material a un tiempo t (q<sub>t</sub>, mg g<sup>-1</sup>) o en el equilibrio (q<sub>eq</sub>, mg g<sup>-1</sup>) se determinó por diferencia de las concentraciones iniciales del metal en solución (C<sub>0</sub>, mg L<sup>-1</sup>) y a un tiempo determinado (C<sub>t</sub>, mg L<sup>-1</sup>) o en el equilibrio (C<sub>eq</sub>, mg L<sup>-1</sup>), mediante (2):

$$q_{eq} = (C_0 - C_{eq}) \cdot \frac{V}{m} \quad (2)$$

donde, V es el volumen de la solución (L) y m la masa del material (g). Para el modelado de las isotermas de sorción se utilizó el modelo de Langmuir [5], empleando (3).

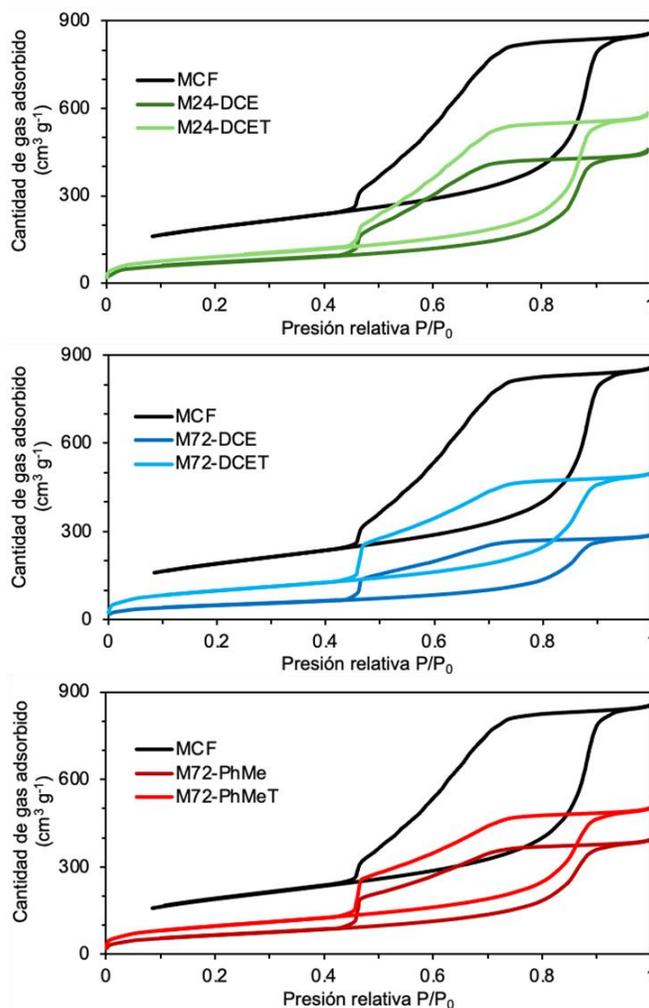
$$q_{eq} = \frac{q_m b C_{eq}}{1 + b C_{eq}} \quad (3)$$

donde: q<sub>m</sub> (mg g<sup>-1</sup>) representa la capacidad máxima de extracción para una monocapa de metal adsorbido; y b es una constante del modelo, relacionada con la entalpía de sorción (L mg<sup>-1</sup>).

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Fisisorción de nitrógeno

El análisis de las isothermas de nitrógeno proporciona información sobre las propiedades texturales de los materiales. En la Figura 1, se observan las isothermas de adsorción-desorción de los materiales sintetizados, incluyendo la sílice MCF sin modificar y las sílices funcionalizadas con MIM, bajo diferentes condiciones de síntesis (24 o 72 h de funcionalización; y DCE o PhMe como solvente de lavado).



**Figura 1.** Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para sílice MCF sin modificar y sílice funcionalizada (MCF-MIM) antes y después de ser tratada con agua.

Todos los materiales exhiben isotermas de tipo IV, que son características de materiales mesoporosos, junto con lazos de histéresis de tipo H2(b). Estas isotermas tienen una forma triangular, con una rama de desorción pronunciada y una rama de adsorción que aumenta suavemente en la región de condensación capilar. Este comportamiento se atribuye comúnmente a la presencia de mesoporos con bocas estrechas, a menudo comparados con poros en forma de frascos de tinta.

A partir de las isotermas anteriores (Figura 1), se determinaron las propiedades texturales de los materiales. En la Tabla 1, se presentan los resultados obtenidos. Los materiales funcionalizados presentan áreas superficiales y volúmenes porosos menores que la sílice MCF sin funcionalizar ( $667.6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y  $0.720 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente), lo cual es indicativo de que, como resultado de la funcionalización, el MIM está ocupando parte de la superficie y del volumen poroso de la sílice. A mayor grado de funcionalización, menor área superficial y volumen poroso. Los materiales funcionalizados durante 72 h, presentan mayor grado de funcionalización (menor área superficial y volumen poroso) que aquellos con 24 h de funcionalización. La mayor funcionalización se obtuvo para el material M72-DCE.

**Tabla 1.** Propiedades texturales de los materiales.

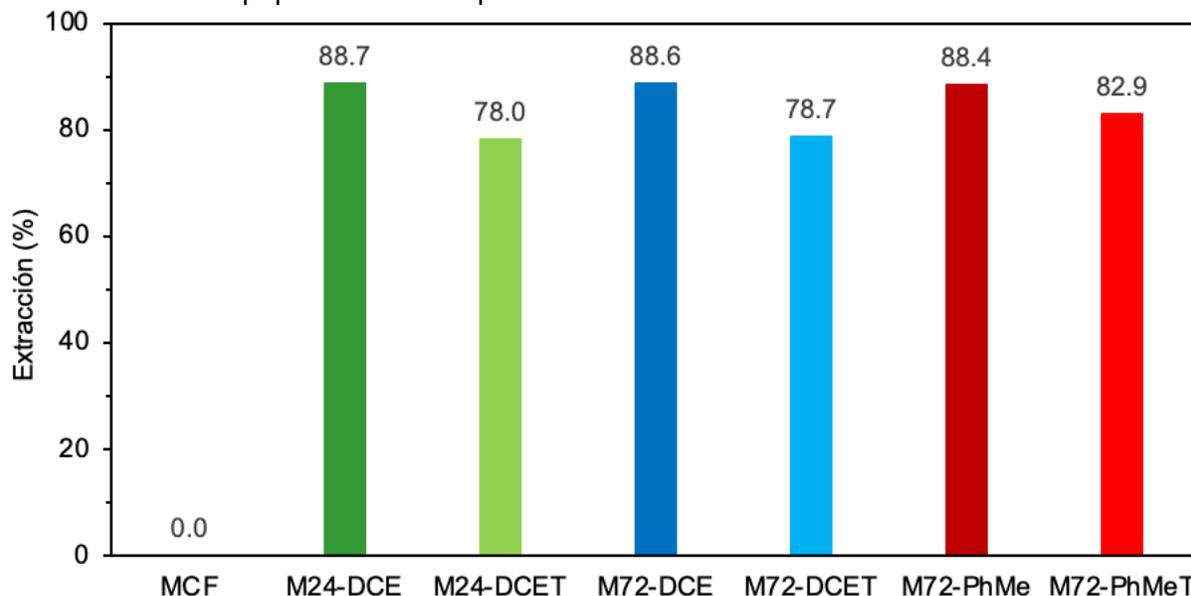
Material	Área superficial ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	Diámetro de poro (nm)		Volumen poroso ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )
		Ventana	Celda	
MCF	667.6	5.45	9.87	0.720
M24-DCE	247.8	4.97	10.74	0.652
M24-DCET	314.2	5.11	11.40	0.628
M72-DCE	175.6	4.92	10.59	0.380
M72-DCET	352.0	4.97	9.73	0.520
M72-PhMe	236.5	4.93	10.70	0.500
M72- PhMeT	348.4	4.93	9.83	0.570

Por otra parte, cuando comparamos las propiedades texturales de los materiales funcionalizados, antes y después de ser tratados con agua, se observa que el área superficial y el volumen poroso se incrementan con dicho tratamiento. Por ejemplo, el volumen poroso del M72-DCE ( $0.380 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ) se incrementó a  $0.520 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , después de ser tratado con agua (M72-DCET), lo cual puede ser explicado por una remoción parcial del MIM por el agua, disminuyendo el grado de funcionalización. Los materiales funcionalizados durante 72 h presentaron una menor pérdida de extractante (menor incremento de volumen poroso). En general, las dimensiones de los poros de los materiales funcionalizados son similares.

### 3.2. Estudios preliminares de extracción de Au(III) con las sílices funcionalizadas

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se muestran los porcentajes de extracción de Au(III) obtenidos utilizando la sílice MCF sin modificar y las sílices funcionalizadas con MIM. Lo primero que se observa es que con la sílice sin funcionalizar (identificada como MCF), la extracción es nula, mientras que para todos los materiales funcionalizados con MIM,

antes del tratamiento con agua, se obtienen altos porcentajes de extracción (88.4-88.7%). Lo anterior confirma el papel activo del líquido iónico en la extracción.



**Figura 2.** Porcentajes de extracción de los materiales. Condiciones de extracción: Temperatura:  $20 \pm 1$  °C; Velocidad de agitación: 150 rpm;  $C_{\text{HCl}}$ : 0.1 M;  $C_0$ :  $47.73 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $m/V$ :  $4.0 \text{ g L}^{-1}$ .

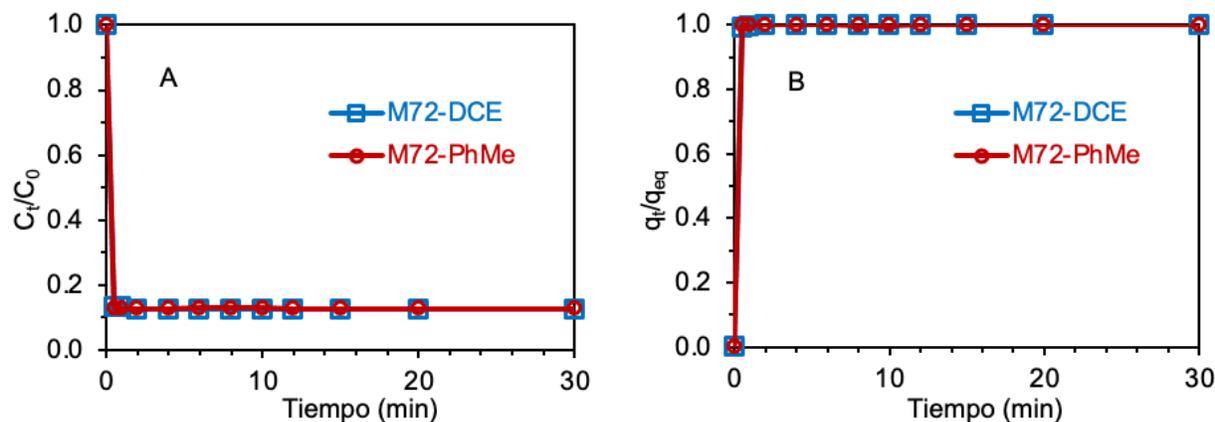
El tratamiento con agua provoca una disminución de la eficiencia de extracción, obteniendo valores entre 78.0 y 82.9%, atribuibles a la pérdida parcial del líquido iónico. Las menores disminuciones de eficiencia se presentaron con los materiales funcionalizados durante 72 h, lo cual corresponde a las menores pérdidas de líquido iónico observadas en los estudios de caracterización textural. Globalmente, los mejores resultados de extracción fueron conseguidos al aumentar el tiempo de funcionalización a 72 h y lavar el material con PhMe (M72-PhMe), con el cual se obtiene una menor pérdida del líquido iónico al ser tratado con agua. Se obtuvieron eficiencias de extracción de Au(III) de 88.4% y 82.9%, antes y después de ser tratado con agua, respectivamente, lo cual confirma que el MIM permanece unido de manera más estable con estas condiciones de síntesis.

### 3.3. Estudio termodinámico y cinético de extracción de Au (III)

La velocidad y la capacidad de extracción son aspectos de gran importancia en la aplicación de los materiales, por lo que se realizaron estudios cinéticos y termodinámicos de extracción de Au(III) con los materiales que presentaron los mejores resultados en los estudios preliminares, mostrados en el párrafo anterior, es decir, con los materiales sintetizados con 72 h de funcionalización y lavados con DCE (M72-DCE) o con PhMe (M72-PhMe).

En la Figura 3, se presentan los resultados del estudio cinético, mostrando primeramente la fracción residual de Au(III) en solución ( $C_t/C_0$ ) en función del tiempo (Figura 3 A). Las curvas para

ambos materiales son muy similares, las cuales presentan una disminución muy rápida al inicio (0.5 min) y a partir de los 2 min se estabilizan y alcanzan el equilibrio con valores de  $(C_t/C_0)_{eq}$  de 0.126 para M72-DCE y ligeramente mayores para M72-PhMe (0.128), las cuales corresponden a eficiencias de extracción de 87.4% y 87.2%, respectivamente, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.



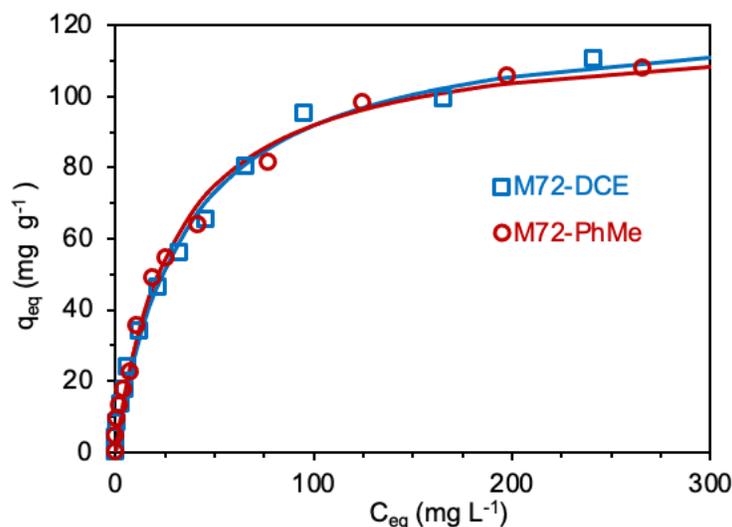
**Figura 3.** Cinética de extracción de Au(III) mostrando, A) la fracción residual del metal en solución ( $C_t/C_0$ ) y B) la fracción de aproximación al equilibrio ( $q_t/q_{eq}$ ) en función del tiempo de extracción. Condiciones de extracción: Temperatura:  $20 \pm 1$  °C; Velocidad de agitación: 150 rpm;  $C_{HCl}$ : 0.1 M;  $C_0$ : 325 mg L<sup>-1</sup>; m/V: 4.0 g L<sup>-1</sup>.

La fracción de aproximación al equilibrio ( $q_t/q_{eq}$ ) permite comparar más fácilmente la velocidad de extracción de sistemas con diferentes fracciones residuales de adsorbato al equilibrio. En la Figura 3 B, se observan comportamientos prácticamente idénticos de  $q_t/q_{eq}$  en función del tiempo, para ambos materiales, con valores superiores a 0.99 a 0.5 min y superiores a 0.999 a partir de los 2 min, indicando que la condición de equilibrio se alcanza a tiempos muy cortos.

Las isotermas de extracción de Au(III) obtenidas con los materiales M72-DCE y M72-PhMe se presentan en la Figura 4, en la cual se muestra la concentración de Au(III) adsorbido en los materiales en el equilibrio ( $q_{eq}$ ) en función de la concentración de Au(III) en solución en el equilibrio ( $C_{eq}$ ). Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas las isotermas obtenidas con el modelo de Langmuir y las constantes  $b$  y  $q_m$  reportadas en la Tabla 2, las cuales fueron obtenidas por regresión no lineal, a partir de los datos experimentales.

Las isotermas son muy similares para los dos materiales, se observa la típica curva de adsorción en monocapa, con un comportamiento lineal al inicio de la curva y luego la pendiente va disminuyendo, hasta alcanzar una meseta representativa de la capacidad máxima de extracción ( $q_m$ ), correspondiente a la saturación del material. En ambos materiales se obtienen valores de  $q_m$  y  $b$  muy similares, como lo muestra la

Tabla 2, lo que sugiere que ambos materiales adsorben Au(III) de manera similar y tienen capacidades de adsorción comparables.



**Figura 4.** Isotermas de extracción de Au(III) con M72-DCE y M72-PhMe. Condiciones de extracción: Temperatura:  $20 \pm 1$  °C; Velocidad de agitación: 150 rpm;  $C_{HCl}$ : 0.1 M;  $C_0$ : 20 -700  $mg L^{-1}$ ; m/V: 4  $g L^{-1}$ .

**Tabla 2.** Parámetros obtenidos de las isotermas de sorción de Au(III) con el modelo de Langmuir.

Material	$b (L mg^{-1})$	$q_m (mg g^{-1})$
M72-DCE	0.0288	124
M72-PhMe	0.0340	119

#### 4. Conclusiones

Se prepararon materiales a base de sílice mesoporosa (MCF) funcionalizada con el líquido iónico MIM, utilizando diferentes condiciones de síntesis: tiempo de funcionalización (24 o 72 h) y solvente de lavado (DCM o PhMe). El análisis textural mostró que el área superficial y el volumen poroso disminuyen con el grado de funcionalización. El tratamiento de los materiales con agua provoca una pérdida parcial del líquido iónico, la cual disminuye cuando se utilizan mayores tiempos de funcionalización y PhMe como solvente de lavado (M72-PhMe).

El MCF sin funcionalizar no extrae Au(III), en cambio, todos los materiales funcionalizados con MIM presentaron altas eficiencias de extracción ( $\geq 88.4\%$ ), confirmando que la extracción se realiza por medio del MIM. La eficiencia de extracción disminuye a valores entre 78.0 y 82.9%, cuando los materiales se tratan previamente con agua, a causa de la pérdida parcial del líquido iónico. El M72-PhMe es el material que presenta la menor variación, obteniendo extracciones

similares de Au(III) antes (88.4%) y después del tratamiento con agua (82.9%), atribuible a un enlace más estable entre la sílica MCF y el MIM y a una eliminación más completa del MIM sin reaccionar, durante el proceso de fabricación.

El estudio cinético de extracción de Au(III) demostró que la extracción es muy rápida, alcanzando el equilibrio en los primeros 2 min, con los materiales M72-DCE y M72-PhMe. Las isothermas de extracción para ambos materiales son muy similares, alcanzando capacidades máximas de extracción de 124 y 119 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio Nacional LACAPFEM de la Universidad de Guanajuato, por el apoyo para la realización de este estudio.

## 6. Referencias

- [1] D.A. Ray, M. Baniyadi, J.E. Graves, A. Greenwood, S. Farnaud. *Journal of Sustainable Metallurgy*. **8**, 597–612 (2022).
- [2] X. Liu, R. Liu, Y. Lu, Q. Sun, W. Xue, M. Cheng, Y. Yang. *Separation and Purification Technology*. **328**, 125049 (2024).
- [3] T. Kang, Y. Park, K. Choi, J.S. Lee, J. Yi. *Journal of Materials Chemistry*. **14**, 1043-1049 (2004).
- [4] X. Cui, Y. Wang, Y. Wang, P. Zhang, W. Lu. *Molecules*. **28**, [5] 2165 (2023).
- [5] R. Navarro, M.A. Lira, I. Saucedo, A. Alatorre, E. Guibal. *Gold Bulletin*. **50**, [1] 7–23 (2017).
- [6] A. Galván Cabrera. *Aplicación de Materiales Catalíticos en Síntesis Orgánica*. Tesis de Doctorado. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. México. (2021).

# Cálculo de la constante de unión para determinar la eficiencia de intercalación de la arcilla laponita cargada con metotrexato

Julio Cesar Alva Ensastegui <sup>a, b\*</sup>, Enrique Morales Ávila <sup>b\*</sup>

a Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, C.P. 50180, Toluca, Estado de México, México, Tel.: +52 (722) 217 3890 ext. 159, e-mail: [emoralesav@uaemex.mx](mailto:emoralesav@uaemex.mx)

b Universidad Autónoma Metropolitana–Lerma, Departamento de Recursos de la Tierra, Av. De las Garzas #10, El Panteón, C.P. 52005, Lerma de Villada, Estado de México, México, Tel.: +52 (722) 226 2300 ext. 3400, e-mail: [j.alva@correo.ler.uam.mx](mailto:j.alva@correo.ler.uam.mx)

## Resumen

El diagrama de distribución de especies químicas para el sistema metotrexato, MTX, con laponita, Lap, fue construido a partir de su correspondiente valor de constante de unión, K, a un valor de pH de 1.63. La K fue calculada a partir de un estudio espectrofotométrico y con ayuda del programa computacional Stability Quotients from Absorbance Data (SQUAD). La forma catiónica es la especie predominante del MTX a pH 1.63 cuya carga eléctrica favorece su intercalación entre las láminas de esta nanoarcilla Lap. El valor de K es de  $10^{4.92}$  a pH 1.63. La K también fue calculada a tres valores adicionales de pH en donde las diferentes especies del MTX predominan, obteniendo una disminución de la K con el aumento del pH debido a la desprotonación del MTX.

**Palabras clave.** *Metotrexato, laponita, Constante de unión.*

## Abstract

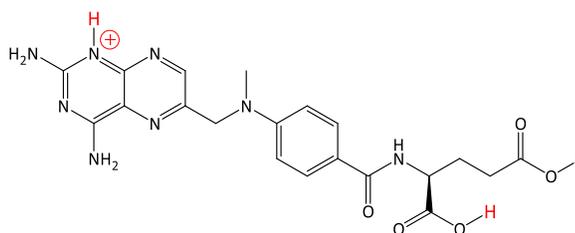
The chemical species distribution diagram for the system Methotrexate, MTX, with laponite, Lap, was constructed from its corresponding binding constant value, K, at a pH value of 1.63. The K was calculated from a spectrophotometric study and with the Stability Quotients from the Absorbance Data (SQUAD) computer program. The cationic form is the predominant species of MTX at pH 1.63 whose electrical charge favors its intercalation between the layers of this Lap nano clay. The K value is  $10^{4.92}$  at pH 1.63. K was also calculated at three additional pH values where the different MTX species predominate, obtaining a decrease in K with increasing pH due to MTX deprotonation.

**Keywords.** *Methotrexate, laponite, Binding Constant.*

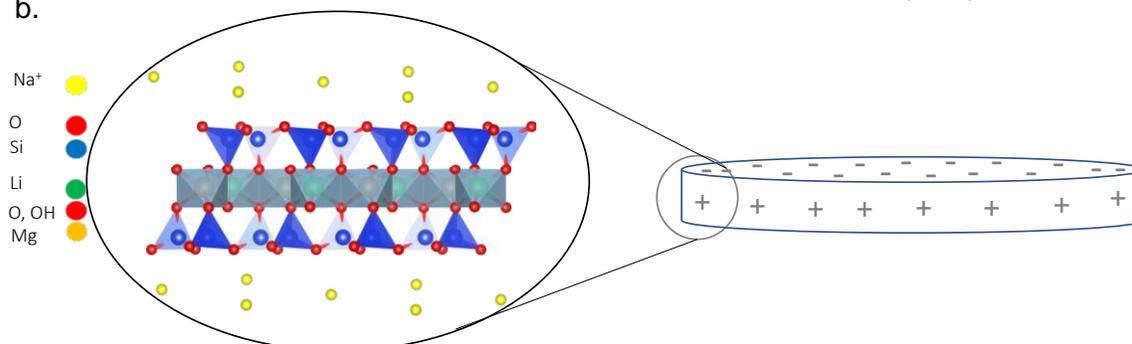
## 1. Introducción

El metotrexato (MTX) es un análogo del ácido fólico (4-amino-10-metil-ácido fólico) y un inhibidor competitivo de la enzima dihidrofólico- reductasa indispensable para la síntesis de ADN a ARN, vinculado originalmente como un fármaco contra el cáncer [1, 2]. El MTX posee tres protones ácidos con valores de pKa:  $2.68 \pm 0.07$ ,  $4.11 \pm 0.05$  y  $5.48 \pm 0.01$  (especies de MTX:  $\text{MTXH}_3^+$ ,  $\text{MTXH}_2$ ,  $\text{MTXH}^-$  y  $\text{MTX}^{2-}$ ) asociando el  $\text{pKa}_1$  al grupo carboxilo unido al carbón alfa y el  $\text{pKa}_2$  al grupo carboxilo del carbón gamma y el último pKa al anillo de pteridina [3].

a.



b.



**Figura 1.** Estructura química del MTX (a) y representación general de la nanoarcilla laponita (b).

El MTX tiene la versatilidad de formar complejos con arreglos moleculares como son las ciclodextrinas [4] y surfactantes [5] con la finalidad de mejorar su fotoestabilidad, aumentar su baja solubilidad, además de otras propiedades físico-químicas de importancia farmacéutica.

En años recientes se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos capaces de mejorar el desempeño de los principios activos a través de modificar la velocidad de liberación, el sitio de liberación o mediante la combinación de mecanismos en un mismo sistema para lograr un efecto sinérgico [6].

Un ejemplo de este tipo de sistema son los materiales composites, que consisten en materiales híbridos, por ejemplo, arcillas minerales y biopolímeros, capaces de combinar las propiedades de ambos materiales (capacidad de hinchamiento, adsorción, propiedades mecánicas, comportamiento térmico, bioadhesión, etc.), ya sea por formación directa de micropartículas y nanopartículas o por intercalación del polímero entre las láminas de la arcilla, así como la intercalación directa de moléculas de interés, considerando a las arcillas un componente

fundamental en las formulaciones farmacéuticas, tanto como excipientes o bien como principios activos [6]. En este trabajo de investigación se propone un modelo del tipo formación del complejo MTX-Lap, con el cual se podría predecir la fracción de intercalación del MTX sobre la nanoarcilla Lap.

## 2. Experimental

*Reactivos.* Metotrexato 99.8% (MTX, MM: 454.44 g/mol), ácido bórico e hidróxido de sodio fue obtenido de Sigma Aldrich, metanol, ácido acético 99% y ácido clorhídrico (Fermont), ácido fosfórico (Analytika de Mexico), laponita RD® con masa molar de 2,286.9 g/mol, (BYK Additives & Instruments). Agua estéril (Eau Claire) fue usada como disolvente para la preparación de soluciones.

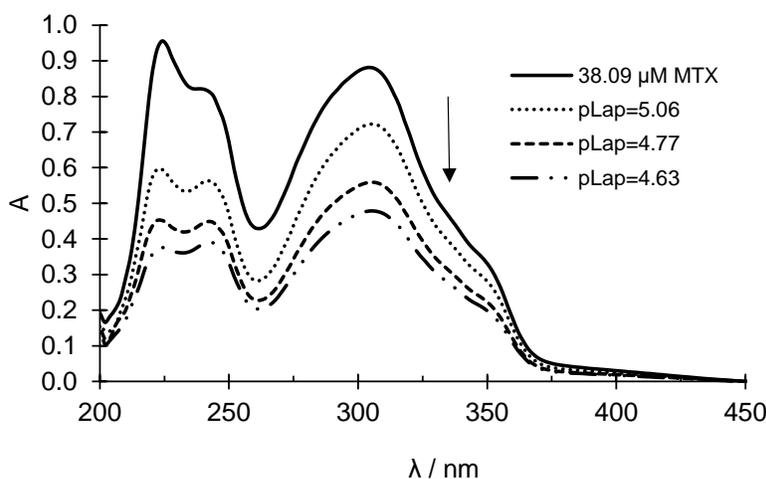
*Estudio espectrofotométrico.* Dos soluciones stock fueron preparadas: 0.45 mg/mL de MTX (NaOH 0.25 M) y 0.62 mg/mL de Lap (agua). Se preparó un sistema a partir de 2 mL de solución buffer Britton-Robinson 0.1 M ajustado a pH 1.63 al cual se agregó una alícuota de 80  $\mu$ L de la solución stock de MTX seguida de catorce adiciones de 10  $\mu$ L de la solución stock de Lap midiendo su espectro de absorción en cada adición (el efecto de dilución fue corregido). El espectrofotómetro UV-Vis usado fue GENESYS 50 (Thermo Scientific) usando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico a 298 K.

*Determinación de las constantes de unión del complejo MTX-Lap.* Los datos obtenidos experimentalmente se ingresaron al programa computacional SQUAD [7] para obtener los logaritmos de las constantes de formación globales,  $\text{Log } \beta$ , ajustando los espectros de absorción UV-Vis a los valores de  $\text{pLap}$  ( $\text{pLap} = -\text{Log}[\text{Lap}]$ ) a pH 1.63.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Ecuaciones, figuras y tablas

El metotrexato, MTX, muestra dos máximos de absorción a 226 y 308 nm con un hombro en su lado derecho de cada banda a un valor de pH de 1.63, Figura 2, (se muestran cuatro de los catorce espectros obtenidos). Ambas bandas sufren de desplazamientos hipocrómicos debido a la presencia de la laponita, Lap, lo que sugiere que la inhibición de la absorbancia es debido a que el MTX se intercala entre las láminas de la Lap bajo estas condiciones de trabajo.



**Figura 2.** Espectros de absorción de 38.09  $\mu\text{M}$  MTX a diferentes concentraciones de la arcilla Lap expresadas como pLap usando 0.1 M buffer Britton-Robinson ajustado a pH 1.63 como disolvente.

Los datos de los catorce espectros correspondientes al complejo MTX-Lap obtenidos a diferentes valores de pLap son introducidos al programa computacional SQUAD [7] para el cálculo de su correspondiente valor de constante de unión, Tabla 1.

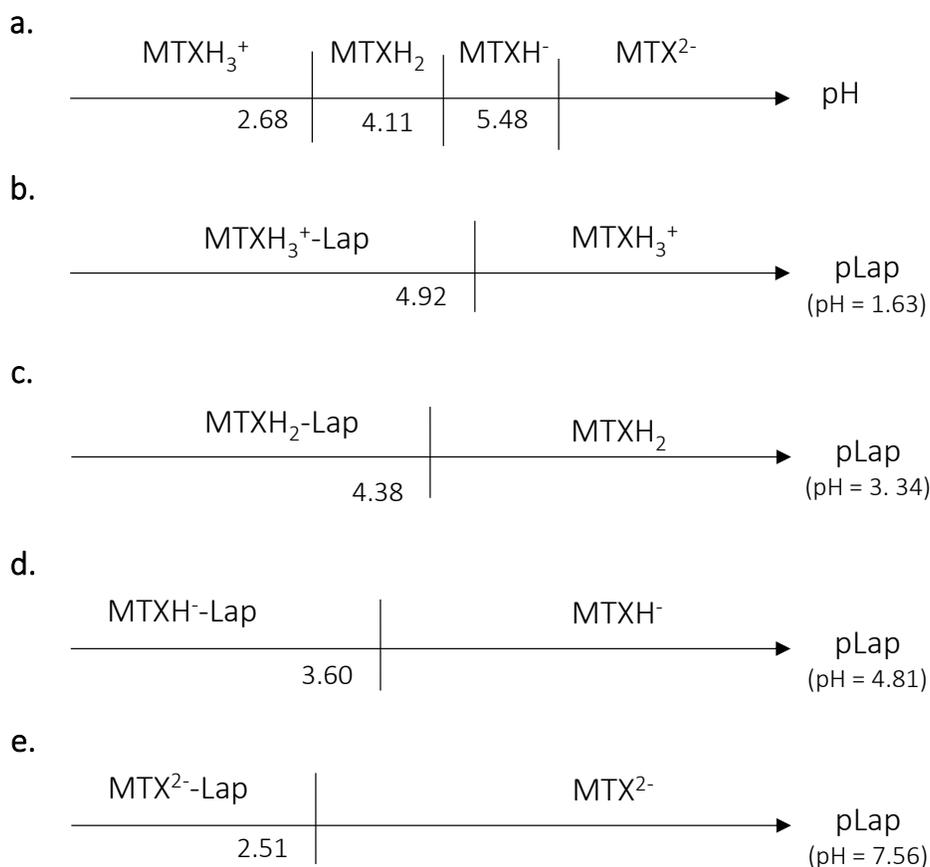
En este trabajo de investigación se prueban tres estequiometrías: 1:1, 1:2, 1:3 además de un sistema que considera dos estequiometrías 1:1 y 1:2 por ser las más probables, obteniendo valores estadísticos más bajos relacionados a la primera propuesta de estequiometría.

**Tabla 1.** Constantes de formación global del complejo MTX-Lap a pH 1.63.

Estequiometría MTX:Lap	Log $\beta$	$\sigma_{\text{Const}}$	$\sigma_{\text{Total}}$	U
1:1	4.924	0.012	0.0109	0.2492
1:1	-	-	-	-
1:2	-	-	-	-
1:2	10.311	0.009	0.0129	0.3489
1:3	15.564	0.011	0.0161	0.5441

$\sigma_{\text{Const}}$ : desviación estándar de la constante;  $\sigma_{\text{Total}}$ : desviación estándar total de las constantes; U: suma de los cuadrados de las diferencias de los datos de absorbancias experimentales y calculados.

Los valores de Log  $\beta$  fueron también calculados a valores de pH de: 3.34, 4.81 y 7.56 mostrando la misma estequiometría 1:1 y una disminución en el valor de log K correspondiente a la disociación del complejo MTX-Lap, Figura 3 c-e.



**Figura 3.** Diagramas de zonas de predominio lineales de la desprotonación del MTX [3] (a) y de la formación del complejo MTX-Lap a valores de pH de: 1.63 (b), 3.34 (c), 4.81 (d) y 7.56 (e).

La disminución del valor de Log K del complejo MTX-Lap con el aumento del valor de pH, representa una menor afinidad del fármaco por la arcilla, ocasionando la necesidad de mayor cantidad de arcilla para la formación del complejo.

Cuando se grafica el Log K en función del pH se obtiene un comportamiento lineal con ecuación de  $y = -0.4149x + 5.6556$  y coeficiente de correlación cuadrado de 0.9941. Considerando que los complejos formados a diferentes valores de pH tienen un valor de estequiometría 1:1.

Los resultados preliminares mostrados en este trabajo de investigación, podrían proporcionar mayor información acerca de la formación del complejo MTX-Lap y la liberación controlada de este fármaco a través del valor de pH

## 4. Conclusiones

A partir del cálculo de la constante de unión correspondiente al complejo MTX-Lap fue posible construir un diagrama de distribución de especies químicas para determinar la eficiencia de intercalación del MTX sobre las láminas de Lap a partir las fracciones molares a un valor de pH conocido. Esta arcilla mostró ser sensible al pH siendo esta una característica determinante para la liberación del MTX. Estos resultados preliminares podrían ser empleados para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos.

## 5. Agradecimientos

JCAE y EMA agradecen a “Estancias Posdoctorales por México 2022(1) (CONAHCYT)” por la beca obtenida. A BYK Chemie de México por la donación de diferentes tipos de laponitas. Al Dr. Alberto Rojas-Hernández por sus críticas a este trabajo.

## 6. Referencias

- [1] B. Rafique, A.M. Khalid, K. Akhtar, A. Jabbar, Interaction of anticancer drug methotrexate with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods, *Biosensors and Bioelectronics* 44 (2013) 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.028>
- [2] M.L. PASCU, A. STAIU, L. VOICU, M. BREZEANU, B. CARSTOCEA, R. PASCU, D. GAZDARU, Methotrexate as a Photosensitizer, *Anticancer Research* 24(5A) (2004) 2925-2930
- [3] J.C. Alva-Ensastegui, E. Morales-Avila, A.P. de la Luz, M.J. Bernad-Bernad, Determination of pKa values and deprotonation order of methotrexate using a combined experimental-theoretical study and binding constants of the methotrexate-Laponite complex at different pH values, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 449 (2024) 115406. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2023.115406>
- [4] D. Ahmadi, M. Zarei, M. Rahimi, M. Khazaie, Z. Asemi, S.M. Mir, A. Sadeghpour, A. Karimian, F. Alemi, M. Rahmati-Yamchi, R. Salehi, F. Jadidi-Niaragh, M. Yousefi, N. Khelgati, M. Majidinia, A. Safa, B. Yousefi, Preparation and in-vitro evaluation of pH-responsive cationic cyclodextrin coated magnetic nanoparticles for delivery of methotrexate to the Saos-2 bone cancer cells, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 57 (2020) 101584. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101584>
- [5] G.A.d.S. Cintra, L.A. Pinto, G.M.F. Calixto, C.P. Soares, E.D.S. Von Zuben, M.V. Scarpa, M.P.D. Gremião, M. Chorilli, Bioadhesive Surfactant Systems for Methotrexate Skin Delivery, *Molecules* 21(2) (2016) 231. <https://doi.org/10.3390/molecules21020231>
- [6] P. García Guzmán, "Desarrollo y caracterización de un composito montmorillonita/micropartículas con acción combinada para reducción de colesterol". (Tesis de Doctorado), Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3475078>, 2018, p. 170.
- [7] D.J. Leggett, *Computational methods for the determination of formation constants*, Plenum Press: New York, 1985.

## Contribuciones a la caracterización electroquímica de la dopamina y polidopamina

Josué Grijalva Canales<sup>a</sup>, Carlos Andrés Galán Vidal<sup>a\*</sup>, María Elena Páez Hernández<sup>a</sup>, Irma Pérez Silva<sup>a</sup>, Israel Samuel Ibarra Ortega<sup>a</sup>, José Antonio Rodríguez Ávila<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química, Laboratorio de Química Analítica. Ciudad Universitaria, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42076.

Tel: +52 (771) 717 2000 ext 2217, e-mail: [galanv@uaeh.edu.mx](mailto:galanv@uaeh.edu.mx)

### Resumen

La dopamina es un neurotransmisor que cumple importantes funciones en el organismo por lo que su cuantificación es relevante y se han reportado diversas alternativas analíticas entre las que destacan las electroquímicas debido a su simplicidad y bajo costo. Su proceso de oxidación involucra su electropolimerización, lo que por una parte dificulta su determinación, pero por otra genera la polidopamina que ha sido utilizada con éxito para el desarrollo de diversos sensores y biosensores electroquímicos como un material que ayuda a incrementar el área electroactiva de los electrodos y recubrir o proteger los elementos de reconocimiento.

La optimización de los métodos electroquímicos de cuantificación de dopamina y de su electropolimerización, hacen necesario conocer los mecanismos involucrados y han despertado el interés de la comunidad científica en este sentido; sin embargo, aún existen incongruencias y ambigüedades relacionadas con las señales electroquímicas de la dopamina, su electropolimerización y la identidad de las especies involucradas.

En el presente trabajo se propone un mecanismo integral de electropolimerización de dopamina congruente con nuestros resultados experimentales de caracterización electroquímica y estudios de infrarrojo; así como reportes de identificación de diversas especies químicas mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

**Palabras clave.** *Dopamina, Polidopamina, Electropolimerización.*

### Abstract

Dopamine is a neurotransmitter that performs important functions in the body, so its quantification is relevant and various analytical alternatives have been reported, including the electrochemical ones because of their simplicity and low cost. Its oxidation process involves its electropolymerization, which on the one hand makes its determination difficult, but on the other hand generates polydopamine, which has been successfully used for the development of various electrochemical sensors and biosensors as a material that helps to increase the electroactive area of the electrodes and to coat or protect the recognition elements.

The optimization of the electrochemical methods for quantifying dopamine and its electropolymerization makes it necessary to know the mechanisms involved and has stimulated the interest of the scientific community in this sense; however, there are still inconsistencies and ambiguities related to the electrochemical signals of dopamine, its electropolymerization and the identity of the species involved. In this study, we propose a comprehensive mechanism for dopamine electropolymerization consistent with our experimental results of electrochemical characterization and infrared studies, as well as reports of the identification of various chemical species by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

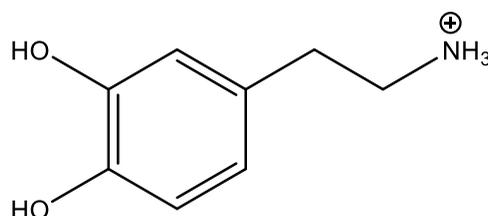
**Keywords.** *Dopamine, Polidopamine, Electropolymerization*

## 1. Introducción

La dopamina ( $H_3DA^+$ ) (Figura 1) es un neurotransmisor de vital importancia en el sistema nervioso central de los mamíferos. Controla varias funciones biológicas relacionadas con la cognición, emoción, motivación, regulación endocrina, locomoción y la transferencia de mensajes. Niveles bajos se relacionan con diferentes problemas neurodegenerativos como el Parkinson y el Alzheimer, mientras que niveles elevados se asocian con la esquizofrenia [1-3]. Por esta razón, se han desarrollado diversas metodologías analíticas para su cuantificación, entre las que destacan los métodos cromatográficos y espectrofotométricos; así como sensores y biosensores electroquímicos [4-8].

La polidopamina, el polímero derivado de la dopamina, se ha empleado ampliamente en biotecnología, catálisis, baterías, capacitores, electroquímica, sensores y biosensores, en sistemas anticorrosión, nanotecnología, membranas, tratamiento de aguas, películas conductoras y sustratos biocompatibles [9-13]. Es un material polimérico de gran interés debido a que su polimerización es sencilla, asequible y a su facilidad para modificar superficies. Posee excelentes propiedades químicas como su fuerte adhesión a diversos sustratos, su baja conductividad eléctrica, su excelente biocompatibilidad y baja citotoxicidad. En sensores y biosensores se emplea en la modificación de superficies para incrementar el área electroactiva y con ello mejorar la sensibilidad; así como inmovilizar, proteger y dar estabilidad a elementos de reconocimiento, para evitar el ensuciamiento y dar mejores propiedades mecánicas, elásticas y de biocompatibilidad en dispositivos electroquímicos [13-14].

No obstante, el gran interés que ha despertado la dopamina en los últimos años, existen incongruencias y ambigüedades relacionadas con las señales electroquímicas de la  $H_3DA^+$  y la identidad de las especies involucradas, debido a que la oxidación de la  $H_3DA^+$  conlleva a su polimerización [2, 16]. No existe unanimidad sobre el mecanismo de electropolimerización de la  $H_3DA^+$  y las diversas propuestas, no toman en cuenta la identidad ácido-base de las especies involucradas y únicamente presentan series de reacciones que llevan de la  $H_3DA^+$  hasta una molécula precursora de la formación de la polidopamina [1, 3, 9, 15-18]. En el caso de la polidopamina, existen muy pocos reportes sobre su comportamiento electroquímico [9, 19-22]. En el presente trabajo se presenta una propuesta global del comportamiento electroquímico de la  $H_3DA^+$  en solución y se propone un mecanismo integral de electropolimerización del neurotransmisor congruente con el comportamiento de la polidopamina por voltamperometría y por espectroscopia de infrarrojo.



**Figura 1.** Estructura química de la dopamina ( $H_3DA^+$ ).

## 2. Experimental

### 2.1. Reactivos y materiales

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos comerciales de grado analítico, sin ningún tratamiento previo; dopamina-HCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , NaOH, HCl,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Sigma-Aldrich) y Nafion 117 al 5% (mezcla de alcoholes alifáticos inferiores y agua) (Fluka). Para preparar todas las soluciones se usó agua desionizada con una resistencia  $\geq 18\text{M}\Omega$  cm.

### 2.2. Instrumentación

Todos los estudios voltamperométricos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con un potenciostato Autolab PGSTAT302N Metrohm y el software NOVA 2.1, mediante una celda conformada por un electrodo de referencia de Ag/AgCl 4M KCl (0.199 vs NHE), un contraelectrodo de platino (Pt) (Basi MF-2013, 1.6 mm de diámetro), y un electrodo de trabajo de carbón vítreo (GC) (3mm de diámetro, Basi MF-2012). Las medidas de pH se realizaron en un potenciómetro pH 510 Series Oakton con un electrodo combinado de pH. La técnica voltamperométrica diferencial de pulso (DPV) se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: paso de potencial, 0.005V, amplitud: 0.025V. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron de un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) Perkin Elmer Sytem 2000 de 400 a  $4000\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de IR de la dopamina (en polvo), membrana de Nafion y polidopamina reducida se obtuvieron en pastilla y el de polidopamina se obtuvo en membrana.

**Pretratamiento del electrodo:** antes de cada experimento el electrodo de carbón vítreo se pulió con una solución de alúmina al 1% y se enjuagó con agua desionizada.

### 2.3. Dopamina

Se analizó la dopamina en solución por voltamperometría cíclica a diferentes valores de pH, a una concentración 1 mM en la ventana de potencial de -1 V a +1.0 V a una velocidad de barrido de 100mV/s, durante dos ciclos, en buffer Britton-Robinson 0.05M en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  y sin desoxigenar, protegiendo la solución de la luz para maximizar su estabilidad [23].

### 2.4. Electropolimerización de dopamina

Debido a que la polidopamina es pobremente retenida sobre la superficie del electrodo, y se pierde con facilidad en solución, se empleó una membrana de Nafion para mejorar su retención. Antes de electropolimerizar la dopamina, al electrodo de carbón vítreo se le depositaron 10 $\mu\text{L}$  de Nafion, se dejó secar a 40°C durante 30 minutos y después se dejó atemperar. La  $\text{H}_3\text{DA}^+$  se electropolimerizó realizando cinco ciclos consecutivos por voltamperometría cíclica en la ventana de potencial de -0.4 a +1.3 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s, a una concentración de dopamina 5mM, en buffer de fosfatos 0.1M pH 7, y protegiendo la solución de  $\text{H}_3\text{DA}^+$  de la luz. Se eligieron estas condiciones ya que, con un mayor número de ciclos, mayor concentración de dopamina y un intervalo más amplio, disminuye la pendiente en la curva de potencial contra pH.

## 2.5. Polidopamina

Se caracterizó la polidopamina por voltamperometría y por espectroscopia de IR. Se realizaron voltamperogramas cíclicos y diferenciales de pulso de la polidopamina a diferentes valores de pH en las ventanas de potencial de -0.5 a +1.0V y de -0.5 a +0.8V, respectivamente. Posteriormente, la polidopamina se sometió a procesos de oxidación a +1.0 V durante 20 minutos y de reducción a -0.5V durante 20 minutos a pH 3. La polidopamina y su proceso de óxido-reducción se caracterizó por IR analizando los espectros de la  $H_3DA^+$ , la membrana de Nafion y la polidopamina oxidada y reducida presente en la membrana de Nafion. Para obtener los espectros de la membrana de Nafion y la polidopamina en su forma reducida y oxidada en la membrana de Nafion, la membrana de Nafion con y sin polidopamina se despegó cuidadosamente de la superficie del electrodo de carbón vítreo. Para obtener el espectro de IR de la polidopamina oxidada, la polidopamina se oxidó electroquímicamente a +1V durante 20 minutos previo a que fuera despegada de la superficie del electrodo.

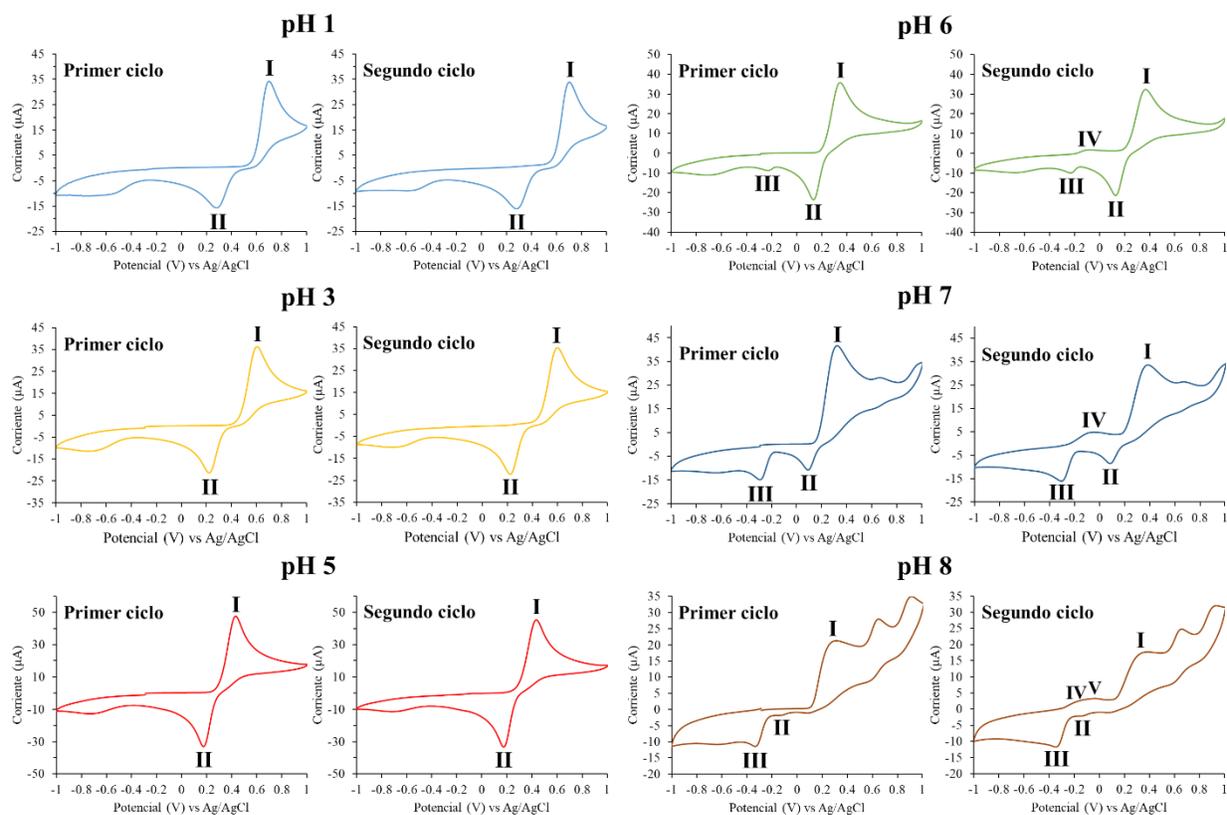
## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Dopamina

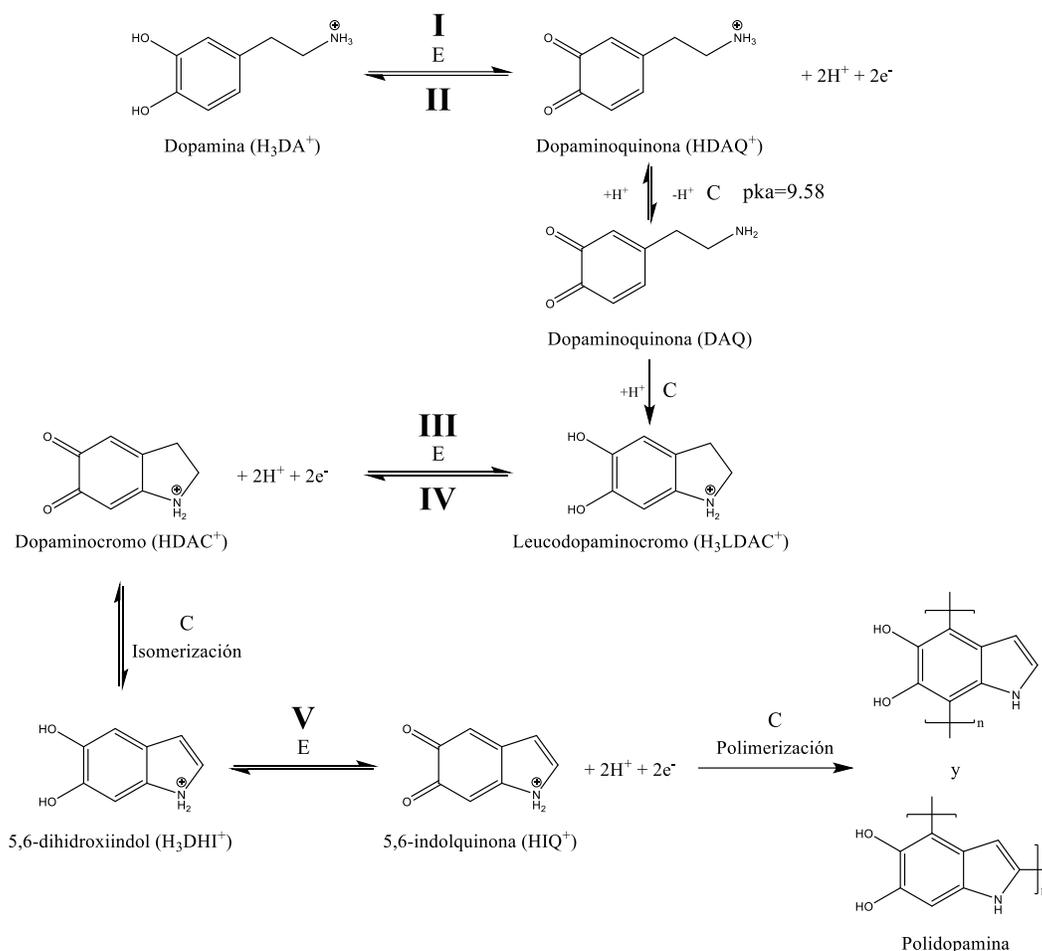
A pH ácido ( $pH \leq 5$ ) la  $H_3DA^+$  presenta una señal de oxidación y una de reducción en el primero y segundo ciclos (Figura 2). La señal I corresponde a la oxidación de la  $H_3DA^+$  a dopaminoquinona ( $HDAQ^+$ ) y la señal II a la reducción de  $HDAQ^+$  a  $H_3DA^+$  (Figura 3), en cuyo proceso de óxido-reducción se transfieren dos protones y dos electrones [2, 8, 15, 24]. También se observa la señal de reducción de oxígeno alrededor de -0.7 V, ya que no se desoxigenó la solución.

A partir de pH 6 se observa la aparición de las señales III y IV (Figura 2). Esto se debe a que conforme se oxida la  $H_3DA^+$  a  $HDAQ^+$ , la  $HDAQ^+$ , que presenta un equilibrio ácido-base ( $pK_a=9.85$ ) [16] se desprotona a  $DAQ$  y sufre una ciclación intramolecular por medio de la adición 1,4 de Michael para formar leucodopaminocromo ( $H_3LDAC^+$ ) (Figura 3). Este proceso se ve favorecido con el aumento del pH [15]. El  $H_3LDAC^+$  al estar a un potencial mayor al de su oxidación, se oxida a dopaminocromo ( $HDAC^+$ ) (Figura 3). Entonces, la reducción de  $HDAC^+$  a  $H_3LDAC^+$  da lugar a la señal III y la oxidación de  $H_3LDAC^+$  a  $HDAC^+$  a la señal IV, en la cuales se transfieren dos protones y dos electrones (Figura 3) [2, 8, 16, 24]. En el primer ciclo se observan las señales I, II y III. La señal I, que corresponde a la oxidación de  $H_3DA^+$  a  $HDAQ^+$ , también tiene contribución de la oxidación de  $H_3LDAC^+$  a  $HDAC^+$ . Una vez formados la  $HDAQ^+$  y  $HDAC^+$  en la señal I, la señal II corresponde a la reducción de la  $HDAQ^+$  (que no se transformó químicamente) a  $H_3DA^+$  y la señal III a reducción de  $HDAC^+$  (que se formó en I) a  $H_3LDAC^+$ . Una vez formado el  $H_3LDAC^+$  en el primer ciclo, en el segundo ciclo se observa la señal IV de oxidación de  $H_3LDAC^+$  a  $HDAC^+$ . La señal III (reducción de  $HDAC^+$  a  $H_3LDAC^+$ ) sirve de evidencia de la formación de  $H_3LDAC^+$  y  $HDAC^+$  en la señal I. También se puede observar que la intensidad de las señales I y II disminuyen con el aumento en el número de ciclos ya que la  $H_3DA^+$  y  $HDAQ^+$  se transforman en especies descritas con anterioridad. Es importante señalar que si bien el valor de  $pK_a$  de la  $HDAQ^+$  es bastante mayor a los pH mostrados, por principio de Le Chatelier el equilibrio ácido-base está desplazado hacia productos pues el  $DAQ$  se transforma químicamente a  $H_3LDAC^+$ .

Las señales I a IV presentan un comportamiento nernstiano como se reporta en [15]. Cuando se realizó el análisis en condiciones desoxigenadas, se observó la aparición de las mismas señales que en el análisis con la presencia de oxígeno, con el mismo compartimento electroquímico.



**Figura 2.** Voltamperogramas cíclicos de la dopamina 1mM en solución a diferentes pH en buffer Britton-Robinson 0.05M. Velocidad de barrido 100mV s<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Mecanismo de oxidación y electropolimerización de la dopamina ( $H_3DA^+$ ).

A partir de pH 8 se observa la aparición de la señal V en el segundo ciclo (Figura 2). Esta señal corresponde a la oxidación del 5,6-dihidroxiindol ( $H_3DHI^+$ ) a 5,6-indolquinona ( $HIQ^+$ ) (Figura 3), donde está involucrada la transferencia de dos protones y dos electrones [16, 24]. Esto se debe a que el  $HDAC^+$  que se formó en la señal IV se isomeriza a  $H_3DHI^+$ , y este se oxida a  $HIQ^+$ . A partir de pH 7 también se observa la aparición de otras señales de oxidación relacionadas con la dopamina que aún no han sido identificadas, pero se reportan en [25].

### 3.2. Electropolimerización de dopamina

En los voltamperogramas cíclicos de electropolimerización de la  $H_3DA^+$  (pH = 7) se observan las mismas cinco señales que se han descrito en la sección anterior (Figura 4). En este caso las señales IV y V se observan superpuestas ya que se requiere pH mayor a 7 para poder observarlas separadas [16, 24]. Las señales de oxidación y reducción de la polidopamina, que se está

formando durante el proceso de electropolimerización, no se observan directamente en el voltamperograma ya que como veremos más adelante son poco intensas, y a pH 7 se encuentran sobrepuestas con las señales III y IV. Las intensidades de las señales disminuyen con el aumento en el número de ciclos debido que la superficie del electrodo se pasiva por la formación de la polidopamina.

Debido a lo anterior, se propone el siguiente mecanismo integral de electropolimerización de la  $H_3DA^+$ , donde todas las especies involucradas se encuentran protonadas al pH de electropolimerización (pH=7) (Figura 3): la  $H_3DA^+$  se oxida a  $HDAQ^+$ , que se desprotona a  $DAQ$ , el  $DAQ$  se cicla mediante una adición 1,4 de Michael para formar  $H_3LDAC^+$ , el  $H_3LDAC^+$  se oxida a  $HDAC^+$ , el  $HDAC^+$  se isomeriza a  $H_3DHI^+$ , el cual se oxida a  $HIQ^+$ , y a partir del  $HIQ^+$  se forme la polidopamina por medio de un mecanismo de radicales libres donde estos se formen en la oxidación de  $H_3DHI^+$  a  $HIQ^+$ . Esta propuesta se fundamenta en nuestros resultados experimentales y diversos trabajos que se describen a continuación. En [18] se analizó la electropolimerización de la dopamina por espectroscopia de masas de reionización neutro-electroquímica (EC-NR-MS) y determinaron que las especies presentes durante este proceso fueron la  $H_3DA^+$ ,  $HDAQ^+$ ,  $H_3LDAC^+$ ,  $HDAC^+$  y  $H_3DHI^+$ . En [3] analizaron la electrooxidación de la dopamina por espectroscopia electroquímica de resonancia magnética nuclear (EC-NMR) y encontraron que las especies presentes durante la electropolimerización de la dopamina fueron  $H_3DA^+$ ,  $HDAQ^+$ ,  $HDAC^+$  y  $H_3DHI^+$ , cuyas concentraciones dependían del voltaje de oxidación impuesto y del pH. En [2], en base a sus cálculos teóricos, confirman la secuencia de reacciones en que se lleva a cabo el proceso y resaltan la importancia de la desprotonación de la amina de la  $HDAQ^+$  para que se lleve a cabo la electropolimerización.

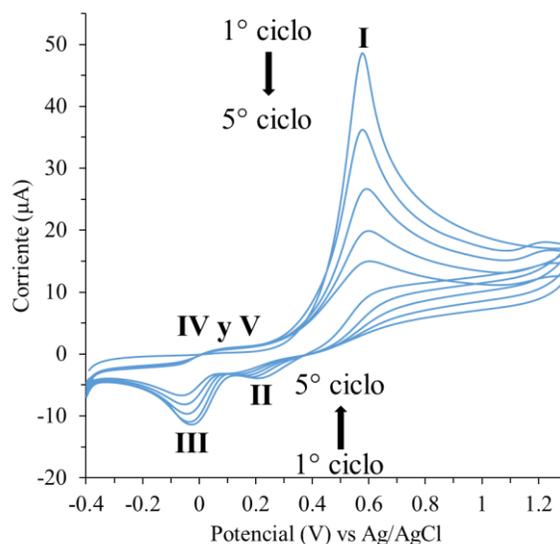
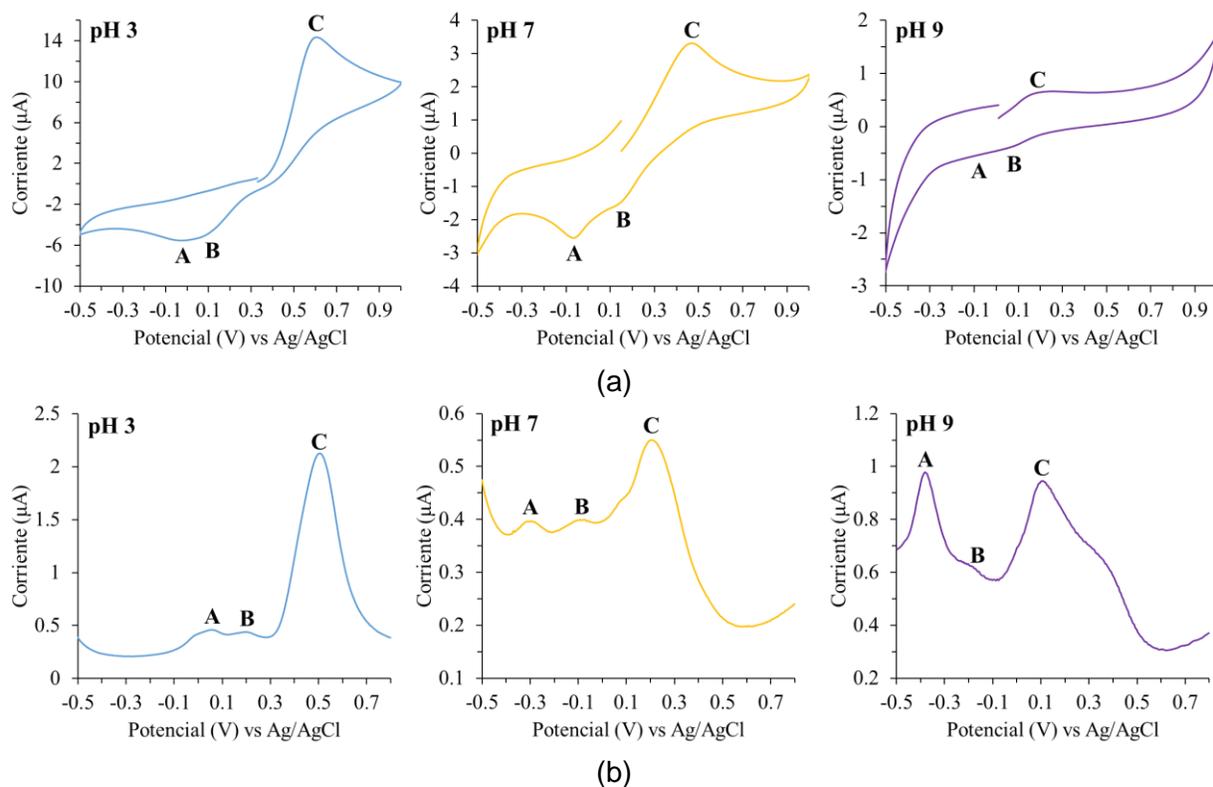


Figura 4. Seguimiento de electropolimerización potenciodinámica de la dopamina ( $H_3DA^+$ ).

### 3.3. Polidopamina

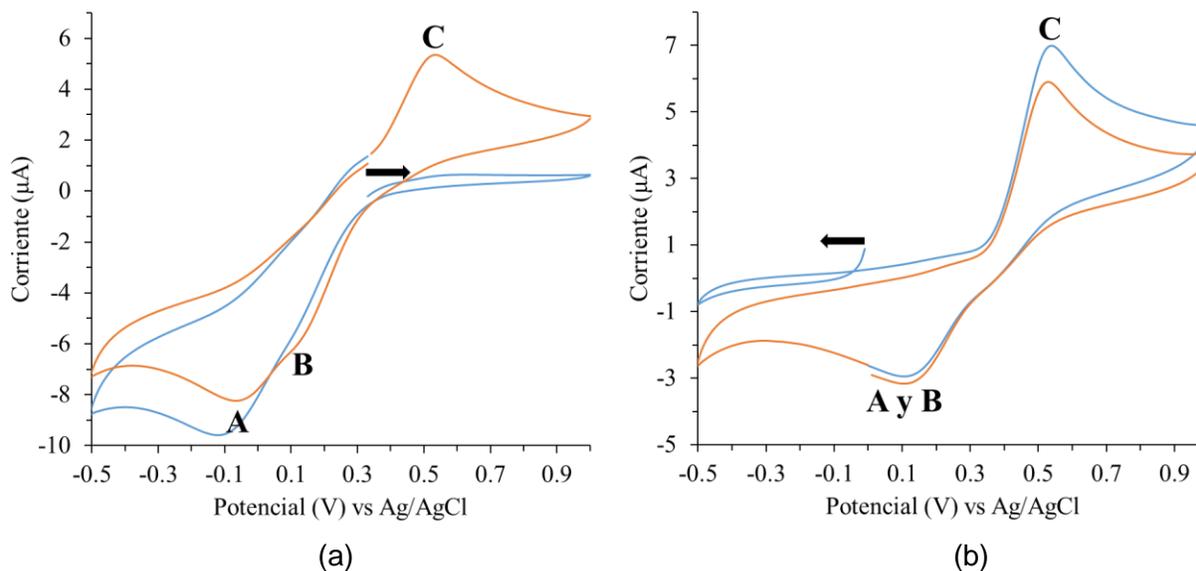
La polidopamina presenta tres señales electroquímicas, dos de reducción A y B y una de oxidación C (Figura 5). Los potenciales de las tres señales se desplazan a potenciales menores y su intensidad disminuye con el aumento del pH. Poseen un comportamiento nernstiano con buena linealidad en el intervalo de pH de 1 a 13, lo que indica que en cada proceso se transfiere un mismo número de protones y de electrones. Este comportamiento concuerda con lo previamente reportado [9, 22].



**Figura 5.** Comportamiento electroquímico de la polidopamina a diferentes pH por a) Voltamperometría cíclica y b) Voltamperometría diferencial de pulso.

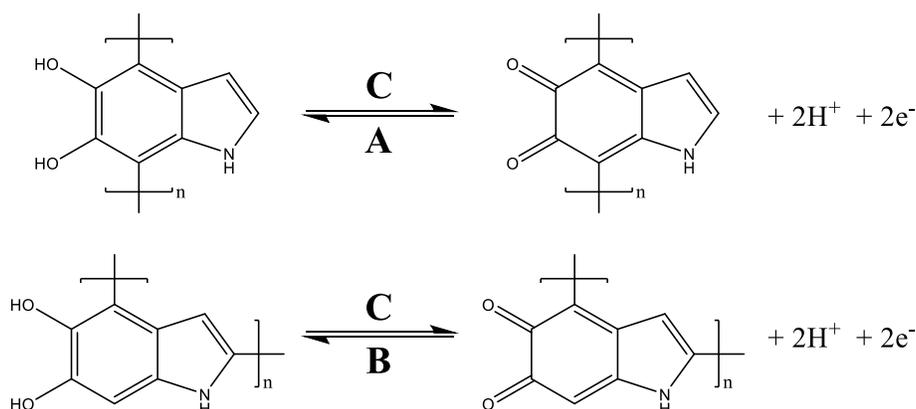
Para determinar si el proceso de óxido-reducción de la polidopamina es químicamente reversible se óxido la polidopamina a 1 V durante 20 minutos y en otro experimento se redujo a -0.5 V durante el mismo tiempo. En la Figura 6 se observa que una vez que se oxida la polidopamina y se barre en sentido anódico, la señal C no se presenta en el primer ciclo debido a que el polímero está totalmente oxidado; en el segundo ciclo la señal C vuelve a estar presente debido a la reducción de la polidopamina durante el primer ciclo. De manera análoga, una vez que la polidopamina se reduce completamente y se barre en sentido catódico no se observan las

señales A y B, pero al oxidarse la polidopamina, en el segundo ciclo aparecen las señales de reducción.



**Figura 6.** Proceso de óxido-reducción de la polidopamina.

Considerando la información anteriormente presentada, la aparición de las señales A, B y C se atribuyen a las dos formas en que las unidades de la polidopamina se unen (Figura 7). Donde la señal C se debe a la oxidación de las unidades de dopamina en la polidopamina sin importar su forma de unión, mientras que las señales A y B se deben cada una a la reducción de una de las dos formas de unión de la polidopamina. En todas las reacciones de óxido-reducción de las unidades de dopamina en la polidopamina están involucrados dos protones y dos electrones (Figura 7).



**Figura 7.** Reacción de óxido-reducción de la polidopamina.

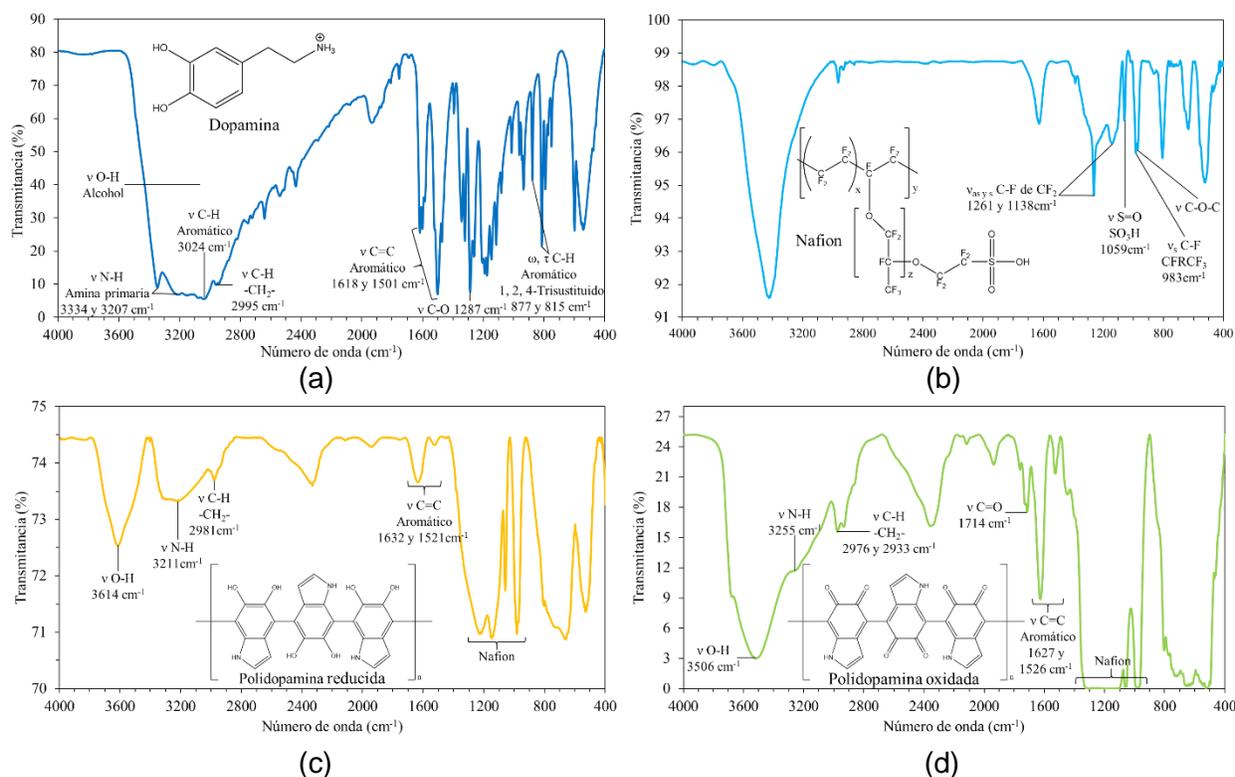
## Análisis por espectroscopia de Infrarrojo

### IR de Dopamina

En la Figura 8a se presenta el espectro de infrarrojo de la dopamina: Se observan las bandas características:  $\nu$  O-H banda ancha centrada en  $3200\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  N-H  $3334\text{ cm}^{-1}$  y  $3207\text{ cm}^{-1}$  de amina primaria,  $\nu$  C-H aromático a  $3024\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  C-H  $2995\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  C=C  $1618\text{ cm}^{-1}$  y  $1501\text{ cm}^{-1}$  de aromático,  $\nu$  C-O a  $1287\text{ cm}^{-1}$  y  $\omega$  y  $\tau$  C-H aromático 1, 2, 4-trisustituido a  $877\text{ cm}^{-1}$  y  $815\text{ cm}^{-1}$  [26].

### IR membrana de Nafion

En la Figura 8b se aprecian las bandas características de la membrana de Nafion:  $\nu_{\text{as}}$  y  $\nu_{\text{s}}$  C-F de  $-\text{CF}_2-$  en  $1261\text{ cm}^{-1}$  y  $1138\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, la de  $\nu$  S=O de  $\text{SO}_3\text{H}$  en  $1059\text{ cm}^{-1}$ , la banda  $\nu_{\text{s}}$  C-F de  $\text{CFRCF}_3$  a  $983\text{ cm}^{-1}$  y un hombro en esta señal a  $970\text{ cm}^{-1}$  de  $\nu$  C-O-C [27]. También se observa una banda ancha en  $3422\text{ cm}^{-1}$  y otra banda en  $1623\text{ cm}^{-1}$  ambas relacionadas con la presencia de agua en la membrana de Nafion como se señala en [28-29].



**Figura 8.** Espectros de IR a) dopamina b) membrana de Nafion c) polidopamina en su forma reducida y d) polidopamina en su forma oxidada.

#### IR Polidopamina reducida/Nafion

En la Figura 8c se presenta el espectro de IR de la polidopamina en su forma reducida. Se observan las bandas de la polidopamina:  $\nu$  O-H  $3614\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  N-H  $3211\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  C-H de  $-\text{CH}_2-$  en  $2981\text{ cm}^{-1}$ , y las bandas de  $\nu$  C=C de aromático en  $1632\text{ cm}^{-1}$  y  $1521\text{ cm}^{-1}$ , consistentes con una estructura de indol o indolina [13]. Además, en el espectro se presentan tres bandas anchas alrededor de  $3200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $650\text{ cm}^{-1}$  características de la polidopamina [13]. También se muestran las bandas de Nafion:  $\nu_{\text{as}}$  y  $\nu_{\text{s}}$  C-F de  $-\text{CF}_2-$  en  $1219\text{ cm}^{-1}$  y  $1149\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, la de  $\nu$  S=O de  $\text{SO}_3\text{H}$  en  $1060\text{ cm}^{-1}$ , la banda  $\nu_{\text{s}}$  C-F de  $\text{CFRCF}_3$  a  $983\text{ cm}^{-1}$  y un hombro en esta señal a  $975\text{ cm}^{-1}$  de  $\nu$  C-O-C [27].

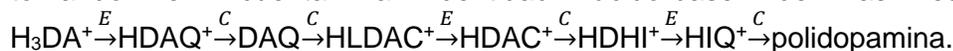
#### IR Polidopamina oxidada/Nafion

En la Figura 8d se presenta el espectro de IR de la polidopamina oxidada electroquímicamente. Se observan las señales características de la polidopamina:  $\nu$  N-H alrededor de  $3255\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  C-H de  $-\text{CH}_2-$  en  $2976\text{ cm}^{-1}$  y  $2933\text{ cm}^{-1}$ , las bandas de  $\nu$  C=C de aromático en  $1627\text{ cm}^{-1}$  y  $1526\text{ cm}^{-1}$  y la banda de C=O en  $1714\text{ cm}^{-1}$ , así como las señales de la membrana de Nafion  $\nu_{\text{as}}$  y  $\nu_{\text{s}}$  C-F de  $-\text{CF}_2-$  alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$ , la de  $\nu$  S=O de  $\text{SO}_3\text{H}$  en  $1057\text{ cm}^{-1}$ , la banda  $\nu_{\text{s}}$  C-F de  $\text{CFRCF}_3$  en  $975\text{ cm}^{-1}$  que se encuentra mezclada con la banda  $\nu$  C-O-C [27]. Este espectro es congruente con el reportado por [13] para la polidopamina oxidada con NaOCl. Comparando los espectros de IR de la dopamina reducida y oxidada se observan que la gran diferencia corresponde a la aparición de la señal de carbonilo en  $1714\text{ cm}^{-1}$ , que confirma que el proceso de oxidación electroquímica de la polidopamina se lleva a cabo. La banda  $\nu$  O-H  $3506\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la presencia de agua en la membrana.

## 4. Conclusiones

Se contribuyó a entender el comportamiento electroquímico de la dopamina en solución. A pH ácido ( $\text{pH} \leq 5$ ), únicamente presenta las señales de óxido-reducción del par  $\text{HDAQ}^+/\text{H}_3\text{DA}^+$ . A partir de pH 6 se observa la aparición de las señales correspondientes al par  $\text{HDAC}^+/\text{HLDAC}^+$  y a partir de pH 8 aparece la señal de oxidación de  $\text{HDHI}^+$  a  $\text{HIQ}^+$ . Las señales de óxido-reducción de los pares  $\text{HDAQ}^+/\text{H}_3\text{DA}^+$  y  $\text{HDAC}^+/\text{HLDAC}^+$  presentan un comportamiento nernstiano.

A partir de la información previamente reportada en la literatura y de nuestros resultados experimentales se propuso un mecanismo integral de electropolimerización ( $\text{pH}=7$ ) de la  $\text{H}_3\text{DA}^+$  tomando en cuenta la identidad ácido-base de las especies involucradas:



La polidopamina presenta tres señales electroquímicas, una de oxidación (señal C) y dos de reducción (señal A y B), todas poseen un comportamiento nernstiano con buena linealidad en el intervalo de pH de 1 a 13, en el cual están involucrados dos protones y dos electrones. El proceso de óxido-reducción de la polidopamina se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo.

## 5. Agradecimientos

JGC agradece al CONAHCyT la beca otorgada para realizar estudios de Maestría. CVU: 1265164. CAGV, MEPH, IPS, ISIO y JARA agradecen al SNII-CONAHCyT la distinción otorgada. El presente trabajo ha sido financiado gracias al apoyo de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

## 6. Referencias

- [1] S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, M. T. Ramírez-Silva, G. Rosquete-Piña, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé. On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution. Part I: The role of [SDS] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode. **609** [1], 17-26 (2007).
- [2] I. Ismail, T. Okajima, S. Kawauchi, T. Ohsaka. Studies on the early oxidation process of dopamine by electrochemical measurements and quantum chemical calculations. **211**, 777-786 (2016).
- [3] X.P. Zhang, W. Sun, S.H. Cao, W.L. Jiang, H. Peng, S.H. Cai, Z. Chen. NMR Spectroelectrochemistry in Studies of Dopamine Oxidation. **88** [3], 200–204 (2020).
- [4] X. Liu, J. Liu. Biosensors and sensors for dopamine detection. **2**, 20200102 (2021).
- [5] F. B. K. Eddin, Y. W. Fen. Recent Advances in Electrochemical and Optical Sensing of Dopamine. **20**, 1039 (2020).
- [6] M. Lakshmanakumar, N. Nesakumar, A. J. Kulandaisamy, J. B. B. Rayappan. Principles and recent developments in optical and electrochemical sensing of dopamine: A comprehensive review. **183**, 109873 (2021).
- [7] C. Lin, L. Chen, E. E. L. Tanner, R. G. Compton. Electroanalytical study of dopamine oxidation on carbon electrodes: from the macro- to the micro-scale. **20**, 148-157 (2018).
- [8] R. P. Bacil, L. Chen, S. H. P. Serrano, R. G. Compton. Dopamine oxidation at gold electrode s: mechanism y kinetics near neutral pH. **202** [2], 607-614 (2020).
- [9] M. Amiri, E. Amalil, A. Nematollahzadeh, S. Haneie. Poly-dopamine Films: Voltammetric Sensor for pH Monitoring. **228**, 53-58 (2016).
- [10] M. T. Cortés, C. Vargas, D. A. Blanco, I. D. Quinchnequa, C. Cortés, A. M. Jaramillo. Bionspired Polydopamine synthesis and its electrochemical characterization. **96** [6], 1250–1255 (2019).
- [11] D. R. Dreyer, D. J. Miller, B. D. Freeman, D. R. Paul, C. W. Bielawski. Elucidating the Structure of Poly(dopamine). **28** [15], 6428–6435 (2012).
- [12] B. Stöckle, D. Y. W. Ng, C. Meier, T. Paust, F. Bischoff, T. Diemant, J. R. Bhém, K. Gottschalk, U. Ziener, T. Weil. Precise Control of Polydopamine Film Formation by Electropolymerization. **346** [1], 73-81 (2014).
- [13] J. Szewczyk, D. Aguilar-Ferrer, E. Coy. Polydopamine films: Electrochemical growth and sensing applications. **174**, 111346 (2022).

- [14] L. C. Almeida, R. D. Correia, A. Marta, G. Squillaci, A. Morana, F. La Cara, J. P. Correia, A. S. Viana. Electrosynthesis of polydopamine films - tailored matrices for laccase-based biosensors. **480**, 979-989 (2019).
- [15] Y. Li, M. Liu, C. Xiang, Q. Xie, S. Yao. Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions. **497** [1-2], 270–278 (2006).
- [16] T. E. Young, B. W. Babbitt. Electrochemical study of the oxidation of alpha-methyldopamine, alpha-methylnoradrenaline, and dopamine. **48** [4], 562–566 (1983).
- [17] S. Schindler, T. Bechtold. Mechanistic insights into the electrochemical oxidation of dopamine by cyclic voltammetry. **836**, 94-101 (2019).
- [18] J. Jiang, Y. Cao, J. Liu, H. Zhang, G. Kan, K. Yu. Mass spectrometric observation on free radicals during electrooxidation of dopamine. **1193**, 339403 (2022).
- [19] G. Tan, Y. Liu, Y. Wu, K. Ouyang, L. Zhou, P. Yu, J. Liao, C. Ning. Electrically Reversible Redox-Switchable Polydopamine Films for Regulating Cell Behavior. **228**, 343-350 (2017).
- [20] L. C. Almeida, J. P. Correia, A. S. Viana. Electrochemical and optical characterization of thin polydopamine films on carbon surfaces for enzymatic sensors. **263**, 480-489 (2018).
- [21] L. C. Almeida, R. D. Correia, B. Palys, J. P. Correia, A. S. Viana. Comprehensive Study of the Electrochemical Growth and Physicochemical Properties of Polycatecholamines and Polycatechol. **386**, 138515 (2021).
- [22] P. Kanyong, S. Rawlinson, J. Davis. Fabrication and electrochemical characterization of polydopamine redox polymer modified screen-printed carbon electrode for the detection of guanine. **233**, 528-534 (2016).
- [23] A. E. Sánchez-Rivera, S. Corona-Avenidaño, G. Alarcón-Ángeles, A. Rojas-Hernández, M. T. Ramírez-Silva, M. A. Romero-Romo. Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants. **59** [13], 3193-3203 (2003).
- [24] H. Muguruma, Y. Inoue, H. Inoue, T. Ohsawa. Electrochemical Study of Dopamine at Electrode Fabricated by Cellulose-Assisted Aqueous Dispersion of Long-Length Carbon Nanotube. **120** [22], 12284–12292 (2016).
- [25] S. Li, H. Wang, M. Young, F. Xu, G. Cheng y H. Cong. Properties of Electropolymerized Dopamine and Its Analogues. **35** [5], 1119–1125 (2019).
- [26] J. E. Carter, J. H. Johnson, D. M. Bamke. DOPAMINE HYDROCHLORIDE. En K. Florey (Ed.), Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 11, 257-272 (1982).
- [27] Z. Liang, W. Chen, J. Liu, S. Wang, Z. Zhou, W. Li, G. Sun, Q. Xin. FT-IR study of the microstructure of Nafion® membrane. **233** [1-2], 39–44 (2004).
- [28] M. Ludvigsson, J. Lindgren, J. Tegenfeldt. FTIR study of water in cast Nafion films. **45** [14], 2267–2271 (2000).
- [29] A. Gruger, A. Régis, T. Schmatko, P. Colomban. Nanostructure of Nafion® membranes at different states of hydration: An IR and Raman study. **26** [2], 215-225 (2001).

## Remoción de metales pesados en presencia de un contaminante emergente utilizando *Euphorbia antisiphilitica* Zucc como bioadsorbente.

América Regina Gómez Galindo<sup>a</sup>, Mara Sarahí Florencio Martínez<sup>a</sup>, Iliana Margarita de la Garza Rodríguez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica., Blvd. Venustiano Carranza y Cárdenas Valdez S/N, Col. República Oriente, Saltillo, Coahuila. CP: 25280, México. Tel: +52 (844) 415 9534 ext 112, e-mail: [ilianagarza@uadec.edu.mx](mailto:ilianagarza@uadec.edu.mx)

### Resumen

En la actualidad es primordial la reutilización del agua contaminada por metales pesados y contaminantes emergentes debido a la disminución de fuentes naturales de donde se obtiene agua potable de buena calidad para las actividades domésticas e industriales, la implementación de diversos tratamientos biológicos, químicos y físicos ayudan a la remoción de este tipo de contaminantes presentes en los cuerpos de agua, en este trabajo se determinó la capacidad de remoción de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  presentes en disoluciones acuosas con y sin la presencia de paracetamol (contaminante emergente) utilizando el bagazo de *Euphorbia antisiphilitica* Zucc como bioadsorbente natural derivado de un proceso agroindustrial. Alcanzando a remover más del: 97% de Pb, 68% de Cr, 23% Cd y Ni 13%.

**Palabras clave.** Agua, Candelilla, Metales pesados, Paracetamol, Remoción.

### Abstract

Currently, the reuse of waste waters containing heavy metals and emergent pollutants has become fundamental due to the gradual diminution of natural water deposits used to supply industrial and domestic necessities, several biologicals, chemical, and physical methods have been implemented to remediate water to remove these pollutants. In this work, the capacity of removal for  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  in aqueous solution with, and without acetaminophen (emergent pollutant) was evaluated using *Euphorbia antisiphilitica* Zucc bagasse as a natural bioadsorbent obtained from agroindustrial processing. The bagasse removed 97% of Pb, 68% Cr, 23% Cd and Ni 13%.

**Keywords.** Water, Candelilla, Heavy Metals, Acetaminophen, Remotion.

## 1. Introducción

La contaminación del agua es una problemática derivada de la explosión demográfica y desarrollo humano, ya que se genera una gran cantidad de agua residual provenientes de la industria, hogares y centros de salud. A menudo contienen solventes orgánicos, residuos microbiológicos, metales pesados y más, recientemente, cantidades traza de los denominados “contaminantes emergentes”, los cuales se mantienen en las aguas residuales debido a un mal tratamiento de descargas de aguas domésticas, hospitalarias o industriales [1]. Algunos de los contaminantes de mayor preocupación son los metales pesados, estos se encuentran de forma natural en la corteza terrestre y son arrastrados por el agua de lluvia, sin embargo, actividades humanas como la extracción de minerales, el uso de plaguicidas, la fabricación de plásticos, baterías y pinturas, incrementan la concentración de los metales en los diferentes cuerpos de agua (aguas superficiales o subterráneas) [2]. Los metales pesados presentes en el agua tienen la facilidad de establecerse en ecosistemas naturales e introducirse a la cadena trófica, ya que no se pueden degradar con facilidad y tienen la capacidad de bioacumularse [3]. Actualmente se ha encontrado la presencia de metales pesados y metaloides como Hg, As, Pb, Cd, Zn, Cr y Ni en hortalizas como la lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa como consecuencia del uso de agua para riego contaminada [4]; de igual forma son capaces de acumularse en tejidos de animales de consumo humano, como mariscos, carne y pescados [2]. Las consecuencias de la exposición a metales pesados varían, sin embargo, los mecanismos de toxicidad de estos elementos se asocian a daño en órganos vitales, como el riñón, huesos y pulmones; hasta carcinogenicidad [5]. El Pb es un metal utilizado durante años debido a su resistencia a la corrosión, maleabilidad y facilidad para formar aleaciones; en el cuerpo humano este elemento no se metaboliza, sino que se absorbe, afectando tres compartimientos: la sangre, los tejidos blancos (riñón, médula ósea hígado y cerebro) y tejido mineralizado (huesos y dientes) [6]. Por otro lado, el Cd es un potente carcinógeno para el ser humano, afectando el tracto gastrointestinal y respiratorio; mientras que en las plantas disminuye la tasa de germinación de semillas [7]. Los padecimientos relacionados con la exposición al Cr involucran alteraciones nerviosas, necrosis de los túbulos renales, así como cáncer de estómago y pulmón, en crustáceos produce alteraciones en la reproducción mientras que en plantas produce daño a nivel de raíz y una disminución en la actividad enzimática [8]. Los efectos tóxicos asociados a este metal tienen que ver con reacciones alérgicas, tos, diarrea y dolor de cabeza; el principal órgano dañado es el riñón, sin embargo, no produce daño en los túbulos renales ni en la unión cortico-medular [9].

Los contaminantes emergentes son sustancias que por un largo tiempo han sido vertidas en los afluentes y fueron ignoradas debido a la falta de técnicas de identificación y cuantificación, estos contaminantes son continuamente introducidos al ambiente, algunos ejemplos de estos contaminantes son los insecticidas apolares, drogas de abuso y fármacos [10]. Entre los fármacos que se han encontrado en el ambiente, principalmente en los cuerpos de agua son los antibióticos, antiepilépticos, broncodilatadores,  $\beta$ -bloqueadores, antiinflamatorios y analgésicos [11]. El paracetamol (N-acetil-p-aminofenol) se utiliza principalmente como antipirético y analgésico por su acción inhibitoria de las enzimas COX-1 y COX-2 (ciclooxigenasa 1 y 2), para el tratamiento del dolor y la fiebre, así como para contrarrestar los síntomas de enfermedades como la gripe e influenza [12] su adquisición es fácil ya que no requiere receta médica para su

consumo. Se han detectado concentraciones trazas de paracetamol en el agua [13]. La presencia de este medicamento en los ecosistemas naturales ha tomado una mayor importancia debido a que la molécula del paracetamol inalterada es neurotóxica y citotóxica en organismos acuáticos [14], pero también se puede degradar, produciendo metabolitos orgánicos tóxicos, como por ejemplo derivados aromáticos o ácidos orgánicos nocivos para especies animales y el ser humano [15]. Al ser expuesta al sol durante un período de 10 a 30 días la molécula del paracetamol puede originar un compuesto altamente tóxico, el NAPQI (N-acetil-p-benzoquinoneimina), el cual tiene un alto potencial bioacumulativo [14], mientras que, en el ser humano, la exposición crónica y aguda genera hepatotoxicidad [16]. El paracetamol al ser una molécula orgánica tiene la posibilidad de interactuar con otros contaminantes presentes en el agua, por ejemplo, los metales pesados. Estos últimos pueden interactuar con diversos compuestos farmacéuticos para formar complejos, en estos casos el fármaco actúa como ligando. El paracetamol actúa como un agente quelante formando complejos de coordinación, es capaz de interactuar con Mg, Ca, Ba, Sr, Cu, Ni y Al; estos complejos tienen la característica de tener un intercambio lento metal-ligando, lo cual les brinda actividad antimicrobiana. Los grupos funcionales pertenecientes al paracetamol que interactúan con los metales son el carbonilo y el grupo -OH [17], comúnmente se le considera un ligando bidentado, sin embargo, en la literatura se reporta que en el caso de cationes trivalentes participa, además, el grupo -NH [18]. En la actualidad, se conocen diversos procesos para el tratamiento de agua contaminada con metales pesados, uno de estos procesos es el uso de bioadsorbentes que se obtienen de los residuos generados por las actividades agroindustriales cuya importancia radica en la gran cantidad de grupos funcionales como -COOH, -OH y -NH presentes en los compuestos de hemicelulosa, celulosa y lignina de dichos residuos [19]. Estos grupos funcionales pueden formar puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas hidrofóbicas, enlaces iónicos, fuerza de Van der Waals con los contaminantes, permitiendo así su remoción [20]. Uno de los residuos agroindustriales que se obtienen en el estado de Coahuila es el bagazo de la *Euphorbia antisyphilitica* Zucc utilizada para extraer la cera [21], dentro del procedimiento se utiliza el ácido sulfúrico, lo cual, modifica la estructura de bagazo, permitiendo obtener un bioadsorbente que favorece la remoción de metales pesados. En este trabajo se estudió la capacidad de remoción de Cd, Cr, Ni y Pb en disolución acuosa con y sin paracetamol, utilizando el bagazo de *Euphorbia antisyphilitica* Zucc como bioadsorbente natural.

## 2. Experimental

### 2.1. Tratamiento del residuo de *Euphorbia antisyphilitica* Zucc (cera de candelilla)

El bagazo de *Euphorbia antisyphilitica* Zucc (candelilla) fue recolectado en el Ejido "El Cinco" en el municipio de Sierra Mojada, Coahuila, el bagazo se colocó bajo el chorro de agua del grifo para remover el exceso de suelo, después se enjuaga con agua desionizada, se colocó en papel estraza para remover el exceso de humedad, se llevó a la estufa a 80°C durante 2 horas. Una vez seco el bagazo se llevó a un procesador de alimentos para disminuir su tamaño y se tamizó utilizando un Rotap con tamiz de malla 100 (tamaño de partícula  $\leq$  a 149  $\mu\text{m}$ ). En un vaso de precipitado con capacidad de 250 mL se pesaron 10 g de las partículas finas y se añadieron 40 mL de agua desionizada, posteriormente se llevaron a un baño de sonicación a una frecuencia

de 40 MHz durante 25 minutos, se filtraron con un sistema de filtración al vacío, este proceso de lavado se repitió hasta observar que no se presentara alguna señal que pueda dar color y/o turbiedad al agua.

## 2.2. *Empaque del bioadsorbente en columnas*

Se prepararon columnas utilizando tubos de teflón de 4 cm x 0.5 cm de diámetro interno (D.I.), empacadas con 0.005 g de bioadsorbente, para evitar la pérdida del bioadsorbente se colocó algodón en cada extremo de las columnas.

## 2.3. *Preparación de disoluciones*

Para preparar los dos multiestándares se utilizaron estándares de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Cr, Ni y Pb (Acustandard, USA), y se aforaron con agua desionizada

(A) Multiestándar de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Cr, Ni y Pb sin paracetamol.

(B) Multiestándar de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Cr, Ni y Pb con 5 mg/L de paracetamol.

Se prepararon series de cinco estándares de cada metal estudiado. El intervalo de trabajo de cada metal se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1.** Intervalo de trabajo de Cd, Cr, Ni y Pb

Metal	Intervalo
Cd	0.2 a 1 mg L <sup>-1</sup>
Cr	0.5 a 2.5 mg L <sup>-1</sup>
Ni	0.3 a 1.5 mg L <sup>-1</sup>
Pb	0.5 a 2.5 mg L <sup>-1</sup>

## 2.4. *Procedimiento general de remoción*

Se acopla la columna empacada con el bioadsorbente en un sistema semiautomatizado (conformado por una bomba peristáltica de cuatro canales, tubería de tygon de D.I. de 0.5 cm. y tubería de teflón con un D.I. de 0.5 cm.), se hace pasar 4 mL de agua desionizada para hidratar la columna, después se hace pasar 15 mL del multiestándar a un caudal de 2 mL/min, la disolución se recolecta en tubos de ensayo y se llevan a su lectura en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Flama (EAAF Varian AAS240FS). Este procedimiento se realizó por triplicado utilizando diferentes columnas empacadas para cada multiestándar.

### 3. Resultados y Discusión

En la figura 1 se presentan los espectros UV/Vis que se obtuvieron de las partículas  $\leq$  a  $149 \mu\text{m}$  que se lavaron. Se observó que en el primer lavado el agua recuperada presentó un color negro, el cual se atribuye a las partículas más finas que al solvarse forman un coloide y al decantar se eliminan, observando que el espectro del sobrenadante presenta una gran turbiedad, esto se observó hasta el quinto lavado ya que el agua presentó una coloración transparente verdosa y se observa una señal desde 200-250 nm, que se atribuye a las transiciones electrónicas  $n-\sigma^*$ ,  $\pi-\pi^*$  y de transferencia de carga que se obtienen por la presencia de grupos funcionales como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  y  $-\text{NH}$  y a la presencia de grupos aromáticos presentes en la celulosa, hemicelulosa y lignina, además se observa un pico en 280 nm característico de transiciones electrónicas  $n-\pi^*$  y de transferencia de carga que se atribuyen al grupo funcional  $-\text{OH}$ , el espectro del sexto lavado presenta las señales características de las transiciones electrónicas antes mencionadas, solo se observa la disminución de la absorbancia en todo el espectro, a partir del decimoséptimo lavado la señal en 280 nm se mantuvo constante en una absorbancia de 0.1831, con estas partículas se realizó las pruebas de remoción.

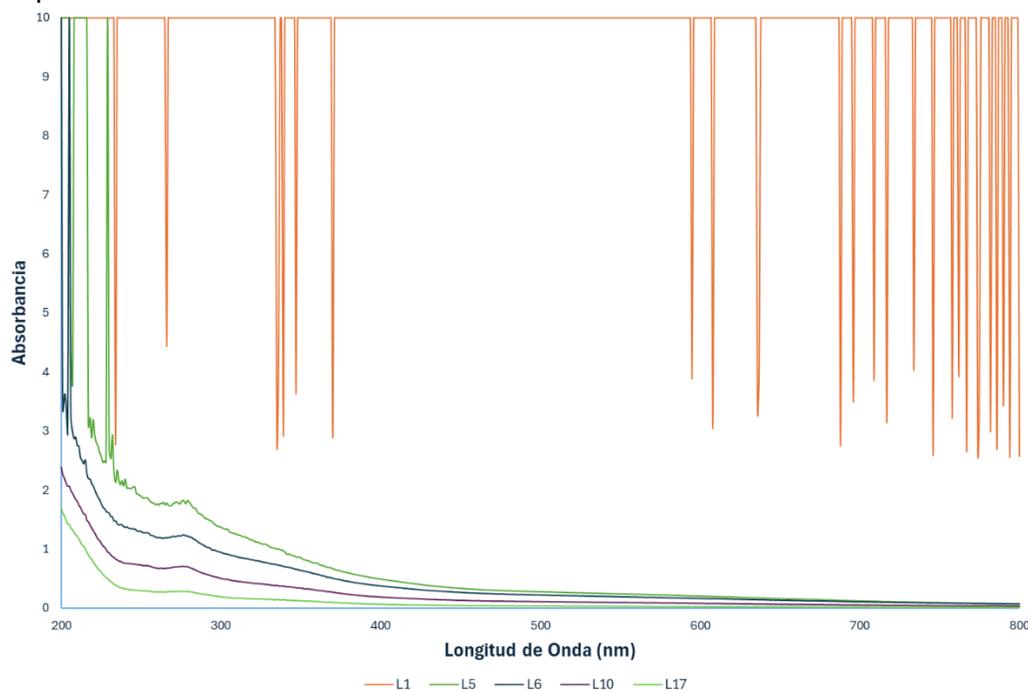
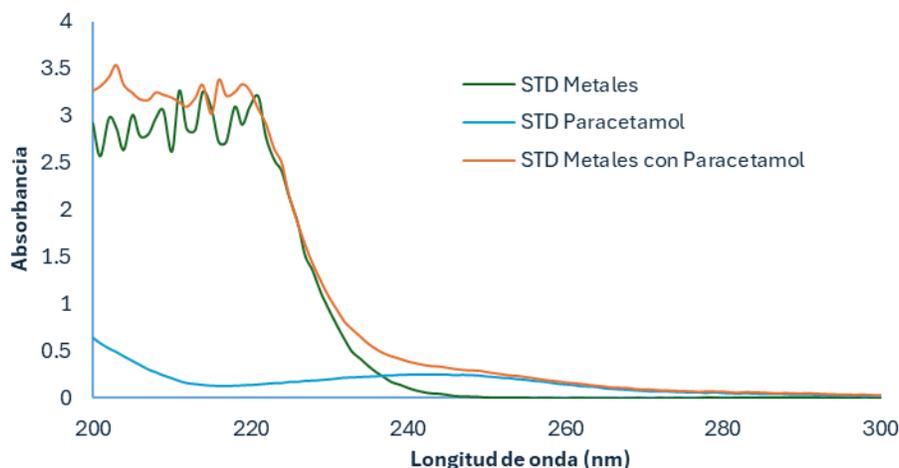


Figura 1. Espectros de UV-Vis de los lavados del residuo de *Euphorbia antisiphilitica* Zucc.

En la figura 2 se presentan los espectros de UV-Vis de los estándares utilizados, así como la mezcla de metales y paracetamol. Observando que en 245 nm se encuentra la señal característica del paracetamol, la mezcla de metales con paracetamol sigue manteniendo la señal en la misma longitud de onda y a la misma absorbancia, sin embargo, a longitudes de onda menores se observa la contribución de la señal de los metales y el paracetamol.



**Figura 2.** Espectros de UV-Vis obtenidos del multiestándar de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Cr, Ni y Pb, estándar de 5 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol y del multiestándar de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Cr, Ni y Pb con 5 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol.

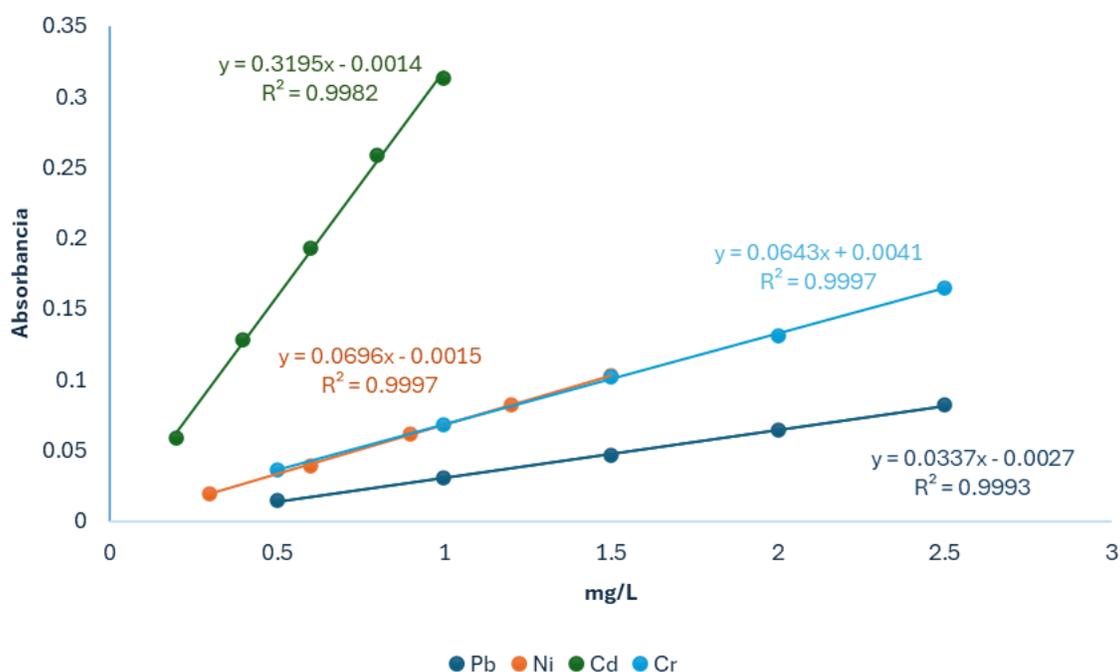
Previo a la cuantificación de cada metal estudiados se realizó la curva de calibrado de cada metal, utilizando los parámetros instrumentales que se presentan en la tabla 2. En la figura 3 se observan las curvas de calibrado y las ecuaciones de las rectas que se utilizaron para la cuantificación de cada metal y en la tabla 3 se presentan los límites de detección de cada metal, los cuales se obtuvieron utilizando tres veces la desviación típica del blanco entre la pendiente de la curva de calibrado del metal de estudio ( $LD=(3S_B)/m$ ).

**Tabla 2.** Parámetros instrumentales utilizados en la cuantificación de metales del presente ensayo.

Metal	Slit (nm)	$\lambda$ (nm)	Flujo aire/acetileno (L/min)	Corriente de lámpara
Cd	0.5	228.8	13.88/2.29	4
Cr	0.2	357.9	13.33/3.04	6
Ni	0.2	232	14.03/2.25	5
Pb	1	217	13.75/2.14	11

**Tabla 3.** Límites de detección de los metales estudiados.

Metal	LD mg L <sup>-1</sup>
Cd	0.0014
Cr	0.0070
Ni	0.0009
Pb	0.0087



**Figura 3.** Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibrado utilizadas para la cuantificación de Cd, Cr, Ni y Pb.

En la figura 4 a y b se presentan los porcentajes de remoción que se calcularon a partir de las concentraciones que se obtuvieron de cada metal en las disoluciones recuperadas después del procedimiento general de remoción utilizando los dos multiestándares.

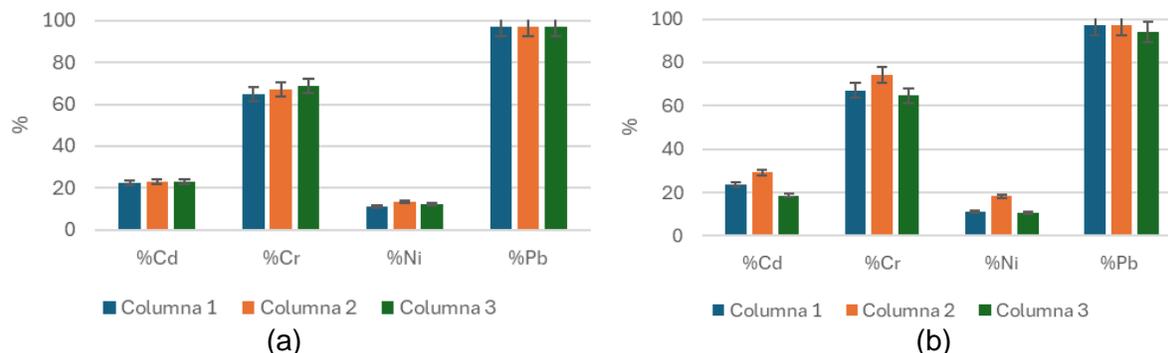


Figura 4. a) Porcentajes de remoción en ausencia de paracetamol. b) Porcentajes de remoción en presencia de paracetamol.

Para determinar si hay diferencias significativas entre los porcentajes de remoción promedio con y sin paracetamol se realizó la prueba estadística *t de student* (ver tablas 4 y 5), así como, la comparación de las varianzas utilizando la prueba estadística de Fischer.

Tabla 4. Resultados obtenidos con las pruebas estadísticas *t* y *F* para los porcentajes de remoción de Cd y Cr con y sin paracetamol.

Cd	Variable 1	Variable 2	Cr	Variable 1	Variable 2
Media	23.83	22.67	Media	68.65	66.83
S	5.283	0.1198	S	5.023	1.859
n	3	3	n	3	3
$t_{Exp}$	0.3805		$t_{Exp}$	0.5884	
$F_{Exp}$	1945		$F_{Exp}$	7.300	
$t_{Teo}$	2.920		$t_{Teo}$	2.920	
$F_{Teo}$	4.303		$F_{Teo}$	4.303	

**Tabla 5.** Resultados obtenidos con las pruebas estadísticas *t* y *F* para los porcentajes de remoción de Ni y Pb con y sin paracetamol.

Ni	Variable 1	Variable 2	Pb	Variable 1	Variable 2
<b>Media</b>	13.39	12.26	<b>Media</b>	97.29	96.19
<b>S</b>	4.199	1.285	<b>S</b>	0.000	1.910
<b>n</b>	3	3	<b>n</b>	3	3
<b>t<sub>Exp</sub></b>	0.4474		<b>t<sub>Exp</sub></b>	1.000	
<b>F<sub>Exp</sub></b>	10.67		<b>F<sub>Exp</sub></b>	0	
<b>t<sub>Teo</sub></b>	2.920		<b>t<sub>Teo</sub></b>	2.920	
<b>F<sub>Teo</sub></b>	4.303		<b>F<sub>Teo</sub></b>	4.303	

Al observar los resultados de las pruebas estadísticas podemos decir que no hay diferencias significativas entre los promedios del porcentaje de remoción de Cd, Cr, Ni y Pb con y sin paracetamol, sin embargo, la precisión de la remoción presenta diferencias significativas con la presencia del paracetamol para Cd, Cr y Ni, esto se atribuye a que el paracetamol tiene mayor afinidad con el bioadsorbente aumentando así los sitios que pueden reaccionar con los metales. Solo el Pb no presentó diferencias significativas en la precisión con y sin paracetamol.

#### 4. Conclusiones

La remoción de los metales de estudio utilizando el bagazo de *Euphorbia antisyphilitica* Zucc como bioadsorbente natural se puede realizar con o sin la presencia del paracetamol, se alcanzó a remover más del: 97% de Pb, 68% de Cr, 23% Cd y una menor remoción de Ni de del 13%. Sin embargo, con la presencia de paracetamol se observa que la precisión fue menor por lo que se seguirá estudiando este comportamiento al determinar si el paracetamol se retiene en el bioadsorbente, además como perspectiva en base a los resultados obtenidos en este estudio es posible reutilizar el desecho agroindustrial de la producción de cera de candelilla como un potencial bioadsorbente de metales pesados en agua, brindándole al residuo un uso particular, favoreciendo su reutilización y contribuyendo a la economía circular del municipio de Sierra Mojada, Coahuila.

## 5. Agradecimientos

Se agradece a los responsables del Laboratorio de Química Analítica Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por facilitar los insumos, materiales e Instrumentación para realizar este proyecto de investigación.

## 6. Referencias

- [1] R. M., Galván. Contaminación emergente: sustancias prioritarias y preferentes, productos farmacéuticos, drogas de abuso, disruptores endocrinos, microplásticos y patógenos emergentes. *TecnoAqua*, **24**, 66–77 (2017).
- [2] Y. C. Reyes, I. Vergara, O. E. Torres, M. Díaz, & E. E. González. Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación Y Desarrollo*, **16**(2), 66–77 (2016).
- [3] C. D. Klaasen, J. B. Watkins III. Unidad 5: Agentes Tóxicos. En *Manual de Toxicología* (5a ed., Vol. 1, pp. 659–723). McGraw Hill. (2001).
- [4] D. Miranda, C. Carranza, C. A. Rojas, C. M. Jerez, G. Fischer, J. Zurita. Acumulación de metales pesados en suelo y plantas de cuatro cultivos hortícolas, regados con agua del río Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, **2**(2), 180-191 (2008).
- [5] Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista internacional de contaminación ambiental*, **33**, 7-21 (2017).
- [6] R. González Figueroa. Estudio de la toxicidad letal y subletal de los metales Co, Cr, Mg y Pb, y sus rutas de entrada y distribución en el rotífero *Euchlanis dilatata* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Aguascalientes. (2021).
- [7] Montoya, N. P. M., Casas, P. A., & Wandurraga, C. C. Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia y Tecnología para la salud visual y ocular*, **8**(1), 77-88 (2010).
- [8] M. E. Beltrán Pineda, A. M. Gómez Rodríguez. Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. *Investigación, Innovación E Ingeniería*, **2**, 83–112 (2015).
- [9] Serrano, M. R., de la Casa, N. M., Puertas, M. D. C. R., del Río, L. A., & Sandalio, L. M. (2008). Toxicidad del cadmio en plantas. *Ecosistemas: Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, **17**(3), 12.
- [10] L. D. Barceló., M. J. López De Alda. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Impluvium*, **17**, 12–18 (2021).
- [11] C. Tejada, E. Quiñonez, M. Peña. Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una revisión. *Facultad De Ciencias Básicas*, **10**, 80–101 (2014).
- [12] E. Dietrich, A. Talana. Agentes antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos. En *Farmacología* (7th ed., pp. 902–932). Lippincott's Illustrated Reviews. (2019).

- [13] S. Ortiz De García, G. Pinto Pinto, P. García Encina, R. Irusta Mata. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Science of the Total Environment*, **444**, 451–465 (2013).
- [14] R.L. Acevedo Barrios, C.A. Ceveriche Sierra, J. Del Carmen Jaimes Morales. Efectos tóxicos del paracetamol en la salud humana y el ambiente. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, **8**, 139–149 (2017).
- [15] B. Nunes, M.F. Verde, A.M. Soares. Biochemical effects of the pharmaceutical drug paracetamol in Anguilla. *Environ Sci Pollut Res*, **22**, 11574–11584 (2015).
- [16] I. A. Sisamón. Acerca de la hepatotoxicidad del paracetamol. *Revista Del Hospital Privado De Comunidad*, **6**. (2003).
- [17] J.A. Obaleye, A.A. Aliyu, A.O. Rajee, K.E. Bello. Synthesis and Solid-State Characterization of Zn (II) Metal Complex with Acetaminophen. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **35**, 77–86 (2021).
- [18] M.A. Sultan, A.E. Karim, A. Kandory, A. Al-metwali. Synthesis and characterization of Al (III) complex with paracetamol. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, **10**(1), 156–159 (2020).
- [19] J.M. Sanchez Silva, R.R. González Estrada, F.J. Blancas Benitez, A. Fonseca Cantabrana. Utilización de subproductos agroindustriales para la bioadsorción de metales pesados. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, **23**, 1–18 (2020).
- [20] N. A. Cuizano, A.E. Navarro. Biosorción de metales pesados por algas marinas: Una posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Anales de Química de la RSEQ*, **104**, 120-125 (2008).
- [21] M. Maldonado-Ortiz, P.M. López-Serrano, R.D. Váldez-Cepeda, R. Mata-González, R. García F. González, M. Martínez-Salvador. Ecuaciones para estimar biomasa total de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) en Chihuahua. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, **13**, 173-200 (2022).

# Interpretación de las valoraciones de soluciones de diclofenaco sódico y de ftalato ácido de potasio con ácido perclórico, en ácido acético glacial

Rubén Guerra-Flores<sup>a</sup>, Dafne Sarahia Guzmán Hernández<sup>b</sup>, Alberto Rojas-Hernández<sup>a\*</sup>, Jorge Juárez Gómez<sup>a</sup>, Damaris Rodríguez-Barrientos<sup>a</sup>, Ma. Teresa Ramírez-Silva<sup>a</sup>

a Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, Iztapalapa, C.P. 09310 Ciudad de México, CDMX Tel: +52 (55) 58 04 46 70, e-mail: [\\*suemi918@xanum.uam.mx](mailto:suemi918@xanum.uam.mx).

b CONAHCYT- Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco #186, Col. Vicentina, México, D.F., C.P. 09310. Tel: +52 (55) 58 04 46 70, e-mail: [dsguzman@conahcyt.mx](mailto:dsguzman@conahcyt.mx)

## Resumen

Este trabajo presenta un estudio sobre las valoraciones potenciométricas del diclofenaco sódico y ftalato ácido de potasio con ácido perclórico en ácido acético glacial como disolvente. Se aplica el método de Charlot para analizar los equilibrios que describen las reacciones de valoración. En este contexto, se considera que el solvente permite que un analito, que actúa como base débil en medio acuoso, se comporte como base fuerte en el ácido acético glacial. Además, al tratarse de un disolvente de baja constante dieléctrica, los solutos tienden a formar pares iónicos que son capaces de generar una reacción de neutralización del valorante y la fuerza básica del acetato alcalino formado a partir de la reacción del analito con el valorante va a depender del ion alcalino asociado al ion acetato, lo que también puede afectar a la cuantitatividad de la reacción.

**Palabras clave.** *valoraciones potenciométricas en disolventes no acuosos, ácido acético glacial, diclofenaco sódico, ftalato ácido de potasio.*

## Abstract

This work presents a study on the potentiometric titrations of sodium diclofenac and potassium hydrogen phthalate with perchloric acid in glacial acetic acid as solvent. Charlot's method is applied to analyze the equilibria that describes the titration reactions. In this context, it is considered that the solvent allows an analyte, which acts as a weak base in aqueous medium, to behave as a strong base in glacial acetic acid. Furthermore, due to it's a solvent with low dielectric constant, solutes tend to form ionic pairs which can generate a neutralization reaction with the titrant, and the basic strength of the alkaline acetate formed from the reaction of the analyte with the titrant will depend on the alkaline ion associated with the acetate ion, which may also affect the quantitative nature of the reaction.

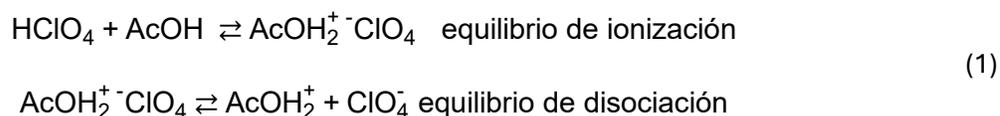
**Keywords.** *potentiometric titrations in non-aqueous solvents, glacial acetic acid, sodium diclofenac, potassium hydrogen phthalate.*

## 1. Introducción

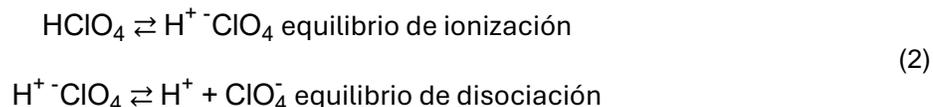
Actualmente, se reconoce la gran importancia del estudio de la química en disolventes no acuosos, ya que estos son ampliamente utilizados en metodologías de cuantificación en diversas áreas de la industria y en procedimientos estandarizados en las farmacopeas –nacional e internacionales– para la cuantificación de diferentes sustancias. Además, los disolventes no acuosos son esenciales en el análisis cualitativo y cuantitativo de especies que presentan baja solubilidad en medio acuoso pero alta reactividad en estos solventes [1].

El ácido acético glacial es uno de los disolventes no acuosos más utilizados en laboratorios de análisis químico, así como en la industria, la investigación y la enseñanza, debido a su bajo costo y fácil disponibilidad. Este disolvente se caracteriza por su baja constante dieléctrica ( $\epsilon = 6.2$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ), en comparación con el agua ( $\epsilon = 79.99$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) [2]. A diferencia del medio acuoso, donde los pares iónicos están completamente disociados, en ácido acético glacial predominan los pares iónicos, mientras que la cantidad de iones completamente disociados es mínima.

El ácido perclórico es comúnmente empleado como valorante debido a que en ácido acético glacial es el ácido más fuerte [2]. Así, la disociación del ácido perclórico en ácido acético glacial se expresaría como se muestra en el conjunto de equilibrios (1).



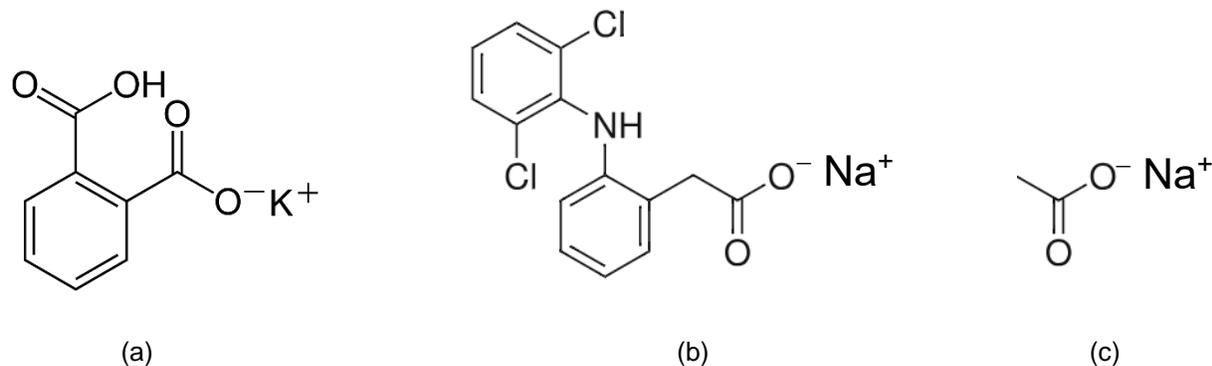
De acuerdo con Charlot [2], la escritura del protón solvatado en ácido acético glacial ( $\text{AcOH}_2^+$ ) se puede simplificar a  $\text{H}^+$ , dejando implícita la escritura del ácido acético ( $\text{AcOH}$ ) en los equilibrios químicos. Por lo tanto, el conjunto de equilibrios (1) se puede escribir como se muestra en el conjunto de equilibrios (2).



Se sabe que, en ácido acético glacial, la disociación de los iones puede ser muy pequeña [2].

En este trabajo, se estudian las valoraciones del ftalato ácido de potasio (conocido como estándar primario para estandarizar ácidos de Brønsted) y del diclofenaco sódico con ácido perclórico en ácido acético glacial, comparando estas dos valoraciones con la valoración del acetato de sodio usando el mismo titulante, e interpretando los resultados con un modelo surgido del método de estudio de Charlot [2].

En la Figura 1 se muestran las fórmulas desarrolladas de las sustancias usadas en este trabajo.



**Figura 1.** Fórmulas desarrolladas de los reactivos valorados en este trabajo con ácido perclórico en ácido acético glacial. a) Ftalato ácido de potasio, KHfT. b) Diclofenaco sódico, NaDic. c) Acetato de sodio, NaAcO.

## 2. Experimental

Todos los reactivos son de grado analítico: ácido acético glacial (Merck), anhídrido acético (Merck) 97%, ácido perclórico (Baker ACS) 69 %, ftalato ácido de potasio (Sigma Aldrich) 100.5 %, diclofenaco sódico (Sigma) 98 %, acetato de sodio trihidratado (Baker) 101.3 %, reactivo indicador de violeta de genciana (Baker Analyzed).

Las valoraciones potenciométricas de ftalato ácido de potasio (KHfT), de diclofenaco sódico (NaDic) y acetato de sodio (NaAcO), en ácido acético glacial (AcOH), se llevaron a cabo con un titulador automático 905 Titrande de la marca Metrohm. Se estandariza una solución de ácido perclórico en ácido acético glacial de concentración nominal 0.1 M (con la cantidad adecuada de anhídrido acético para transformar el agua en ácido acético) con estándar de ftalato ácido de potasio. La calibración del titulador se hizo con soluciones *buffer* de pH 4.00, 7.00 y 10.00 en agua. Se valoran 25 mL con la solución del electrolito en cuestión (KHfT, NaDic o NaAcO) en ácido acético glacial, de concentración nominal 0.02 M; con el ácido perclórico estandarizado (de concentración nominal 0.1 M), también en ácido acético glacial. Todas las valoraciones se llevaron a cabo utilizando una unidad de dosificación de 20 mL con una mínima adición de 2  $\mu$ L y un electrodo combinado de vidrio para mediciones de potencial o pH en medio no acuoso (Solvotrode de Metrohm).

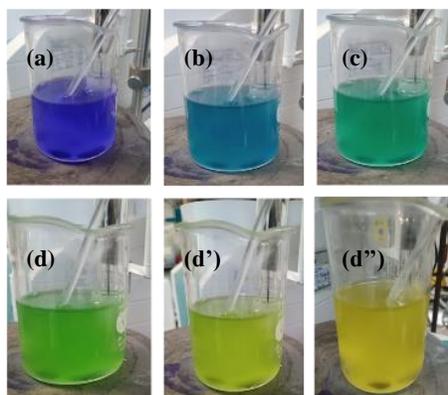
## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Estandarización de ácido perclórico con ftalato ácido de potasio

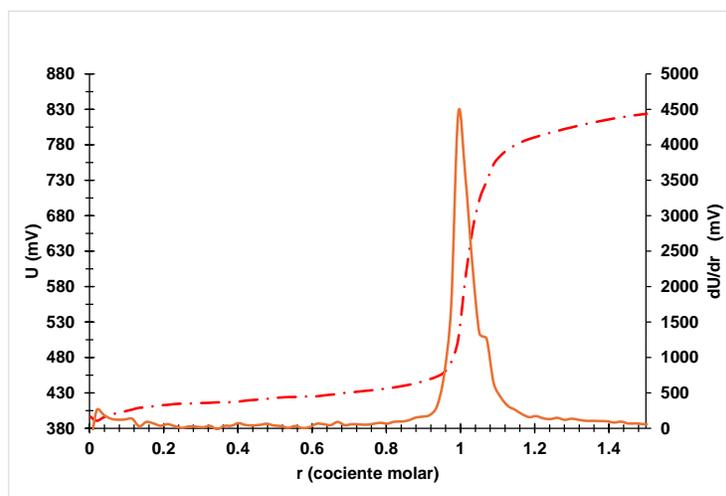
Para llevar a cabo las valoraciones en medio no acuoso, se utilizó como solvente ácido acético glacial y como valorante ácido perclórico. Se estandariza el ácido perclórico con KHfT, mediante potencimetría con 3 gotas del indicador violeta de genciana al 1% (m/V). Al agregar el indicador la solución toma un color violeta. Conforme se agrega ácido perclórico a la solución de KHfT, el

color de la solución va cambiando al azul, luego al verde turquesa y finalmente al amarillo (ver Figura 2).

La valoración también se siguió potenciométricamente, obteniéndose la Figura 3. Así, el color mostrado en la Figura 2c coincide con la variación brusca de la diferencia de potencial (U) en la curva de valoración de la Figura 3, y con el cociente molar del máximo en su primera derivada. También hay que recordar que un aumento de la diferencia de potencial implica una mayor acidez (o un pH menor).



**Figura 2.** Cambio de color observado para el violeta de genciana al titular 25 mL de ftalato ácido de potasio 0.02 M con ácido perclórico de concentración nominal 0.1 M. a) Al inicio de la valoración, b) antes del volumen del punto de equivalencia, c) en el volumen del punto de equivalencia y d, d', d'') con un exceso de valorante.

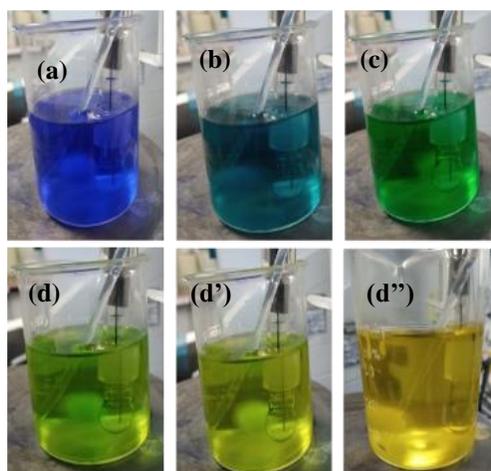


**Figura 3.** Curvas obtenidas para la valoración de 25 mL de ftalato ácido de potasio, de concentración nominal 0.02 M, con ácido perclórico (de concentración nominal 0.1 M). La curva en línea de punto y raya es la curva de valoración de potencial (U) como función del cociente molar (r, cantidad de sustancia del titulante con respecto al analito titulado), en tanto que la curva en línea continua anaranjada es la de su primera derivada, con respecto al cociente molar.

Es interesante señalar que, al ir añadiendo el ácido perclórico durante la titulación del KHfT, se va formando una fase insoluble blanca que hace que la solución se vea turbia (ver Figura 2).

### 3.2. Valoración del diclofenaco sódico con el ácido perclórico.

La valoración de diclofenaco sódico se llevó a cabo utilizando el ácido perclórico estandarizado mediante potenciometría y tres gotas con el indicador violeta de genciana al 1 % (m/V), tomando la solución un color violeta. Otra vez, al ir añadiendo el ácido perclórico, el color de la solución va cambiando del violeta al azul, al verde y, finalmente, al amarillo. Esto se observa en la Figura 4.



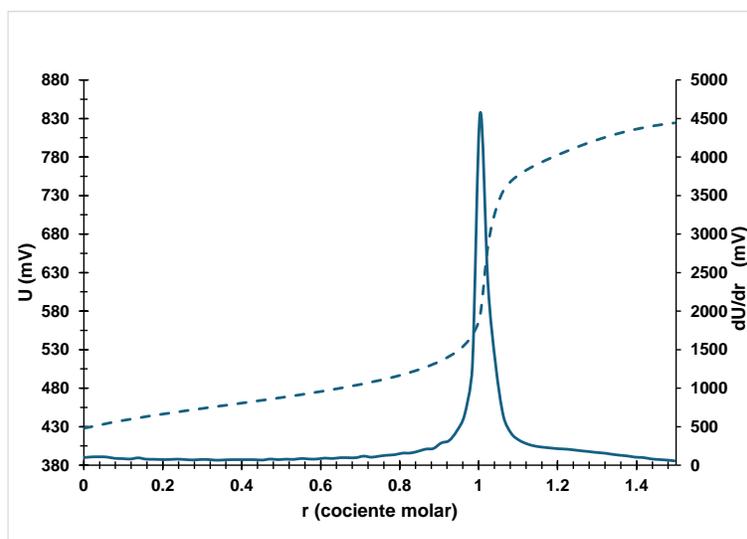
**Figura 4.** Cambio de color observado para el violeta de genciana al titular 25 mL de diclofenaco sódico 0.02 M con ácido perclórico de concentración nominal 0.1 M. a) Al inicio de la valoración, (b) antes del volumen del punto de equivalencia, (c) en el volumen del punto de equivalencia y d, d' y d'' con un exceso de valorante.

Las curvas potenciométricas de la Figura 5 muestran que el color de la solución en la Figura 4c se observa cuando, en la curva de valoración, la diferencia de potencial (U) presenta una variación brusca y en la curva de su primera derivada se alcanza el máximo.

Debe notarse que la tonalidad del color del indicador en el punto de equivalencia de esta valoración, de NaDic, es distinta a la observada en la titulación del KHfT. Por otra parte, en esta valoración (de NaDic) no se observa la formación de un precipitado, a diferencia de lo observado en la valoración del KHfT. Finalmente, comparando las curvas de la Figura 5 con las correspondientes de la Figura 3 se puede decir que la reacción observada en la valoración de KHfT es más cuantitativa que en el caso de la valoración de NaDic.

### 3.3. Interpretación de las curvas de valoración del NaDic y de KHfT con HClO<sub>4</sub>

Las diferencias observadas en el comportamiento de estas dos sales con el ácido perclórico podrían explicarse con reacciones de valoración en donde los pares iónicos de los electrolitos reaccionan directamente con el ácido perclórico. Sin embargo, es bien sabido que aminas que son débiles en solución acuosa se comportan como bases fuertes en solución de ácido acético glacial. Por lo tanto, ¿no podría ocurrir que carboxilatos que son bases débiles en solución acuosa también se comportan como bases fuertes en solución de ácido acético glacial?



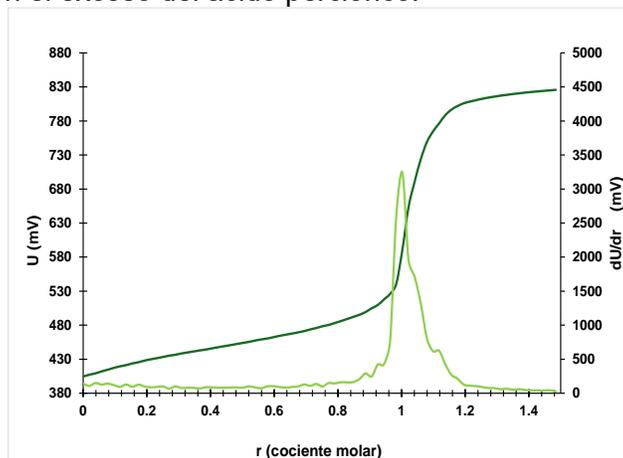
**Figura 5.** Curvas obtenidas para la valoración de 25 mL de diclofenaco sódico de concentración 0.02 M con ácido perclórico de concentración nominal 0.1 M. La curva en línea punteada es la curva de valoración de potencial (U) como función del cociente molar (r) de la cantidad de sustancia del HClO<sub>4</sub> con respecto al NaDic, en tanto que la curva en línea continua es la de su primera derivada con respecto al cociente molar.

Aunque esta pregunta podría responderse en forma afirmativa, debe tenerse cuidado al generalizar el comportamiento de las aminas a los carboxilatos, ya que las aminas son sustancias neutras, en tanto que los carboxilatos son aniones, por lo que su comportamiento ácido-base de Brønsted es diferente por los contraiones catiónicos asociados a los carboxilatos (en este caso los iones sodio y potasio).

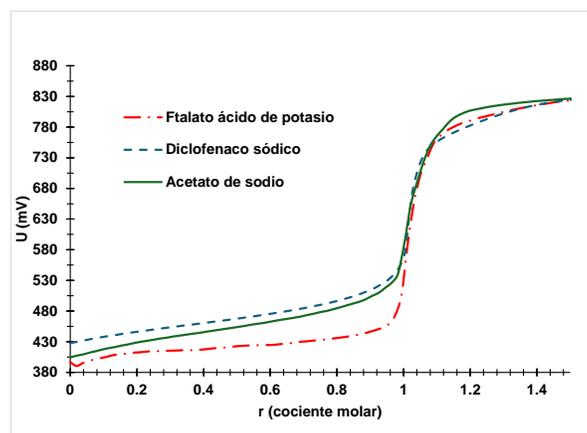
Si el NaDic o el KHfT se comportan como bases fuertes en el ácido acético glacial, sus valoraciones con el ácido perclórico serían iguales a las valoraciones del NaAcO y del KAcO, respectivamente.

Es por lo que se decidió seguir la valoración de 25 mL de una solución de concentración nominal 0.02 M de acetato de sodio trihidratado en ácido acético glacial (con la cantidad necesaria de anhídrido acético para eliminar el agua de cristalización) con ácido perclórico estandarizado. La Figura 6a muestra las curvas, de valoración y de su primera derivada, que se obtienen en dicha titulación; en tanto que en la Figura 6b se muestra la comparación de las tres titulaciones estudiadas en el presente artículo.

La Figura 6b muestra tres cosas. La primera es que la curva de valoración de la solución del diclofenaco sódico es prácticamente la misma que la del acetato sódico, lo que confirma que el diclofenaco sódico se comporta como base fuerte en el ácido acético glacial. La segunda es que la curva de la solución del ftalato ácido de potasio es distinta a la de las otras dos titulaciones, y más cuantitativa. Esto parece indicar que el ftalato ácido de potasio también se comporta como base fuerte en el ácido acético glacial, pero que el par iónico del acetato de potasio tiene diferente estabilidad al acetato de sodio. Y la tercera, finalmente, muestra que las tres curvas son prácticamente iguales en el exceso del ácido perclórico.



(a)



(b)

**Figura 6.** a) Curva de valoración ( $U = f(r)$ , en línea continua verde oscuro) y de su primera derivada (en línea continua verde claro), que pasa por el máximo para un cociente molar de 1) para la titulación de 25 mL de acetato de sodio 0.02 M con ácido perclórico de concentración nominal 0.1 M, en ácido acético glacial. b) Comparación de las tres curvas estudiadas en el presente artículo.

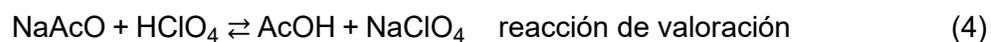
Con esta información en las siguientes secciones se presentan los modelos de valoración de las soluciones de NaDic y KHfT con HClO<sub>4</sub> en ácido acético glacial.

### 3.4. *Modelo de valoración de las soluciones de NaDic con HClO<sub>4</sub> en ácido acético glacial.*

Dado que las curvas de valoración del NaDic y del NaAcO son prácticamente iguales se puede proponer que el diclofenaco sódico se comporta como base fuerte en el ácido acético glacial, de manera que, antes de comenzar la valoración el diclofenaco sódico, se transforma cuantitativamente en acetato de sodio, como se muestra en el proceso químico (3).



De esta forma, el diclofenaco (HDic) sería un ácido muy débil en ácido acético glacial, por lo que sería una sustancia espectadora o indiferente al intercambio de protones en ese medio. Al valorar la solución resultante con ácido perclórico, se estaría titulado el acetato de sodio, de acuerdo con la reacción de titulación representativa que se muestra en el equilibrio (4), y que también es muy cuantitativa; lo que se concluye por la variación brusca en la zona del cociente molar igual a 1 y el gran máximo en la curva de la primera derivada.



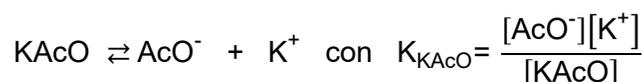
### 3.5. *Modelo de valoración de las soluciones de KHfT con HClO<sub>4</sub> en ácido acético glacial*

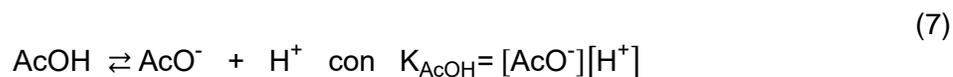
Aunque en agua el ion ftalato ácido es menos básico que el anión del diclofenaco, tal vez se debería esperar lo mismo que se vio en el apartado anterior; esto es, que el ftalato ácido de potasio se comportara como base fuerte en ácido acético glacial, y que entonces se titulara el acetato de potasio con el ácido perclórico, como muestran los equilibrios (5) y (6)



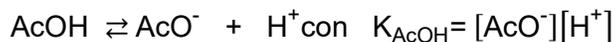
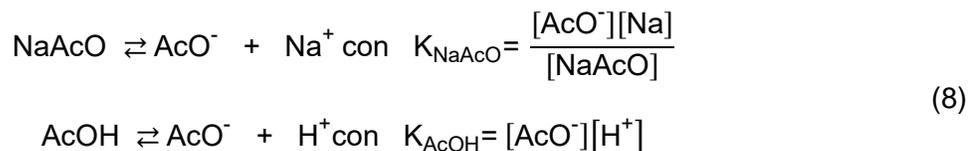
En este caso se está considerando que la sustancia insoluble que se observa experimentalmente en esas valoraciones es el perclorato de potasio.

El hecho de que antes del punto de equivalencia la curva de la valoración (4) esté por arriba de la curva de la valoración (6) podría deberse a que, en esa parte de la curva, contribuyen más al pH de la solución de los conjuntos de equilibrios (7) y (8).





y

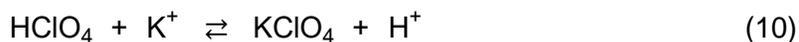


El par iónico más estable se disocia menos, lo que hace que la concentración de acetatos sea menor y el pAcO sea mayor o; dicho de otra forma, que el pH sea menor y (por lo tanto) la diferencia de potencial (U) sea mayor. Así, el par iónico NaAcO debe ser más estable que el par iónico KAcO.

La estabilidad de los percloratos de potasio y sodio también debería ser distinta. Entonces, ¿por qué se parecen tanto las curvas después del punto de equivalencia?

Esto podría explicarse por la saturación de la solución en el par iónico KClO<sub>4</sub>, precipitando al perclorato de potasio KClO<sub>4</sub>↓.

Si se supone ahora que el perclorato de potasio soluble es menos estable que el perclorato de sodio, después del punto de equivalencia la curva de valoración del acetato de potasio debería ir por debajo de la del acetato de sodio, de acuerdo con los conjuntos de equilibrios (9) y (10).



Si se satura la solución, de acuerdo con el equilibrio (11):



entonces la formación del perclorato de potasio sólido disminuye la concentración del perclorato de potasio disuelto, lo que desplaza el equilibrio (10) hacia la derecha, con el consiguiente aumento de la concentración de protones, la disminución del pH y el aumento de la diferencia de potencial (U), alcanzando (por coincidencia) la posición de las otras dos curvas.

#### 4. Conclusiones

A partir del estudio realizado en valoraciones no acuosas se demuestra que es importante considerar la participación de los iones alcalinos durante la valoración, ya que, a diferencia del medio acuoso (donde son iones espectadores y no afectan a la valoración), en ácido acético

glacial son capaces de afectar la cuantitatividad de las reacciones. Además, la fuerza básica del acetato alcalino formado depende del ion alcalino asociado al ion acetato.

Por otra parte, el poder seguir la valoración potenciométricamente es muy útil para poder demostrar hipótesis que de otra forma no se podrían verificar. También es útil para poder asegurar cuál es el cambio de color del violeta de genciana que coincide con el punto de equivalencia.

## 5. Agradecimientos

RGF agradece el apoyo otorgado por el área de Química Analítica de la UAM-I. DSGH, ARH, JJG, y MTRS agradecen al SNII por la distinción otorgada. MTRS y DSGH externan su gratitud al CONAHCYT por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto 2159 del programa “Investigadoras e investigadores por México”.

## 6. Referencias

- [1] G. A. Álvarez Romero, M. T. Ramírez Silva, A. Rojas Hernández. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingeniería*, 1, 2. (2014).
- [2] G. Charlot. *Curso de Química Analítica General*. Toray-Masson. Madrid. (2003).
- [3] J. Creek (GA), *Enciclopedia Médica A.D.A.M.: Ebix, Inc., A.D.A.M. Diclofenaco sódico*. (©1997-2020).
- [4] B. Trémillon. *Chemistry in Non-Aqueous Solvents*. Springer. Nueva York. (2011).

# Biosensor electroquímico para la detección de peróxido de hidrógeno.

Francisco Hernández Ramírez <sup>a</sup>, Gabriela Valdés-Ramírez <sup>a\*</sup>, Laura Galicia <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, Iztapalapa, C.P. 09340 Ciudad de México, CDMX, México. Tel: +52 (55) 58 04 43 81, e-mail: [j.fco\\_96@hotmail.com](mailto:j.fco_96@hotmail.com), [gabrivra@gmail.com](mailto:gabrivra@gmail.com), [lgl@xanum.uam.mx](mailto:lgl@xanum.uam.mx)

## Resumen

En este trabajo se presentan los resultados del desarrollo de un biosensor para la detección y cuantificación catódica de peróxido de hidrógeno. El biosensor consiste en un electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple y la enzima glucosa oxidasa. La detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se llevó a cabo aplicando un potencial constante de -600 mV vs Ag/AgCl. En la construcción del biosensor, la cantidad de unidades de glucosa oxidasa inmovilizada fue optimizada, encontrándose que 15 unidades de enzima se obtuvo la mayor sensibilidad en la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los parámetros analíticos obtenidos con esta configuración fueron: sensibilidad de 20.68 ± 0.87 μA/mM, límite de detección de 0.55 ± 0.05 mM y límite de cuantificación de 1.83 ± 0.16 mM. La presencia de glucosa oxidasa permite incrementar un 70% la sensibilidad del biosensor para detectar peróxido de hidrógeno en comparación con el sensor que solo es modificado con nanotubos de carbono.

**Palabras clave.** *Biosensor, Glucosa Oxidasa, Peróxido de Hidrógeno, Reducción.*

## Abstract

This work presents the results from the development of a biosensor for hydrogen peroxide detection at the cathodic phase. The biosensor was fabricated onto a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and the enzyme glucose oxidase. The hydrogen peroxide detection was carried out by applying a constant potential of -600 mV vs. Ag/AgCl. The units of immobilized glucose oxidase were optimized finding 15 of enzyme units as the one providing the highest sensitivity for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. The analytical parameters obtained with this configuration were sensitivity of 20.68 ± 0.87 μA/mM, detection limit of 0.55 ± 0.05 mM, and quantification limit of 1.83 ± 0.16 mM. The presence of glucose oxidase increases the sensitivity of the biosensor for hydrogen peroxide detection by 70% compared to the sensor only with carbon nanotubes and without enzyme

**Keywords.** *Biosensor, Glucose Oxidase, Hydrogen peroxide, Reduction.*

## 1. Introducción

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) ha adquirido una importancia significativa en la investigación científica y médica debido a su papel en procesos cancerígenos y su impacto en el medio ambiente [1,2]. También este compuesto, está presente en concentraciones bajas (3-9%) en productos domésticos, y tiene múltiples aplicaciones industriales, incluyendo el blanqueamiento de textiles y cabello [3].

En el campo farmacéutico, el  $H_2O_2$  desempeña un papel fundamental en la síntesis de diversos compuestos y es objeto de estudio en la investigación de enfermedades neurodegenerativas [4]. La importancia del  $H_2O_2$  en las reacciones bioquímicas es indiscutible, y se ha observado que concentraciones elevadas de éste contribuyen significativamente al daño oxidativo de enzimas y proteínas [5]. Este daño oxidativo se ha correlacionado con el desarrollo y progresión de enfermedades graves como el cáncer, Alzheimer y Parkinson [6,7], lo que subraya la necesidad de métodos para su detección y cuantificación.

Actualmente, existen métodos analíticos precisos para la detección de  $H_2O_2$ , incluyendo técnicas como espectrometría UV-Vis, fluorometría, cromatografía acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [8]. Sin embargo, a pesar de su precisión, estos métodos presentan desventajas, como su complejidad, alto costo, etc. limitando su aplicabilidad en ciertos procesos. Entre estas limitaciones se encuentran los largos tiempos de análisis, la necesidad de procesamiento complejo de las muestras, el requerimiento de personal altamente capacitado y los costos elevados asociados tanto a los equipos como a los procedimientos.

Los biosensores electroquímicos han emergido como una alternativa prometedora para la determinación de  $H_2O_2$  [9,10]. Estos dispositivos bio-analíticos integran un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, proteínas, virus, tejidos celulares o bacterias) en la superficie de un transductor. Mediante la aplicación de un voltaje operacional, se genera una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración del analito a determinar. Las ventajas operacionales de los biosensores incluyen su rápida respuesta, un amplio rango lineal de detección, bajos niveles mínimos de detección y, en muchos casos, la eliminación de la necesidad de preparación previa de la muestra [11-13].

La nanotecnología ha jugado un papel en el diseño y desarrollo de biosensores [14]. Los nanomateriales exhiben propiedades excepcionales a escala nanoscópica, destacándose por su excelente conductividad eléctrica y alta biocompatibilidad. La característica más notable de estos nanomateriales en el contexto de los biosensores es su capacidad para optimizar la transferencia de carga entre las enzimas y los electrodos, un proceso fundamental para el funcionamiento eficiente de estos dispositivos. Esta mejora en la eficiencia de transferencia electrónica se traduce en múltiples beneficios como: mayor sensibilidad del biosensor, respuestas más rápidas, límites de detección más bajos y una mejora significativa en la estabilidad general del sistema [15-18].

Por la importancia que tiene el  $H_2O_2$  en diferentes ámbitos de la ciencia y tecnología. En este trabajo se diseñó un biosensor que utiliza (GOx) adsorbida sobre un (ECV) modificado con (MWCNT) para la detección por reducción electroquímica de  $H_2O_2$ .

## 2. Experimental

### 2.1. Reactivos y Equipo

Nanotubos de carbono de paredes múltiples al 98% (O.D. x L. 6-13 nm x 2,5-20  $\mu\text{m}$ ), glucosa oxidasa de *Aspergillus Niger* (liofilizada), fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) al 99% y fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) al 99%, se adquirieron de Sigma Aldrich. Peróxido de hidrógeno al 30 %, etanol al 99,9 %, hidróxido de potasio se adquirieron de J.T. Becker. Las soluciones se prepararon en agua desionizada (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

Como electrolito soporte se empleó un buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.4 (PB), ajustado con NaOH, el cual se utilizó en todos los experimentos electroquímicos y para dispersar la enzima y los MWCNT.

El equipo instrumental incluyó un potencióstato/galvanostato BAS B100 para las mediciones electroquímicas, utilizando un electrodo de trabajo de ECV modificado, un electrodo de referencia Ag/AgCl saturado y como contraelectrodo una barra de grafito. Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro Conductronic PC45 y un electrodo de vidrio combinado en un rango 0 a 14 pH ( $\pm 0.01$ ).

Se emplearon equipos auxiliares como un horno Thermo SCIENTIFIC LINDBERG BLUE M para secar el electrodo modificado, un mezclador vórtex Corning LSE, un baño de ultrasonido BRASON 2800 para la dispersión de MWCNT, y gas nitrógeno de PRAXAIR. La caracterización microscópica se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido de alta resolución Nova-200 Nanolab equipado con un filamento tipo FEG Schottky de doble haz.

Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones de temperatura ambiente (25°C).

### 2.2. Pretratamiento del Electrodo de Carbón Vítreo (ECV)

El pretratamiento del electrodo de carbón vítreo (ECV) se llevó a cabo mediante un proceso de tres etapas. Inicialmente, se realizó un pulido mecánico de la superficie del ECV hasta alcanzar un acabado tipo espejo, empleando para ello alúmina con un tamaño de partícula de 0.5  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, para asegurar la eliminación de cualquier residuo del pulido, el electrodo fue sometido a un baño de ultrasonido por 5 minutos. Como tercer paso, se procedió a secar el ECV utilizando nitrógeno gaseoso. Este procedimiento garantiza una superficie limpia como se indica en la literatura [19].

### 2.3. Modificación de ECV con MWCNT y GOx (ECV/MWCNT) y (ECVMWCNT/GOx)

La modificación del electrodo ECV se realizó en dos etapas secuenciales. Primero, se depositaron 15  $\mu\text{L}$  de una dispersión de MWCNT en PB (dispersión preparada colocando 1 mg de MWCNT en 1 mL de PB), sobre el ECV limpio, seguido de un tratamiento térmico a 60 °C por 10 minutos. Posteriormente, se inmovilizó la enzima glucosa oxidasa (GOx) sobre el ECV/MWCNT, depositando 5  $\mu\text{L}$  de solución de GOx en PB y secando a 33 °C durante 40 minutos. Las unidades de GOx inmovilizadas sobre los electrodos, fue variada para encontrar la cantidad que permitiera obtener el biosensor con mejor sensibilidad para detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la reducción. En todos los casos el volumen dispersado de enzima se mantuvo constante y la concentración de la solución enzimática fue modificada.

### 2.4. Caracterización electroquímica y morfológica

La caracterización del electrodo ECV modificado con MWCNT y GOx se realizó mediante dos técnicas. El análisis electroquímico se llevó a cabo utilizando voltamperometría cíclica en una ventana de potencial de 0 a -700 mV (dirección catódica), con una velocidad de barrido de 100 mV/s en PB. Paralelamente, se empleó microscopía electrónica de barrido (SEM) para examinar la morfología superficial y confirmar la incorporación efectiva de los MWCNT sobre el ECV. Esta combinación de técnicas permitió evaluar tanto las propiedades electroquímicas como la estructura física del electrodo modificado.

### 2.5. Cuantificación de $\text{H}_2\text{O}_2$

La cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se llevó a cabo mediante amperometría a potencial constante. Se aplicó un potencial fijo de -600 mV respecto a un electrodo de referencia Ag/AgCl en medio de PB. El procedimiento consistió en realizar adiciones sucesivas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con incrementos de concentración de 0.4 mM hasta alcanzar 4.0 mM en la celda electroquímica. Este enfoque facilitó la elaboración de una gráfica de calibración, permitiendo establecer una relación entre la corriente medida y la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

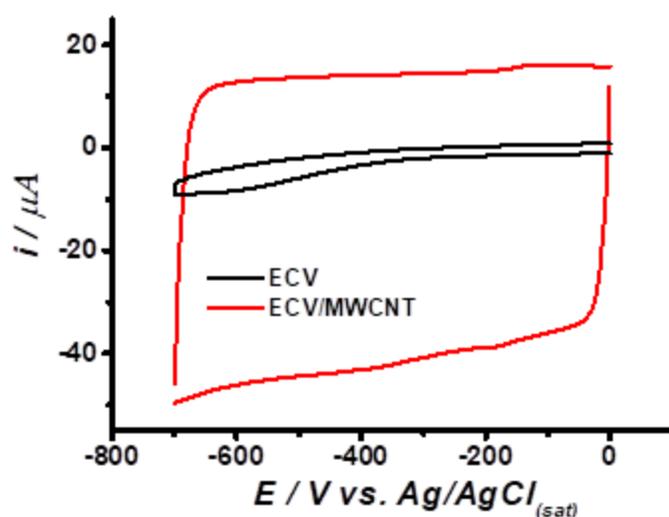
## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Caracterización electroquímica del sensor ECV/MWCNT

La caracterización electroquímica del ECV modificado con MWCNT se llevó a cabo mediante voltamperometría cíclica. Los voltamperogramas se obtuvieron aplicando un barrido de potencial

en dirección catódica, desde 0 hasta -700 mV, a una velocidad de 100 mV/s. Este análisis proporciona información valiosa sobre las propiedades electroquímicas del electrodo modificado, permitiendo así evaluar el impacto de la incorporación de MWCNT en la respuesta electroquímica del ECV.

La Figura 1 presenta los voltamperogramas típicos para el electrodo de carbón vítreo y modificado con nanotubos. El voltamperograma de color negro muestra el comportamiento electroquímico del ECV sin modificar, que sirve como referencia para el electrodo modificado. Por otro lado, el voltamperograma de color rojo ilustra la respuesta típica del ECV modificado con MWCNT, evidenciando las propiedades capacitivas que esta nanoestructura aporta al comportamiento electroquímico del electrodo. La comparación entre ambos voltamperogramas revela el impacto significativo de la modificación con MWCNT en las propiedades electroquímicas del electrodo. En particular, el voltamperograma de color rojo muestra un aumento notable en la corriente capacitiva, lo que indica un incremento en el área superficial electroquímicamente activa del electrodo. Este aumento se atribuye a la estructura tridimensional y altamente conductora de los MWCNT, que proporcionan una mayor superficie para la transferencia de carga.

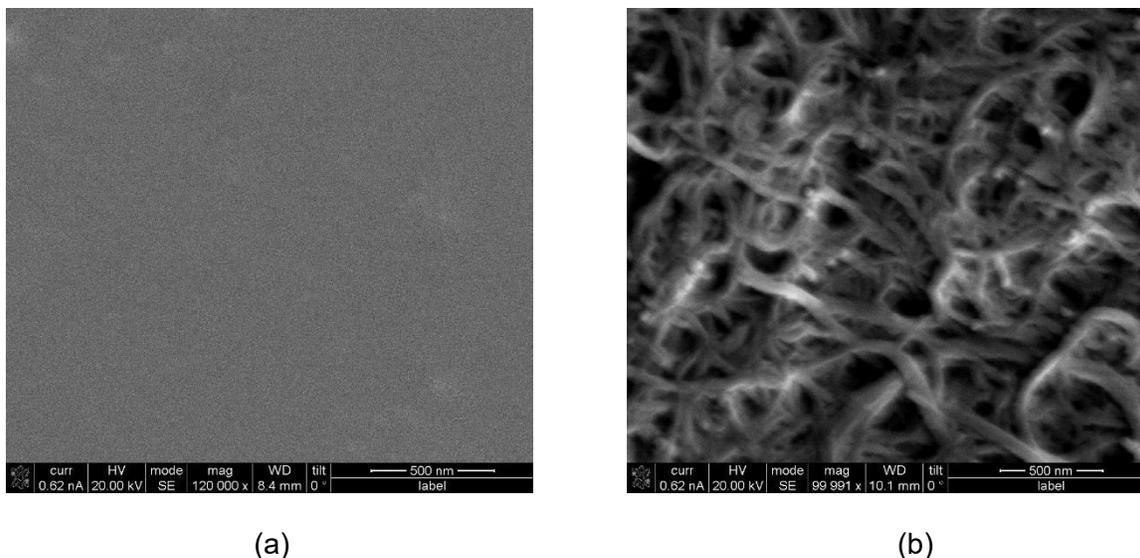


**Figura 1.** Voltamperogramas típicos en PB en una ventana de potencial de 0 a -700 mV a velocidad de barrido de 100 mV/s para: ECV (negro), ECV/MWCNT (rojo).

Se llevó a cabo un análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con el objetivo de visualizar y confirmar la incorporación efectiva de los MWCNT sobre la superficie del electrodo ECV. La Figura 2 presenta las micrografías SEM obtenidas, donde la imagen (a) muestra el ECV sin modificar y la imagen (b) ilustra el ECV/MWCNT modificado.

Estas imágenes proporcionan información sobre la morfología de las superficies analizadas. En el caso del ECV sin modificar (a), las micrografías revelan una superficie uniforme y lisa,

característica de este material en su estado limpio y sin modificaciones. Por otro lado, las imágenes del ECV/MWCNT (b) muestran una transformación en la morfología superficial. Se observa claramente la estructura fibrosa característica de los nanotubos de carbono, distribuidos sobre la superficie del electrodo. Esta disposición crea una red tridimensional que aumenta significativamente el área superficial efectiva del electrodo.

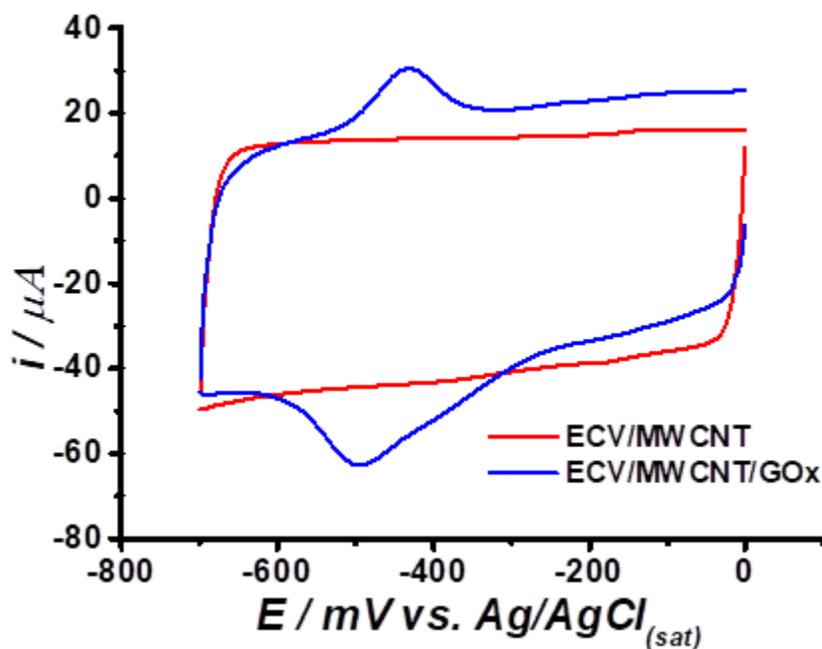


**Figura 2.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de a) ECV b) ECV/MWCNT.

La caracterización morfológica complementa los resultados electroquímicos previamente obtenidos, ofreciendo una visión integral de la modificación del electrodo. La estructura tridimensional observada en el SEM corrobora el aumento en la corriente capacitiva detectado en los voltamogramas cíclicos, explicando el mejoramiento en las propiedades electroquímicas del electrodo modificado.

La Figura 3 presenta los resultados de la voltamperometría cíclica del electrodo ECV/MWCNT modificado con GOx. El estudio se realizó en la ventana de potencial de 0 a -700 mV, barriendo en sentido catódico a una velocidad de 100 mV/s. El voltamograma muestra un pico de reducción en -480 mV, al invertir el barrido de potencial, se evidencia un pico de oxidación en -437 mV, estas señales son característicos de los procesos redox del dinucleótido de flavina y adenina localizado en el centro activo de la enzima [19]. La presencia de estos picos indica una inmovilización exitosa de la GOx sobre la superficie del electrodo modificado.

La diferencia entre los potenciales de los picos de oxidación y reducción,  $\Delta E_p = 43$  mV, lo que indica que la enzima está adsorbida sobre el electrodo. El valor relativamente pequeño de  $\Delta E_p$ , sugiere una transferencia de electrones rápida entre la GOx y la superficie del electrodo.

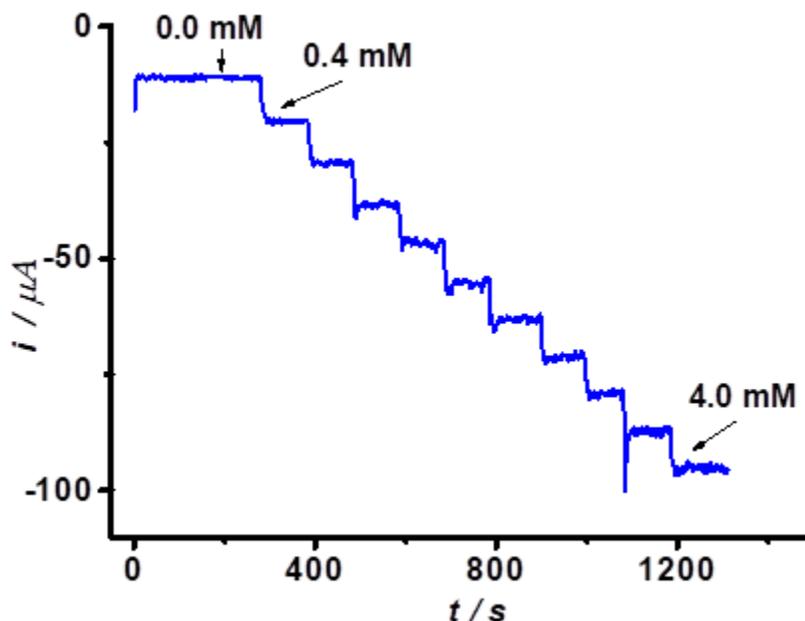


**Figura 3.** Voltamperogramas típicos en PB en la ventana de potencial de 0 a -700 mV a una velocidad de barrido de 100 mV/s, ECV/MWCNT (rojo) y ECV/MWCNT/GOx (azul).

### 3.2. Amperometría para la cuantificación de $H_2O_2$

Se empleó la técnica de amperometría para la cuantificación de  $H_2O_2$  sobre la plataforma ECV/MWCNT/GOx para la reducción  $H_2O_2$  como se muestra en la Figura 4. Las mediciones amperométricas para la reducción de  $H_2O_2$  se realizaron en condiciones controladas de pH 7.4, aplicando un potencial constante de -600 mV. El procedimiento consistió en realizar adiciones sucesivas de  $H_2O_2$  con incrementos en una concentración de 0.4 mM, con intervalos de 100 segundos entre cada adición. Este tiempo permitió la estabilización de la respuesta amperométrica antes de la siguiente medición. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, todos los experimentos se hicieron por triplicado. Este enfoque de múltiples repeticiones aumenta la confiabilidad de los datos obtenidos mediante la técnica amperométrica.

La Figura 4 presenta un amperograma que muestra los cambios de la corriente tras cada adición de  $H_2O_2$ . Este gráfico visualiza la relación entre la concentración de  $H_2O_2$  y la respuesta del biosensor ECV/MWCNT/GOx.

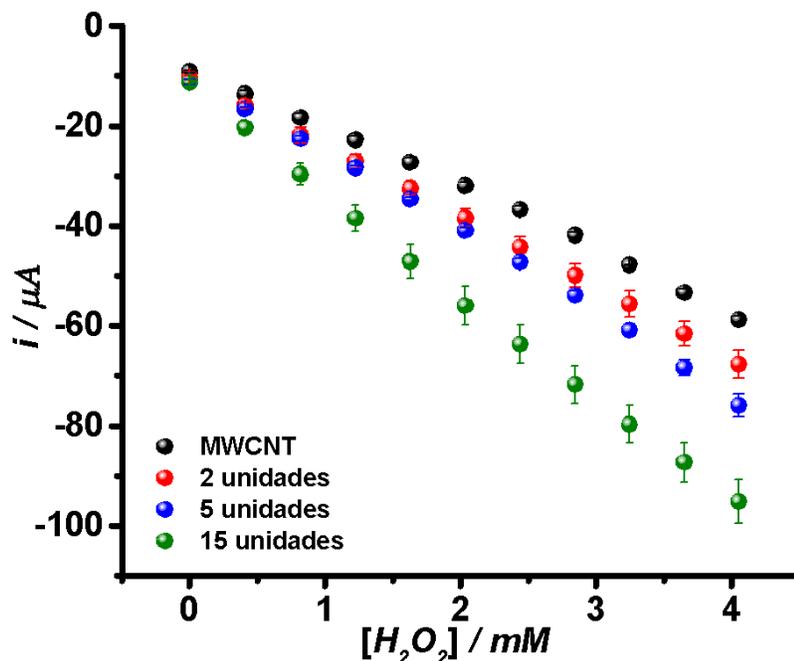


**Figura 4.** Amperograma para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con ECV/MWCNT/GOx aplicando un potencial de -600 mV vs Ag/AgCl.

A partir de los datos obtenidos mediante la técnica de amperometría, se generaron las curvas de calibración correspondientes, como se muestra en la Figura 5. Estas curvas son fundamentales para establecer la relación entre la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la respuesta amperométrica. Se presentan las curvas de calibración para la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando el electrodo modificado (ECV/MWCNT). El MWCNT de color negro se utilizó como referencia para evaluar la sensibilidad del electrodo modificado antes de la incorporación de la enzima.

La adición de la enzima GOx al sensor muestra una clara relación entre la cantidad de enzima usada y la sensibilidad del dispositivo. Primero, al analizar respuesta con 2 unidades de enzima inmovilizadas en el ECV/MWCNT/GOx, se obtiene la curva de calibración (roja) con una pendiente superior que la del sensor de referencia (sin enzima), lo que indica una mayor sensibilidad de la plataforma. Al adicionar 5 unidades de enzima a la plataforma sensora, se obtiene la nueva curva de calibración (azul), muestra una pendiente aún más inclinada que la anterior. Este patrón de respuesta continúa con la adición de 15 unidades de GOx, como se muestra en la curva (verde) la cual presenta la mayor pendiente de todas. Este aumento constante en las pendientes de las curvas está relacionado con la cantidad de enzima adsorbida en el ECV/MWCNT. Al comparar las pendientes de las curvas de calibración, se obtiene un incremento en la sensibilidad del ECV/MWCNT/GOx. La pendiente de la curva correspondiente

al electrodo ECV/MWCNT/GOx, (15 unidades) es de 20.68  $\mu\text{A}/\text{mM}$ , mientras que la del electrodo sin enzima (ECV/MWCNT) es de 12.19  $\mu\text{A}/\text{mM}$ . Esta diferencia representa un aumento del 70% en la sensibilidad. La adición de GOx al sensor aumenta significativamente la capacidad del biosensor generado para detectar  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la reducción.

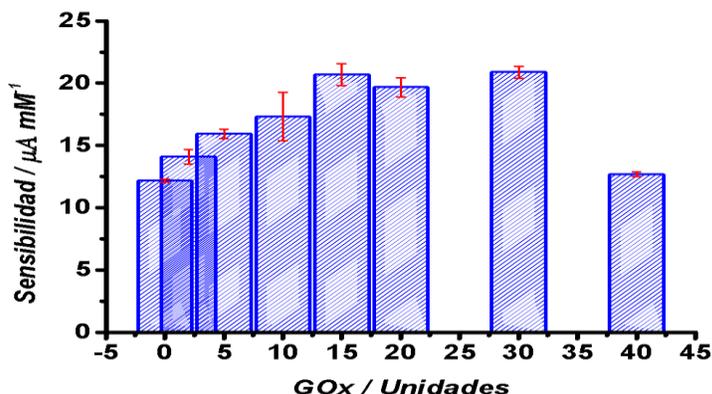


**Figura 5.** Curva de calibración para  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el ECV/MWCNT/GOx MWCNT (negro), 2 unidades de GOx (rojo), 5 unidades de GOx (azul) y 15 unidades de GOx (verde).

El comportamiento observado se debe a una contribución en cascada correspondiente a la reducción del analito adicionado a la muestra de estudio (señal de referencia). La señal de referencia se ve incrementada, debido a contribución en cascada debida a la reducción del dinucleótido de adenina y flavina presente en el centro activo de la enzima GOx, la reducción del peróxido de hidrógeno generado a partir de la reacción bioquímica en el centro activo de la enzima y el peróxido de hidrógeno generado electroquímicamente a partir de la reducción electroquímica del oxígeno presente en la disolución [20].

Para determinar la cantidad óptima de enzima, se optimizó las unidades de GOx en el biosensor para la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el ECV/MWCNT/GOx, se construyó la curva de sensibilidad vs unidades de GOx como se muestra en la Figura 6. Este gráfico permite identificar el punto

donde la cantidad de enzima proporciona la máxima sensibilidad, así como también el punto donde la superficie del sensor está saturada o ha alcanzado su máxima capacidad de adsorción de GOx, ya que después de este punto la sensibilidad decrece.



**Figura 6.** Optimización de las unidades de GOx para la cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el ECV/MWCNT/GOx.

A partir de los datos obtenidos de las curvas de calibración (Figura 5), se calcularon los parámetros electroanalíticos (sensibilidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)), estos resultados se presentan de manera detallada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros electroanalíticos para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre electrodos modificados utilizando diferentes cantidades de GOx.

GOx (Unidades)	Sensibilidad ( $\mu\text{A /mM}$ )	Coefficiente de correlación $R^2$	LOD (mM)	LOQ (mM)
0	$12.19 \pm 0.12$	0.9973	$0.61 \pm 0.03$	$2.02 \pm 0.11$
2	$14.08 \pm 0.58$	0.9997	$0.70 \pm 0.01$	$2.32 \pm 0.05$
5	$15.92 \pm 0.37$	0.9975	$0.59 \pm 0.03$	$1.91 \pm 0.10$
10	$17.32 \pm 1.94$	0.9992	$0.41 \pm 0.04$	$1.34 \pm 0.13$
15	$20.68 \pm 0.87$	0.9990	$0.55 \pm 0.05$	$1.83 \pm 0.16$
20	$19.67 \pm 0.77$	0.9998	$0.49 \pm 0.11$	$1.61 \pm 0.36$
30	$20.88 \pm 0.47$	0.9994	$0.48 \pm 0.05$	$1.58 \pm 0.12$
40	$12.69 \pm 0.20$	0.9996	$0.50 \pm 0.05$	$1.66 \pm 0.16$

GOx = glucosa oxidasa

LOD = límite de detección

LOQ = límite de cuantificación

En la Tabla 1 se muestran los parámetros electroanalíticos obtenidos con los diferentes biosensores preparados con diferentes unidades de GOx. El LOD fue calculado de acuerdo a  $LOD = 3.3\sigma/m$ ,  $\sigma$  es la desviación estándar de la señal generada por el electrolito soporte y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración correspondiente. El LOQ fue calculado a partir de  $LOQ = 10\sigma/m$ . Los resultados obtenidos, permiten observar que al aumentar la cantidad de unidades de GOx, la sensibilidad del biosensor mejora, alcanzando sus valores máximos con 15, 20 y 30 unidades de enzima. Sin embargo, al llegar a 40 unidades, se evidencia una disminución en comparación con la sensibilidad de 15, 20 y 30 unidades de GOx evidenciando la importancia de la cantidad de GOx inmovilizada en el biosensor para la detección de  $H_2O_2$  durante la reducción.

#### 4. Conclusiones

Se desarrolló un biosensor para la detección de  $H_2O_2$  mediante electro-reducción del analito, utilizando GOx y MWCNT, operando a un potencial de -600 mV. Los resultados muestran que la incorporación de GOx en 15, 20 y 30 unidades se obtiene el máximo en la sensibilidad del biosensor en comparación con el sensor sin enzima (ECV/MWCNT), lo cual se traduce en un incremento en la sensibilidad del 70% en la detección de  $H_2O_2$ . Por otra parte, al aumentar la cantidad de GOx más allá 30 unidades, se observó una disminución en la sensibilidad, lo que indica que una mayor cantidad de enzima no necesariamente mejora la sensibilidad del biosensor. El biosensor a base de MWCNT y GOx permitió detectar diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  utilizando una solución electrolítica de PB a pH 7.4. Los resultados obtenidos, se presenta como una alternativa para evaluar concentraciones de  $H_2O_2$  en diferentes sistemas ambientales, industriales y en salud.

#### 5. Agradecimientos

F.H.R externa su gratitud a CONAHCYT por el apoyo otorgado en la beca de maestría (1255587).

#### 6. Referencias.

- [1] S. Xu, X. Zhang, T. Wan. *Microchim Acta* 172, 199–205 (2011).
- [2] J. Tang, B. Wang, Z. Wu, X. Han, S. Dong, E. Wang. *Biosens Bioelectron.* 18, 867-72 (2003).
- [3] S. Cinti, F. Arduini, G. Vellucci, I. Cacciotti, F. Nanni, D. Moscone. *Electrochem Commun.* 47, 63–6 (2014).
- [4] V. A. Gatselou, D. L. Giokas, A. G. Vlessidis, M. I. Prodromidis. *Talanta.* 134, 482-7 (2015).
- [5] M. J. Davies. *Biochem J.* 473, 805-25 (2016).
- [6] W. Chen, S. Cai, Q. Q. Ren, W. Wen, Y. Di-Zhao. *Analyst.* 137, 49–58 (2012).
- [7] N. H. Al-Hardan, M. A. Abdul-Hamid, R. Shamsudin, N. K. Othman, L. Kar-Keng. *Sensors.* 16, 1004 (2016).
- [8] X. Xu, S. Liu, H. Ju. *Sensors.* 3, 350–60 (2003).
- [9] S. Chen, R. Yuan, Y. Chai, L. Xu, N. Wang, X. Li. *Electroanalysis.* 18, 471–7 (2006).

- [10] P. A. Uribe, C. C. Ortiz, D. A. Centeno, J. J. Castillo, S. I. Blanco, J. A. Gutierrez. *Physicochem Eng Asp.* 561, 18–24 (2019).
- [11] M. Moyo, J. O. Okonkwo, N. M. Agyei. *Electroanalysis.* 25, 1946-54 (2013).
- [12] L. Shi, X. Liu, W. Niu, H. Li, S. Han, J. Chen, G. Xu. *Biosens Bioelectron.* 24, 1159-63 (2009).
- [13] Y. Wang, J. Du, Y. Li, D. Shan, X. Zhou, Z. Xue. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 90, 62-7 (2012).
- [14] X. Kang, J. Wang, Z. Tang, H. Wu, H. Lin. *Talanta.* 78, 120 – 125 (2009).
- [15] Y. Song, D. Zhang, X. Xia. *Chem. – Eur. J.* 11, 2177 – 2182 (2005).
- [16] J. J. Yu, J. R. Ma, F. Q. Zhao, B. Z. Zeng. *Talanta.* 74, 1586 – 1591 (2008).
- [17] B. Park, R. Zheng, K. Ko, B. Cameron, D. Yoon, D. Kim. *Biosensors and Bioelectronics.* 38, 295-301 (2012).
- [18] A. Guiseppi-Elie, C. H. Lei, R. H. Baughman. *Nanotechnology.* 13, 559-564 (2002).
- [19] W. Grosse, J. Champavert, S. Gambhir, G. G. Wallace, S. E. Moulton. *Carbon.* 61, 467-475 (2013).
- [20] S. Zou, J. Xiao, X. Feng. *AIChE J.* 70, e17620 (2023).

## Determinación de ácido ascórbico mediante polarimetría: aplicación a docencia para análisis instrumental

Alberto Rojas-Hernández<sup>a</sup>, Damaris Rodríguez-Barrientos<sup>a\*</sup>, Dafne Sarahia Guzmán-Hernández<sup>b</sup>, Jorge Juárez-Gómez<sup>a</sup>, María Teresa Ramírez-Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química, Área de Química Analítica, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1era. Sección, Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310, Ciudad de México, CDMX Tel: +52 (55) 58 04 46 70, e-mail: [damaris.rodbar@gmail.com](mailto:damaris.rodbar@gmail.com)\*

<sup>b</sup> CONAHCYT, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química, Área de Química Analítica, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1era Sección, Alcaldía Iztapalapa, C.P.09310, Ciudad de México, CDMX Tel: +52 (55) 58 04 46 70, e-mail: [sarahiaguz@gmail.com](mailto:sarahiaguz@gmail.com).

### Resumen

Se presenta la determinación de la masa de ácido ascórbico en una tableta de la marca Redoxon 500©, utilizando la técnica de polarimetría para medir el ángulo de rotación. Esta metodología se propone como una actividad de laboratorio en la asignatura de análisis instrumental, y se incluyen los resultados obtenidos por los estudiantes durante esta unidad de enseñanza-aprendizaje.

La concentración de ácido ascórbico en una muestra problema se determinó a través de curvas de adición de patrón, utilizando dos procedimientos distintos: el método tradicional y el método propuesto por J.M. Andrade, et al. Asimismo, se realizan comparaciones estadísticas entre los resultados obtenidos con ambos procedimientos y con el valor de referencia reportado por la marca comercial, encontrando que los valores son estadísticamente equivalentes.

**Palabras clave.** *Ácido ascórbico, Polarimetría, Adiciones patrón.*

### Abstract

The determination of the mass of ascorbic acid in a tablet of the brand Redoxon 500© is presented, using polarimetry to measure the angle of rotation. This methodology is proposed as a laboratory activity in the instrumental analysis course, and it includes the results obtained by the students during this teaching-learning unit.

The concentration of ascorbic acid in a problem sample is determined through standard addition curves, using two different procedures: the traditional method and the method proposed by Dr. Andrade. Additionally, statistical comparisons are made between the results obtained using both methodologies and the reference value reported by the commercial brand, finding that the values are statistically equivalent.

**Keywords.** *Ascorbic acid, Polarimetry, Standard additions.*

## 1. Introducción

Cuando se aborda la técnica de polarimetría en las asignaturas de análisis instrumental, se requiere una molécula que presente actividad óptica. Para que una molécula pueda rotar el plano de la luz polarizada es necesario que tenga en su estructura, al menos, un centro quiral [1]. El ácido L-ascórbico ( $H_2Asc$ ), también llamado Vitamina C, es una sustancia que se utiliza como antioxidante [2] y de acuerdo con la estructura que se muestra en la figura 1, presenta un centro quiral en el carbono 5 por lo que soluciones acuosas del ácido L-ascórbico pueden rotar el plano de la luz polarizada plana de acuerdo con la ley de Biot [3].

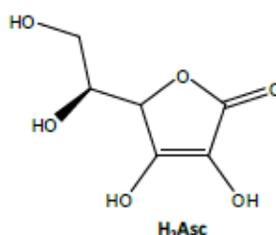


Figura 1. Estructura de ácido L-ascórbico

En este trabajo se presenta como propuesta de actividad de docencia, el análisis y la cuantificación de ácido ascórbico en una muestra comercial, aplicando las habilidades que se han adquirido en los cursos de química analítica al análisis instrumental, siendo la técnica de polarimetría novedosa para su aplicación en la determinación de ácido ascórbico en una muestra comercial, ya que tradicionalmente en las asignaturas de docencia de laboratorios de química analítica para cuantificar ácido ascórbico, se utiliza yodimetría. En este método, el yodo ( $I_2$ ) se usa directamente como titulante y actúa como oxidante, reaccionando con el ácido ascórbico, que se oxida en el proceso [4], o bien, valoraciones ácido-base [4].

## 2. Experimental

### 2.1 Soluciones y reactivos

Los reactivos utilizados fueron ácido ascórbico de grado analítico, Sigma Aldrich, fosfato monoácido de amonio grado analítico marca Monterrey, se utilizó agua desionizada de un desionizador Milli-pore Milli-Q (18.2 MΩcm) libre de materia orgánica. Para imponer el valor de pH se utilizó como solvente una disolución de  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0.5 M. La disolución estándar de ácido ascórbico se hizo con una concentración cercana a 52.1 mg/mL disolviendo en la disolución de fosfato de amonio 0.5 M.

La disolución problema se preparó pulverizando 10 tabletas de Redoxon 500©, cuya masa fue registrada previamente. Una vez obtenido el polvo se pesó con precisión una cantidad cercana a 1.0 gramo; éste se colocó en 30 mL de agua y se mantuvo en agitación por una hora. Pasado este tiempo se filtró en un embudo de vidrio, por gravedad, utilizando papel de filtrado rápido. Se

lavó con 10 mL de agua y 10 mL más de fosfato de amonio 1.0 M, recogiendo la disolución filtrada en un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente se agregaron 40 mL de fosfato de amonio 1.0 M y se aforó con agua desionizada.

Es conveniente preparar todas las disoluciones el día de la experimentación, en particular, la muestra problema, que requiere mayor tiempo para su preparación. Se recomienda, además preparar la solución stock al momento de llevar a cabo la experimentación, por la oxidación que puede presentar el ion HAsc.

## 2.2 Equipo

Se usó un polarímetro Anton Paar MCP 4100, con celda de longitud de paso óptico igual a 1 dm y un sistema Peltier para imponer y mantener la temperatura en la celda durante las mediciones, por lo que las lecturas de ángulo de rotación se llevaron a cabo a 25 °C y a una longitud de onda de 589 nm.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Análisis y determinación de ácido ascórbico en tabletas comerciales

El ángulo de rotación es diferente según el grado de protonación de la sustancia y dado que el ácido ascórbico presenta dos valores de pKa [3] (para efectos de simplicidad se redondean a dos cifras decimales), se construye el diagrama de zonas de predominio (DZP) lineal en función del pH [5], donde es posible observar el predominio de las diferentes especies de ácido ascórbico teniendo que para valores de pH < 4.15 predomina la especie H<sub>2</sub>Asc, HAsc<sup>-</sup> para 4.15 < pH < 11.93 y Asc<sup>2-</sup> para pH > 11.93 (ver figura 2). De acuerdo a Hernández-García y col. [3], la rotación específica de Asc<sup>2-</sup> es mayor a la de HAsc<sup>-</sup> y ésta, a su vez, es mayor a la de H<sub>2</sub>Asc, sin embargo, la velocidad de oxidación de la especie Asc<sup>2-</sup> es mayor respecto a las otras especies del ácido ascórbico (1 mol de ácido ascórbico se oxida en varias horas si el pH < 4.15 y un 1 mol de ácido ascórbico se oxida en pocos minutos o segundos si el pH > 11.93).

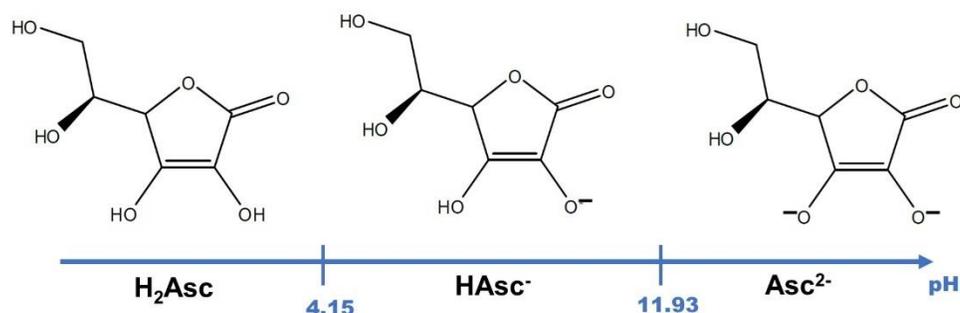


Figura 2. Diagrama de zonas de predominio en función del pH para las especies de ácido ascórbico.

Por lo que, para analizar cuantitativamente el ácido ascórbico, el pH debe imponerse entre los valores de 6.2 y 9.9 para que predomine mayoritariamente el anfolito  $\text{HAsc}^-$ , el cual no es tan inestable como el ion ascorbato  $\text{Asc}^{2-}$ , pero presenta una rotación óptima del ángulo de la luz polarizada plana en comparación con la especie  $\text{H}_2\text{Asc}$ .

El análisis cuantitativo se lleva a cabo mediante el método de adiciones patrón sin controlar la dilución [7], por lo que es necesario recordar que el ángulo de rotación medido del ácido ascórbico es directamente proporcional a su concentración. Esta concentración tiene la contribución de la concentración del ácido ascórbico en la muestra problema, así como también la contribución de la concentración del ácido ascórbico en la disolución estándar que se va adicionando. Para cada adición de estándar, el volumen total varía y la concentración se desarrolla como muestra en la ecuación (1).

$$\Phi = k_X[X] = k_X \frac{V_{prob}[X]_{prob}}{V_T} + k_X \frac{V_{est}[X]_{est}}{V_T} \quad (1)$$

Donde  $\Phi$  es el ángulo de rotación,  $V_{prob}$  es el volumen de la muestra problema,  $V_{est}$  es el volumen de la solución estándar,  $[X]_{prob}$  es la concentración de la muestra problema  $[X]_{est}$  es la concentración de la solución estándar,  $V_T$  es el volumen total del sistema por cada adición y  $k_X$  es la constante de proporcionalidad.

Por lo tanto, para obtener una respuesta lineal al graficar el ángulo de rotación como función de la concentración es necesario hacer una corrección al ángulo, utilizando el factor de dilución (FD) que se muestra en la ecuación (2).

$$FD = \left( \frac{V_{prob} + V_{est}}{V_{prob}} \right) \quad (2)$$

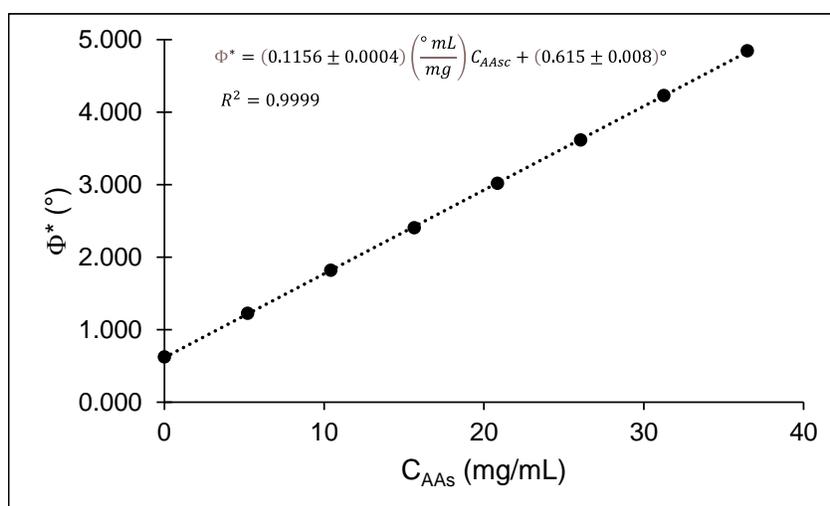
Para la construcción de la curva de adiciones patrón se colocaron 10 mL de la disolución problema, medidos con pipeta volumétrica, en un vaso de precipitados de 50 mL y se fueron haciendo adiciones de 1.0 mL de la disolución estándar de ácido ascórbico. Se tomó la lectura del ángulo de rotación para la disolución problema y la lectura del ángulo de rotación después de cada adición de estándar a la muestra problema.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para siete adiciones de solución estándar. Se presenta el volumen total del sistema en estudio ( $V_{total}$ ), la concentración calculada de ácido ascórbico por cada adición de solución estándar ( $C_{AAs}$ ), el ángulo de rotación ( $\Phi$ ) correspondiente a cada  $C_{AAs}$ , el factor de dilución (FD) y el ángulo de rotación corregido por el factor de dilución ( $\Phi^*$ ).

Para determinar la concentración de ácido ascórbico presente en la muestra problema se hace un ajuste por mínimos cuadrados con los datos presentados en la tabla 1, graficando  $\Phi^*$  en función de  $C_{AAs}$  (ver figura 3).

**Tabla 1.** Datos obtenidos para la construcción de la curva de adiciones patrón.

Adición del estándar	V <sub>total</sub> / mL	C <sub>AA<sub>s</sub></sub> ( $\frac{mg}{mL}$ )	$\Phi$ / °	FD	$\Phi^*$ / °
0	10	0.000	0.625	1.0	0.625
1	11	5.210	1.114	1.1	1.225
2	12	10.421	1.515	1.2	1.818
3	13	15.631	1.850	1.3	2.405
4	14	20.842	2.155	1.4	3.017
5	15	26.052	2.410	1.5	3.615
6	16	31.262	2.644	1.6	4.230
7	17	36.473	2.851	1.7	4.847



**Figura 3.** Gráfica de  $\Phi^* = f(C_{AA_s})$  Se muestra el ajuste en línea punteada y la relación lineal obtenida.

La gráfica que se presenta en la figura 3 tiene una tendencia lineal que sigue la ecuación 3.

$$\Phi^* = (0.1156 \pm 0.0004) \left( \frac{^\circ mL}{mg} \right) C_{AA_{sc}} + (0.615 \pm 0.008)^\circ \quad (3)$$

Para determinar la concentración de ácido ascórbico en la muestra problema, se utiliza la gráfica de la figura 3, mediante la extrapolación de la recta al eje de las abscisas. Considerando que en esta relación va implícita la corrección del FD, la concentración de la muestra problema se calcula como se muestra en la ecuación 4.

$$C_{AA_{sp}} = \frac{\hat{b}}{\hat{m}} \quad (4)$$

Donde  $C_{AA_{sp}}$  es la concentración de ácido ascórbico en la muestra problema,  $\hat{b}$  y  $\hat{m}$  son la ordenada al origen y la pendiente respectivamente para la extrapolación de la recta.

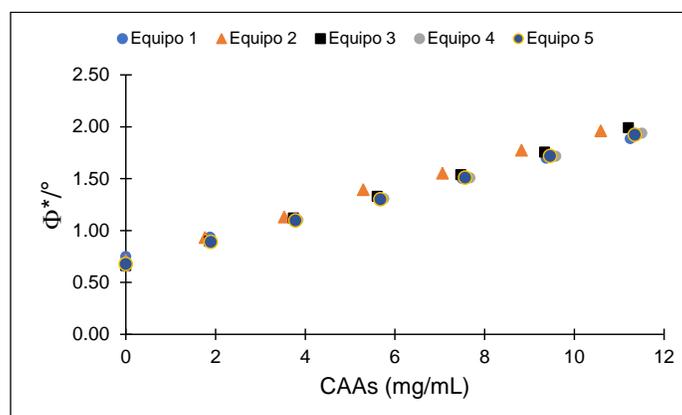
A partir del cálculo de la ecuación 4 se determina la masa de ácido ascórbico por tableta de la muestra comercial. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para  $C_{AA_{sp}}$  y su desviación estándar  $S_{C_{AA_{sp}}}$ , así como también la masa ácido ascórbico que se determinó que contenía la tableta ( $m_{AA_s}$ ) y su desviación estándar asociada ( $S_{m_{AA_s}}$ ).

**Tabla 2.** Concentración de ácido ascórbico en la muestra problema y masa de ácido ascórbico por tableta, con su respectiva desviación estándar.

$C_{AA_{sp}} \left(\frac{mg}{mL}\right)$	$S_{C_{AA_{sp}}} \left(\frac{mg}{mL}\right)$	$m_{AA_s}$ por tableta (mg)	$S_{m_{AA_s}}$ (mg)
5.32	0.08	467	8

### 3.2 Aplicación de la metodología para la determinación de ácido ascórbico en un grupo de docencia para la asignatura de Laboratorio de Análisis Instrumental.

Una vez que se revisaron los fundamentos de la técnica instrumental de polarimetría, se aplicó esta metodología para la asignatura de Laboratorio de Análisis Instrumental, donde cinco equipos llevaron a cabo esta determinación. Con la finalidad de terminar en el tiempo asignado para la unidad de enseñanza y aprendizaje, el experimento se llevó a cabo en dos polarímetros, Perkin-Elmer y Anton Paar, ambos con celda de longitud de paso óptico igual a 1 dm. Cada equipo preparó su solución estándar de ácido ascórbico e hizo un tratamiento de los datos análogo al presentado en la sección anterior, cabe resaltar que la solución problema de ácido ascórbico fue proporcionada por los docentes, así como también los datos asociados a su preparación a partir de las tabletas comerciales. En la figura 4 se presenta el gráfico  $\Phi^* = f(C_{AA_s})$  que obtuvo cada equipo de estudiantes, donde se observa que todos obtienen una tendencia lineal.



**Figura 4.** Gráfica de  $\Phi^* = f(C_{AA_s})$ . Los marcadores diferencian los resultados obtenidos por cada equipo de estudiantes.

En la tabla 3 se muestran los parámetros asociados a las rectas que se presentan en la figura 4, los cuales son obtenidos mediante el ajuste por mínimos cuadrados. Como puede verse en la tabla 3, los ajustes presentan un valor de coeficiente de correlación lineal de un valor de nueve en la primera, segunda y tercera cifra significativa, lo que representa un buen ajuste lineal independientemente del equipo de polarímetro usado por los estudiantes.

**Tabla 3.** Parámetros asociados a las rectas que se presentan en la figura 4 obtenidos mediante el ajuste por mínimos cuadrados.

Polarímetro	Equipo	Ordenada (°)	Pendiente (°/mg*mL)	R <sup>2</sup>
Perkin Elmer	1	0.7446 ± 0.0044	0.1013 ± 0.0007	0.9998
	2	0.7263 ± 0.0150	0.1181 ± 0.0024	0.9988
Anton Paar	3	0.6727 ± 0.0072	0.1171 ± 0.0011	0.9996
	4	0.6842 ± 0.0037	0.1084 ± 0.0005	0.9999
	5	0.6811 ± 0.0017	0.1096 ± 0.0002	0.9999

Para el cálculo de la cantidad de ácido ascórbico se llevó a cabo la extrapolación de la recta obtenida, para determinar la concentración en la muestra problema como se explicó en la sección anterior. Adicionalmente, a partir de la curva de adiciones patrón, se realizó una interpolación, como lo sugiere el Dr. Andrade [6], para hacer la comparación entre ambos métodos. El método que sugiere el Dr. Andrade consiste en tomar el doble del valor de la ordenada al origen y a partir de este valor dado en el eje de las ordenadas, interpolarlo en la recta sobre el eje de las abscisas para así determinar la concentración de la muestra problema, en la tabla 4 se presenta la comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos y mediante el cálculo de F – Fisher [7] se encuentra que las desviaciones estándar son estadísticamente iguales en un 95% de valor de significancia, con  $F_{calc} = 1.469$  y  $F_{crit}(0.05,4,4) = 9.605$ . Aplicando el algoritmo de t-Student [7] para desviaciones estándar estadísticamente iguales, se obtiene que el valor promedio es estadísticamente igual en un 95% de valor de significancia, con  $t_{calc} = 0.076$  y  $t_{crit}(0.05,8) = 2.306$ ; lo que implica que ambos métodos son estadísticamente iguales.

**Tabla 4.** Comparación de la concentración promedio obtenida de ácido ascórbico en la muestra problema ( $\overline{C}_{AAsp}$ ), por todos los equipos de estudiantes, mediante la curva de adiciones patrón utilizando dos metodologías diferentes para su cálculo.

	Método tradicional	Método del Dr. Andrade [6]
$\overline{C}_{AAsp} \left( \frac{mg}{mL} \right)$	(6.4 ± 0.6)	(6.3 ± 0.7)

A partir de los resultados obtenidos de cada equipo de estudiantes, se obtuvo el promedio de la masa de ácido ascórbico que contenía la tableta comercial siendo este de  $\overline{m}_{AA} = (558 \pm 52)$  mg. En la etiqueta de Redoxon® se establece un valor de 500 mg de ácido ascórbico en cada tableta. Haciendo la comparación estadística, mediante el algoritmo de t de Student para un valor de referencia, con  $t_{calc} = 2.481$  y  $t_{crit}(0.05,4) = 2.776$ , se obtiene que la masa promedio de ácido

ascórbico es estadísticamente igual al valor reportado en la etiqueta de la muestra comercial con un 95% de valor de significancia.

#### 4. Conclusiones

Se demuestra que la metodología propuesta para la determinación de ácido ascórbico en una muestra comercial mediante la técnica de polarimetría, es ilustrativa y educativa para una unidad de enseñanza aprendizaje a nivel licenciatura en química. Esta metodología integra conceptos adquiridos por los estudiantes a lo largo de sus cursos de química analítica, lo que facilita la aplicación de estos conocimientos en la resolución de un problema práctico.

#### 5. Agradecimientos

DRB agradece el apoyo otorgado por el Área Académica de Química Analítica de la UAM-I. DSGH, ARH, JJG, y MTRS agradecen al SNII por la distinción otorgada. MTRS y DSGH externan su gratitud al CONAHCYT por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto 2159 del programa “Investigadoras e investigadores por México”.

#### 6. Referencias

- [1] N. Purdie, K.A. Swallows. Analytical Applications of Polarimetry, Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism, *Analytical Chemistry*. **61**, [2], 77-89, (1989)
- [2] H. M Serra, T.A. Cafaro, Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo, *Acta Bioquím Clín Latinoam*. **41** [4]: 525-532, (2007).
- [3] L. Hernández-García; A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez-Silva, G.A. Álvarez-Romero, M.E. Palomar-Pardavé, Determinación de constantes de equilibrio del ácido ascórbico en medio acuoso por polarimetría, *Avances en Ciencias e Ingeniería*, **8**, 31-41, (2017).
- [4] M.A. Riera, Y. Gómez-Salcedo, Cinética de la degradación térmica del ácido ascórbico en el jugo de lulo (*Solanum Quitoense* Lam.). *Ciencia y Tecnología*, **35** [1], 1-7, (2019).
- [5] A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez, I. González, J.G. Ibanez., Predominance-Zone Diagrams in Solution Chemistry. Dismutation Processes in Two-Component Systems (M-L). *J. Chem. Educ.*, **72**, 12, (1995) <https://doi.org/10.1021/ed072p1099>.
- [6] J.M. Andrade, J. Terán-Baamonde, R.M. Soto-Ferreiro, A. Carlosena. Interpolation in the standard additions method. *Analytica Chimica Acta*. **780**, 13-19, (2013).
- [7] J.N. Miller and J.C. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5<sup>th</sup> Edition. Pearson. Great Britain. (2005).

## Caracterización analítica de compuestos lignocelulósicos provenientes de desechos agroindustriales.

Anakaren Hernández García <sup>a</sup>, Asminda Pineda Carrillo <sup>a</sup>, Alán Rubén Calzada Hernández <sup>a</sup>, Nicté Julieta Pérez Viramontes <sup>a</sup>, José Víctor Aguirre Armenta <sup>a</sup> y María Soraya Osegueda Robles <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato (UPIIG-IPN) Av. Mineral de Valenciana No. 200, Col. Fraccionamiento Industrial Puerto Interior, C.P. 36725 Silao de la Victoria, Guanajuato, México. Tel: +52 (55) 57 29 60 00, e-mail: [moseguedar@ipn.mx](mailto:moseguedar@ipn.mx).

### Resumen

Debido al mejoramiento genético, al uso de fertilizantes, agroquímicos y al uso de nuevas y mejores tecnologías en la industria agroalimentaria ha habido en los últimos años un considerable aumento en los residuos de la misma. En el presente trabajo, se determina el porcentaje en peso de biomasa lignocelulósica: celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en el rastrojo de maíz, celulosa, holocelulosa y hemicelulosa de la caña de azúcar y cenizas totales para los lodos residuales de la industria azucarera (cachaza). Los resultados muestran que el rastrojo de maíz está compuesto de  $37.44 \pm 1.457\%$  de celulosa,  $26.18 \pm 1.786\%$  de hemicelulosa y  $16.65 \pm 1.574\%$  de lignina. Para la caña de azúcar se obtuvo un promedio de  $44.99 \pm 1.225\%$  de celulosa,  $22.94 \pm 1.590\%$  de hemicelulosa y  $22.07 \pm 1.598\%$  de lignina, así como  $10.39 \pm 0.1074\%$  de cenizas. Por otro lado, la cachaza presenta  $38.19 \pm 0.2069\%$  de ceniza, lo que sugiere una alta presencia de minerales, además de un  $61.85 \pm 0.1749\%$  de materia orgánica.

**Palabras clave.** *Biomasa, lignocelulósicos, agroindustria.*

### Abstract

Due to genetic improvement, the use of fertilizers, agrochemicals and the use of new and better technologies in the agri-food industry, there has been a considerable increase in its waste in recent years. In this work, the percentage by weight of lignocellulosic biomass is determined: cellulose, hemicellulose and lignin present in corn stover, cellulose, holocellulose and hemicellulose in sugar cane and total ash for residual sludge from the sugar industry (cachaza). The results show that corn stover is composed of  $37.44 \pm 1.457\%$  cellulose,  $26.18 \pm 1.786\%$  hemicellulose and  $16.65 \pm 1.574\%$  lignin. For sugar cane, an average of  $44.99 \pm 1.225\%$  cellulose,  $22.94 \pm 1.590\%$  hemicellulose and  $22.07 \pm 1.598\%$  lignin, as well as  $10.39 \pm 0.1074\%$  ash was obtained. On the other hand, cachaza has  $38.19 \pm 0.2069\%$  ash, which suggests a high presence of minerals, and  $61.85 \pm 0.1749\%$  organic matter.

**Keywords.** *Biomass, lignocellulosics, agroindustry.*



## 2. Experimental

### **Pretratamiento de la muestra**

La humedad de la biomasa lignocelulósica se redujo llevando a sequedad en horno de convección forzada (60°C, 24 h) y la reducción del tamaño de partícula se realizó con ayuda de un molino de aspas marca Krups, posteriormente la muestra se homogenizó empleando un tamiz de acero inoxidable con abertura de malla número 20.

La reducción de tamaño de partícula de la cachaza se realizó con ayuda de un mortero de porcelana con pistilo y se homogeneizó de la misma manera que la biomasa celulósica, los biosólidos se encontraban secos para poder realizar este proceso.

### **Separación de compuestos extraíbles.**

Para la biomasa lignocelulósica se utilizaron los métodos estándares (T264 om-82 y T204 os-76) reportados por la Asociación Técnica de la Industria del Papel y la Pulpa (TAPPI) [4]. Se pesaron 5 g de biomasa previamente tamizada, se colocaron dentro de un filtro de papel formando un “cartucho” de extracción. La muestra se colocó en un equipo Soxhlet y la extracción se realizó tres veces, la primera utilizando una solución de 120 mL de hexano-etanol (2:1 v/v) durante 3.5 horas, la segunda extracción se realizó con 120 mL de etanol al 96% durante 2.5 horas y la tercera extracción se realizó con 120 mL de agua destilada caliente utilizando un papel filtro (Watman 110 nm) con matraz Kitasato y bomba de vacío. Finalmente, la biomasa tratada se dejó secar a 60°C durante 24 h. (n=3)

### **Cenizas**

La determinación de cenizas se realizó de acuerdo con el procedimiento de [5] sufriendo modificaciones en las temperaturas empleadas. Primero se colocaron los crisoles en una mufla a 300°C por 30 minutos hasta obtener peso constante y posteriormente se colocaron muestras de 0.5 g llevándolas a la mufla a 650°C por 30 minutos. Finalmente se pesaron para estimar el porcentaje de cenizas. (n=3)

### **% Cenizas**

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol con cenizas} - \text{Peso del crisol sin cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} * 100\% \quad (1)$$

### **Biomasa lignocelulósica**

Para la biomasa que presenta los compuestos lignocelulósicos, se siguió la metodología que reporta [4].

### **Cuantificación de Celulosa y hemicelulosa.**

Se pesaron 0.7 g de biomasa y se agregaron a un matraz Erlenmeyer con 10 mL de una solución A (Ácido acético 1.049 M y NaOH 0.5 M), 1 mL de una solución B (NaCl2 al 20% m/v) y se agitó vigorosamente hasta que toda la muestra estuvo en contacto con las soluciones agregadas. Inmediatamente se llevó a un baño de agua manteniendo una temperatura de 70°C agitando cada 30 min el matraz y agregando 1 mL de la solución B a los 45, 90, 150 y 210 min, y se mantuvo la digestión por 4 horas. Posteriormente se filtró la holocelulosa en filtros de papel previamente pesados y se lavó con 100 mL de ácido acético al 1% (v/v), después con 10 mL de acetona y los

filtros con la holocelulosa se colocaron en estufa a 105°C durante 12 horas. La holocelulosa se calculó como porcentaje en peso.

#### %Holocelulosa

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{\text{Peso del residuo seco (g)}}{\text{Peso muestra original libre de extractos (g)}} * 100 \quad (2)$$

Después de calcular el porcentaje de la holocelulosa se determinó el contenido de celulosa. A la holocelulosa contenida en cada filtro se le agregaron 3 ml de NaOH al 17.5% (p/v). Después de 5 minutos se adicionaron nuevamente 3 mL de NaOH, después de 35 minutos de la segunda adición se agregaron 15 mL de agua destilada para detener la reacción y se filtró con 60 mL de agua, 5 mL de ácido acético y 60 mL de agua otra vez. Para finalizar se agregaron 20 mL de acetona y la muestra se seca a 105°C. La celulosa se determinó en base al porcentaje en peso y el contenido de hemicelulosa se calculó por diferencia de contenido entre la holocelulosa y la celulosa.

#### % Celulosa

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Peso del residuo seco (g)}}{\text{Peso muestra original libre de extractos (g)}} * 100 \quad (3)$$

#### %Hemicelulosa

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ holocelulosa} - \% \text{ celulosa} \quad (4)$$

#### **Cuantificación de lignina.**

Se utilizaron los métodos estándares T222 om-83 y 250 UM-85 1991 y 2006 (TAPPI). Se pesó 1 g de biomasa y se colocó en un tubo de vidrio, se le agregaron 15 mL de ácido sulfúrico al 72% (v/v) y se mantuvo a 20°C durante 2 horas. Posteriormente se le agregaron 10 mL de agua y se colocó una esfera de vidrio en el borde del tubo para permitir el reflujo durante 2 horas en un baño de agua hirviendo. Después de este lapso, la muestra se pasó a través de un filtro de vidrio sinterizado, se lavó con agua destilada y se secó en la estufa. La cantidad de lignina se determinó por diferencia de peso.

#### % Lignina

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Peso de lignina (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} * 100 \quad (5)$$

#### **Cachaza**

##### **Determinación de reactividad**

Se utilizó el método de análisis de neutralización con ácidos [6] para ello se pesaron 3 g de muestra pulverizada, en un vaso de precipitados de 250 mL se añadieron 40 mL de ácido sulfúrico (0.5 mol/L) con agitación constante y se midió el pH durante 5 minutos.

##### **Densidad**

Se realizó con el método AS-04 de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se pesó un matraz aforado completamente seco, este dato se consideró como (a). Dentro del matraz se colocó 1g de muestra

con ayuda de un embudo de plástico, se registró el peso del matraz con la muestra manteniendo el matraz completamente limpio (b). Se adicionó agua destilada recientemente hervida y fría hasta la mitad del volumen del matraz, se giró éste entre los dedos con mucha suavidad y se colocó en el desecador de vacío, se realizó un vacío durante 15 minutos para eliminar todo el aire retenido en la muestra, la succión de la bomba se aumentó paulatinamente para evitar pérdidas de material por la formación de espuma; se dejó reposar dentro del desecador por 30 minutos aproximadamente y se eliminó el vacío del desecador de manera paulatina, se sacó el matraz y se llenó hasta el aforo con agua destilada hervida y fría, se secó perfectamente el exterior y se pesó en la balanza analítica (c) y se tomó la temperatura de la suspensión; posteriormente, se vació el matraz, se enjuagó perfectamente y se llenó hasta el aforo con agua destilada, hervida y fría para pesarlo (d) y se tomó la temperatura. Finalmente se realizó el cálculo de la densidad con los resultados obtenidos.

### Peso de las partículas del suelo ( $p_s$ )

$$p_s = (b) - (a) \quad (6)$$

### Volumen de las partículas del suelo ( $V_s$ )

$$V_s = \frac{(d)-(a)}{\rho_w} - \frac{(c)-(b)}{\rho_w} = \frac{\text{Peso del agua desplazada por partículas del suelo}}{\text{Densidad del agua}} \quad (7)$$

### Densidad real ( $\rho_s$ )

$$(\rho_s) = \frac{p_s}{V_s} \quad (8)$$

### Humedad

Se utilizó el método empleado por [5]. Se pesaron 5 g de muestra, se colocaron en una cápsula de porcelana, se colocaron en estufa a 105°C durante 2 horas, después se llevaron las cápsulas a un desecador para que no adquirieran humedad nuevamente mientras se enfriaban, en este momento se pesaron obteniendo peso constante.

### Materia orgánica

Se realizó el método pérdida por ignición (LOI) o gravimétrico como lo reporta [7]. Se pesaron 5 g de muestra y se secaron a 105°C durante 3 horas, se enfriaron en un desecador y se pesaron, enseguida se calcinaron a 350, 430 y 600°C durante 2 horas en una mufla. Después de la combustión, las muestras se enfriaron en un desecador y se volvieron a pesar. Con estos valores, se calculó el porcentaje de materia orgánica.

### Porcentaje de materia orgánica

$$LOI = \frac{\text{Peso seco al aire de muestra} - \text{Peso seco de la muestra después de la ignición}}{\text{Peso seco al aire de muestra}} * 100 \quad (9)$$

### Espectroscopía FT-IR

Para obtener los espectros IR de los compuestos lignocelulósicos de la biomasa lignocelulósica, las muestras se molieron en un mortero de ágata y cada muestra se colocó en el orificio de medición del equipo NICOLET iS10 de la marca ThermoFisher. El instrumento FT-IR envía radiación infrarroja entre 4,000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (mediano infrarrojo) a través de la muestra captando de esta forma las frecuencias vibracionales que presentan cada uno de los componentes celulósicos que ayudan en la identificación de estos.

### 3. Resultados y Discusión

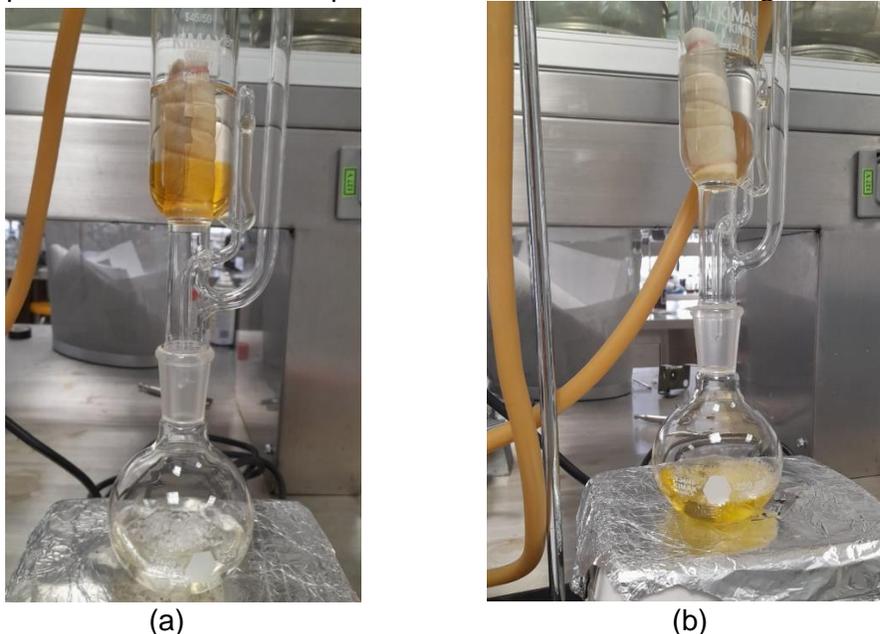
#### **Separación de compuestos extraíbles**

Los compuestos extraíbles o extractivos son un grupo de compuestos interferentes de los materiales vegetales con solventes neutros. El bagazo de caña y el rastrojo de maíz se han reportado como una fuente importante de antocianinas, flavonoides y polifenoles antioxidantes, además, las plantas gramíneas y pajas como estas tienen en sus hojas y tallos cubiertas con partículas cerosas semi cristalinas, estas ceras son alcanos de cadena larga, ésteres y alcoholes cerosos, junto con una cantidad de ácidos grasos libres [4],

La primera extracción se realizó mediante una mezcla hexano-etanol tiene como objetivo extraer más del 98 % de los ácidos grasos, resinas, esteroides, ceras y grasas presentes en la biomasa que son menos permeables al agua.

El fin de usar etanol al 100% en la segunda extracción es extraer los compuestos fenólicos presentes en la biomasa, estos compuestos representan uno de los grupos más numerosos de metabolitos secundarios en las plantas [8], muchos de ellos responsables de dar color a las mismas, por esta razón, se presentó un cambio de color en el solvente (Figura 2).

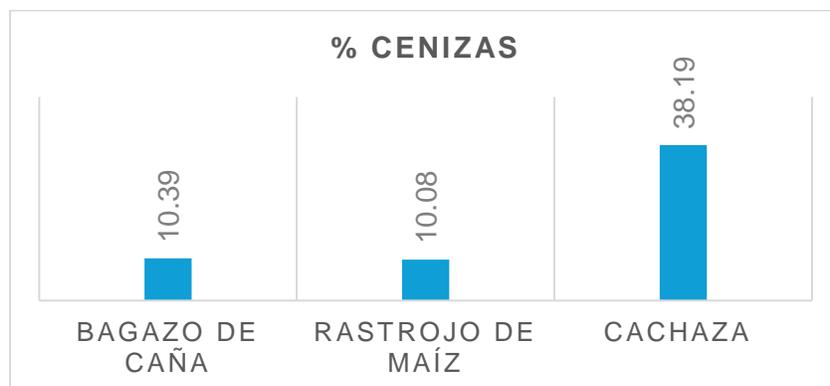
Este pretratamiento con solventes al bagazo de caña permite que los compuestos celulósicos de la biomasa se puedan obtener con una pureza más alta sin causar su degradación.



**Figura 2.** Separación de compuestos extraíbles de la biomasa lignocelulósica 2a. Inicio de la extracción 2b. Etapa final de la extracción.

### Cenizas

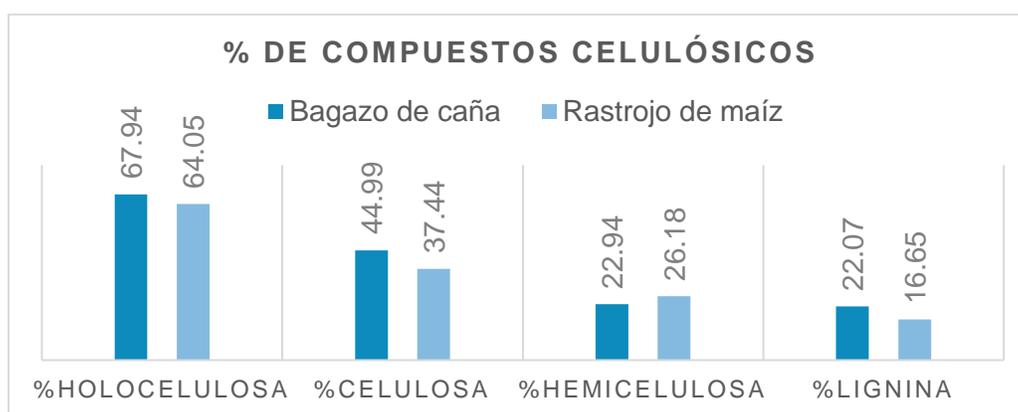
Los minerales constituyentes (ceniza) permanecen en el residuo en forma de óxidos, sulfatos, silicatos y cloruros, dependiendo de las condiciones de incineración y la composición del producto analizado [9] y representan la presencia de residuos inorgánicos.



**Figura 3.** Porcentaje en peso de cenizas de rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar y cachaza.

### Cuantificación de celulosa, hemicelulosa y lignina

El tratamiento que se le aplica a la biomasa para obtener holocelulosa se basa en un tratamiento alcalino de deslignificación, con el fin de separar la lignina de las fibras celulósicas en la biomasa lignocelulósica mediante la ruptura de los enlaces éster y éter en la lignina [10]. El tratamiento para cuantificar la lignina se basa en la disolución de la celulosa y otros carbohidratos, separando así la lignina de los demás componentes presentes y dejándola como un residuo soluble que se determina gravimétricamente. La lignina aislada se denomina "lignina Klason". El uso de ácido sulfúrico al 72 % promueve la hidrólisis de carbohidratos presentes en la biomasa [11].



**Figura 4.** Porcentajes de los compuestos lignocelulósicos presentes en los residuos rastrojo de maíz y bagazo de caña.

La fibra de la celulosa es higroscópica, lo que significa que absorbe y exhala la humedad según las condiciones de las sustancias que la rodeen, esto puede crear una atmósfera donde se facilite la expansión de raíces, ahorro de agua, abono, y se potencie a su vez la fertilización del suelo; dado que el bagazo y el rastrojo presentaron 44.99% ( $\sigma=1.2248$ ) y 37.44% ( $\sigma=1.4569$ ) de celulosa respectivamente, en combinación con 22.94 ( $\sigma=1.5897$ ) y 26.18% ( $\sigma=1.7857$ ) de hemicelulosa que está compuesta por principalmente azúcares lo que los convierte en una opción viable para el enriquecimiento de suelos.

Además de ser una excelente alternativa para la industria renovable [12], donde mediante tratamientos químicos, biológicos, físicos o térmicos puede transformarse en productos de gran valor, un claro ejemplo son los biocombustibles; la celulosa y hemicelulosa se pueden transformar en etanol mientras que la lignina puede ser utilizada para generar vapor y electricidad [13].

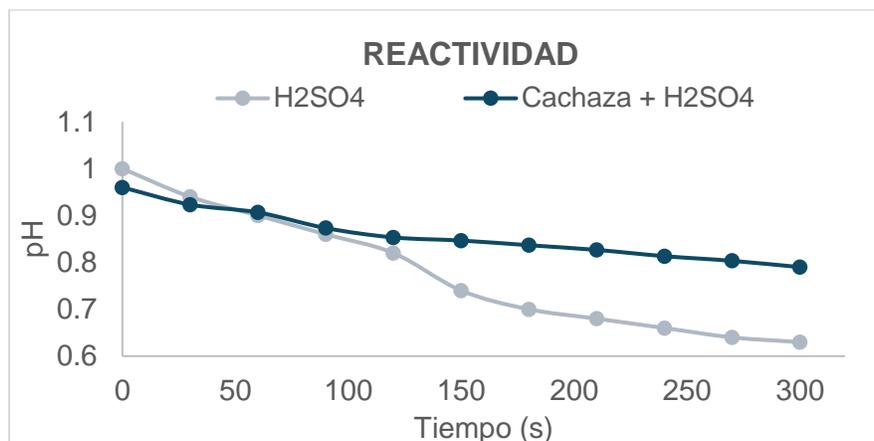
### **Composición de cachaza**

La densidad real del suelo es la relación que existe entre el peso en seco de éste y el volumen real de sus partículas, y varía con la proporción de elementos que lo constituyen, la densidad de 1.011 g/cm<sup>3</sup> se considera muy bajo [14] este comportamiento se debe al contenido de materia orgánica y minerales que la constituyen, clasificando la cachaza como un suelo arcilloso, este tipo de suelos tienen una gran capacidad para retener el agua, también suelen ser fértiles dada la alta capacidad de retención de nutrientes, por lo que responden bien a la falta de nutrición externa y evitan que se laven fácilmente los nutrientes aportados [15]. La humedad puede variar dependiendo del origen y tratamiento de secado que se le haya aplicado previamente, mientras que para la materia orgánica la pérdida de peso deber ser proporcional a la cantidad de carbono orgánico presente en la muestra, el porcentaje obtenido supera el 60%, lo que indica un alto porcentaje de nutrientes y lo que favorecería a regular la temperatura del suelo [16].

**Tabla 1.** Composición de la cachaza.

	<b>Densidad</b>	<b>Humedad</b>	<b>Materia orgánica</b>
<b>Cachaza</b>	1.001 g/cm <sup>3</sup>	5.080%	61.85%
<b><math>\sigma</math></b>	0.009600	0.0004	0.1749

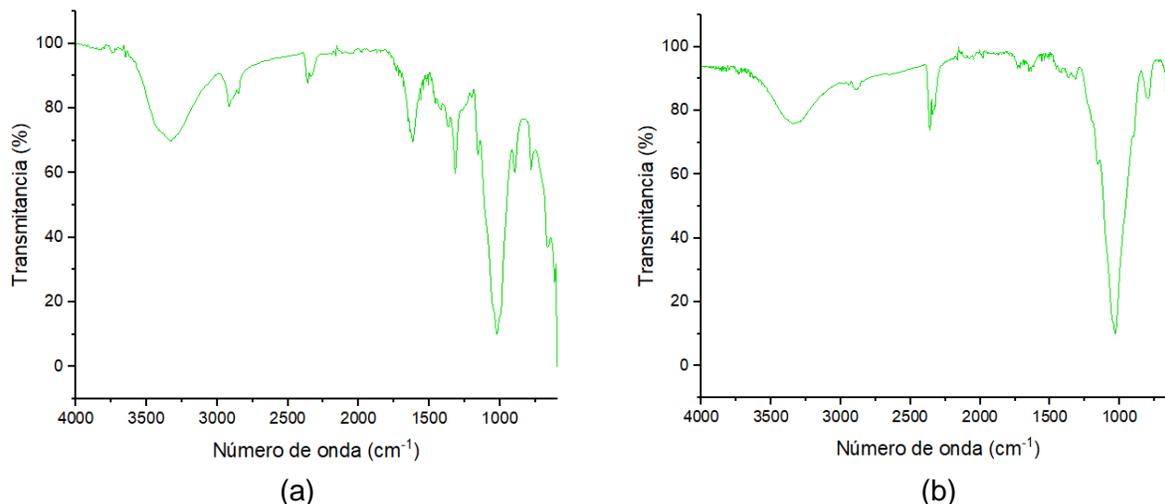
La reactividad de un suelo hace referencia al grado de acidez de éste, las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo están influenciadas por la acidez y basicidad del medio, que a su vez condicionan el uso agronómico del suelo ya que en función del pH se producen propiedades que influyen directamente sobre el crecimiento vegetal y en la disponibilidad de los nutrientes o procesos de intercambio catiónico [17]. De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 este resultado (Figura 5) indica que el suelo es medianamente alcalino al encontrarse dentro del rango 7.4-8.5, estos resultados indicarían que la génesis del suelo se ve influenciada por la acidez o alcalinidad de su solución.



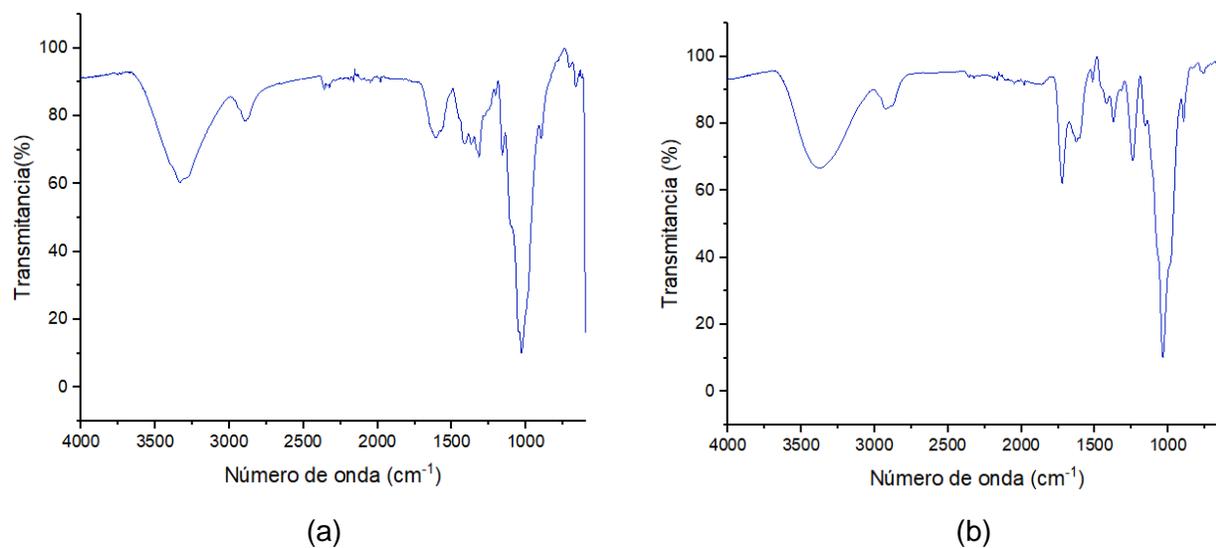
**Figura 5.** Porcentajes de los compuestos lignocelulósicos presentes en los residuos rastrojo de maíz y bagazo de caña.

### ***Espectroscopía Infrarroja (FT-IR)***

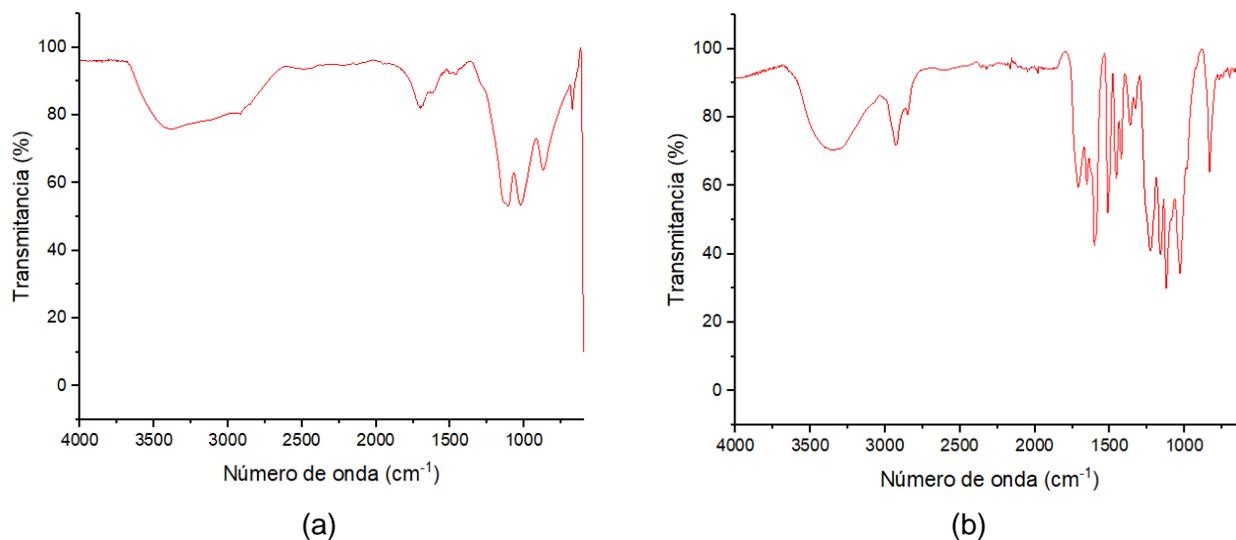
El espectro de FT-IR se obtuvo en la región de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , se lograron identificar los picos característicos de la celulosa, hemicelulosa y lignina (Figuras 6, 7y 8) comparando con las bandas referenciadas por distintos autores (Tabla 2, 3 y 4).



**Figura 6.** Espectros IR de muestras de celulosa contenida en 6a. bagazo de caña y 6b. rastrojo de maíz



**Figura 7.** Espectros IR de muestras de hemicelulosa contenida en 7a. bagazo de caña y 7b. rastrojo de maíz



**Figura 8.** Espectros IR de muestras de hemicelulosa contenida en 7a. bagazo de caña y 7b. rastrojo de maíz

**Tabla 2.** Principales bandas vibracionales identificadas en el espectro IR de celulosa.

Banda referencia (cm <sup>-1</sup> )	Banda identificada (cm <sup>-1</sup> )		Asignación
	Bagazo	Maíz	
3424	3330	3338	Estiramiento simétrico O-H
2890	2892	2870	Estiramiento asimétrico C-H (alquilos y alifáticos)
1638	1630	1635	Vibración O-H (agua absorbida por las fibras naturales)
1430-1320	-	1417	Vibración CH <sub>2</sub> (polisacáridos)
1159-1022	1154 y 1031	1156	Estiramiento asimétrico C-O-C de la celulosa
895	893	-	Vibración CO-C de los enlaces β-glucosídicos en la celulosa

**Tabla 3.** Principales bandas vibracionales identificadas en el espectro IR de hemicelulosa.

Banda referencia (cm <sup>-1</sup> )	Banda identificada (cm <sup>-1</sup> )		Asignación
	Bagazo	Maíz	
3424	3330	3369	Estiramiento simétrico O-H
2890	2892	2920	Estiramiento asimétrico C-H (alquilos y alifáticos)
1718	-	1722	Estiramiento C=O en xilanos
1638	1630	-	Vibración O-H (agua absorbida por las fibras naturales)
1430-1320	1427	-	Vibración CH <sub>2</sub> (polisacáridos)
1372	1371	1371	Estiramiento alifático
1159-1022	1154 y 1031	1034	Estiramiento asimétrico C-O-C de la celulosa
895	893	897	Vibración CO-C de los enlaces β-glucosídicos en la celulosa.

**Tabla 4.** Principales bandas vibracionales identificadas en el espectro IR de lignina.

Banda referencia (cm <sup>-1</sup> )	Banda identificada (cm <sup>-1</sup> )		Asignación
	Bagazo	Maíz	
3500-3200	3330	3290	Estiramiento simétrico O-H
3000-2830	2892	2926	Estiramiento asimétrico C-H (alquilos y alifáticos)
1760-1665	1700	-	Estiramiento C=O (carbonilos)
1605-1593	1600	1598	Vibración C-O (carbonilos)
1550-1475	-	1510	Enlace C=C (aromáticos)
1470-1370	-	1421	Vibración C-O (aromáticos)

1320-1000	1000-1300	1122 y 1030	Vibraciones carbohidratos
-----------	-----------	----------------	---------------------------

La banda de absorción en 893 y 897  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento de los enlaces CO-C de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos en la celulosa [18] lo que indican la presencia de celulosa en la muestra de hemicelulosa.

La señal de 1700  $\text{cm}^{-1}$  en la Tabla 4 corresponde al estiramiento del C=O presente en la lignina, no fue observada en los espectros de celulosa y hemicelulosa lo que significaría que el proceso de deslignificación se realizó con éxito. Las vibraciones que originan los carbohidratos están asociadas a la región espectral 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$ , lo que significaría que en el tratamiento con ácido estos no fueron completamente hidrolizados [19].

#### 4. Conclusiones

Se logró hacer la separación y obtención de los compuestos lignocelulósicos del bagazo de caña y rastrojo de maíz de los compuestos extraíbles que ambas biomásas contienen (principalmente flavonoides, ceras y antocianinas) además de su identificación por espectroscopía FT-IR.

De acuerdo con la cuantificación de los compuestos lignocelulósicos el bagazo de caña de azúcar y el rastrojo de maíz están compuestos respectivamente por 44.99 $\pm$ 1.225% y 37.44 $\pm$ 1.457% celulosa, 22.94 $\pm$ 1.590% y 26.18 $\pm$ 1.786% hemicelulosa, 22.07 $\pm$ 1.598% y 16.65 $\pm$ 1.574% de lignina, 10.39 $\pm$ 0.1074% y 10.08% de ceniza.

Los compuestos lignocelulósicos no se presentan de forma individual en las plantas, sino que están acompañados de otros diversos elementos orgánicos presentes en la pared celular del rastrojo, por esta razón, para obtener material lignocelulósico libre de impurezas, es indispensable realizar pre-tratamientos químicos a la biomasa para extraer los compuestos no deseados.

Por otro lado, la cuantificación de los componentes (materia orgánica y cenizas) y propiedades físicas y químicas de la cachaza resultaron en 38.19 $\pm$ 0.2069% de cenizas, 61.85 $\pm$ 0.1749% de materia orgánica, con una densidad de 1.011  $\text{g/cm}^3$ , y 5.08% de humedad.

#### 5. Agradecimientos

Agradecimientos al IBT Tomas Arturo Gallegos De los Santos por proporcionar las biomásas para el desarrollo del proyecto.

Proyecto financiamiento por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional SIP20242433.

#### 6. Referencias

[1] M. Patel, A. Kumar. Production of renewable diesel through the hydroprocessing of lignocellulosic biomass-derived bio-oil: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 58, 1293-1307 (2016).

- [2] V. Castro, D. C. Rodríguez, C.A. Vega-Posada, Bioprecipitación inducida con cachaza de caña de azúcar como mecanismo potenciador para el mejoramiento estructural de bloques de tierra comprimida. *Revista EIA*, 18(35), Reia35012. pp. 1-20. <https://doi.org/10.24050/reia.v18i35.1423> (2021).
- [3] A.S. Norfarhana, R.A. Ilyas, N. Ngadi, M. Hafiz, M. Syukri, M. Faiz. Revolutionizing lignocellulosic biomass: A review of harnessing the power of ionic liquids for sustainable utilization and extraction, *International Journal of Biological Macromolecules*, **256** [1], 1-22 (2024).
- [4] J. Espinoza. Extracción y caracterización de lignina de paja de trigo (*Triticum durum*) y uso para mejorar las propiedades funcionales de películas de almidón. Tesis doctoral. Universidad de Sonora. (2015).
- [5] J. Galvis, X. Rivera. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los lodos presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales (PTARI) de la empresa Jugos Hit de la ciudad de Pereira. Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. (2013).
- [6] Y. Cabrales-Clapé, M. Ulloa-Carcassés, R. Almenares-Reyes. Caracterización física y química de lodos residuales de la cantera El Cacao: propuesta de uso industrial. Departamento de Minería. Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa, Holguín, Cuba. 411-413 (2017).
- [7] S. Barrenzuela-Unda, Cervantes-Alava, A., Ullauri-Espinoza, M., Barrera-León, J., Condoy-Gorotiza, A. Evaluación del método de ignición para determinar materia orgánica en suelos de la provincia el Oro-Ecuador. *FAVE-Ciencias Agrarias*, 19(2), 28-29. DOI <https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.9747> (2020).
- [8] F. Shahidi, P. Amgigaipalan. Phenolics and polyphenolics in food, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *Journal of Functional Foods* 18, 820-897 (2015).
- [9] B. Márques. Cenizas y grasas. Trabajo de grado de licenciatura, Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú. (2014).
- [10] R. Trovagunta, T. Zou, M. Österberg, S., Kelley, S., Lavoine, N. Design strategies, properties and applications of cellulose nanomaterials-enhanced products with residual, technical or nanoscale lignin—A review. *Carbohydrate Polymers*. **254** (2021).
- [11] I. Alomá, M. Cortés, I. Rodríguez, A. Curbelo. Propuestas de alternativas para la disposición final del bagazo agotado empleado en tratamiento especializado a residuales galvánicos de la empresa Inpud. *Centro azúcar*, 37(1): 58-63. (2010).
- [12] V. Lara. La biomasa convierte los residuos en recursos energéticos. Madrid. Obtenido de <http://www.ambientum.com/revista/2016/octubre/biomasa-convierte-residuos-recursos-energeticos.asp>. (2016).
- [13] E. Cerdá. Energía obtenida a partir de biomasa. Cuadernos económicos de ICE. Núm 83, 2012, ISSN 0210-2633, pp. 117-140, 24 p. Madrid, España. (2012).
- [14] SEMARNAT. NOM-021-SEMARNAT-2000: Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. Ciudad de México: SEMARNAT. (2002).
- [15] <https://coarval.com/clasificacion-de-los-tipos-de-suelos/> COARVAL. Clasificación de los tipos de suelos. Picassent Valencia. Consultado el 12 de junio de 2024
- [16] G. I. Hernández, S. Salgado., D. Palma., L del C. Lagunes, M. Castelán, O. Ruiz. Vinaza y composta de cachaza como fuente de nutrientes en caña de azúcar en un Gleysol mólico de Chiapas, México. *Interciencia* 33(11) 855-860. (2008).

- [17] <https://mexico.infoagro.com/composicion-quimica-del-suelo-y-su-ph/#:~:text=La%20reacci%C3%B3n%20de%20un%20suelo,ser%20%C3%A1cido%2C%20neutro%20o%20alcalino> InfoAgro. Composición química del suelo y su pH. Editorial Informativo Agrícola de México. (2017). Consultado el 12 de junio de 2024.
- [18] Y. Yue, J. Han, G. Han, Q. Zhang, A.D. French, Q. Wu. Characterization of cellulose I/II hybrid fibers isolated from energycane bagasse during the delignification process: Morphology, crystallinity and percentage estimation. *Carbohydrate Polymers*, 133, 438-447 (2015).
- [19] A. H. Colagar, M. J. Chaichi, T. Khadjvand. Fourier transform infrared microspec-troscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue. *Journal of Biosciences* 36(4): 669-677. (2011).
- [20] M. Vallejo, M. Area. *Nanocelia: Producción y usos de la celulosa nanofibrilada y microfibrilada* (1 ed.). Universidad Nacional de Misiones. (2019).
- [21] Y. Zheng, J. Zhao, F. Xu, Y. Li. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production., *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. 42, pp. 35-53. (2014).

## Determinación de las constantes de acidez del zincon en medio acuoso por espectrofotometría de UV-Vis

Jorge Martínez Guerra, Luis Fernando Vazquez Zamora, Alberto Rojas-Hernández.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Sección, Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310, CDMX, México. Tel: +52 (55) 58 04 46 00 Ext.4378, e-mail: [jmguerra318@xanum.uam.mx](mailto:jmguerra318@xanum.uam.mx)

### Resumen

En este trabajo se expone una metodología para la determinación de las constantes de acidez del zincon a fuerza iónica 0.5 M y temperatura de  $(25.0 \pm 0.1)$  °C mediante una titulación ácido-base con monitoreo espectrofotométrico y potenciométrico. El análisis de regresión no lineal de los datos espectrofotométricos, llevado a cabo a través del programa computacional SQUAD, determina que el mejor modelo de equilibrio químico para el zincon en disolución acuosa es un sistema tetraprótico con los siguientes valores de constantes de acidez:  $pK_{a1} = 5.244 \pm 0.112$ ,  $H_4Z \rightleftharpoons H_3Z^- + H^+$ ;  $pK_{a2} = 7.938 \pm 0.098$ ,  $H_3Z^- \rightleftharpoons H_2Z^{2-} + H^+$ ;  $pK_{a3} = 10.968 \pm 0.067$ ,  $H_2Z^{2-} \rightleftharpoons HZ^{3-} + H^+$ ; y  $pK_{a4} = 12.986 \pm 0.026$ ,  $HZ^{3-} \rightleftharpoons Z^{4-} + H^+$ . Es importante destacar que la metodología en este trabajo es la primera en la literatura en reportar un cuarto valor de  $pK_a$ .

**Palabras clave.** Zincon,  $pK_a$ , UV-Vis, SQUAD.

### Abstract

In this work, a methodology is presented for the determination of the acidity constants of zincon at  $I = 0.5$  M and  $T = (25.0 \pm 0.1)$  °C through acid-base titration with spectrophotometric and potentiometric monitoring. The nonlinear regression analysis of the spectrophotometric data carried out through SQUAD finds that the best chemical equilibrium model for zincon in aqueous solution is a tetraprotic system with the following values of acidity constants:  $pK_{a1} = 5.244 \pm 0.112$ ,  $H_4Z \rightleftharpoons H_3Z^- + H^+$ ;  $pK_{a2} = 7.938 \pm 0.098$ ,  $H_3Z^- \rightleftharpoons H_2Z^{2-} + H^+$ ;  $pK_{a3} = 10.968 \pm 0.067$ ,  $H_2Z^{2-} \rightleftharpoons HZ^{3-} + H^+$ ; and  $pK_{a4} = 12.986 \pm 0.026$ ,  $HZ^{3-} \rightleftharpoons Z^{4-} + H^+$ . It is important to highlight that the methodology in this work is the first in the literature to report a fourth  $pK_a$  value.

**Keywords.** Zincon,  $pK_a$ , UV-Vis, SQUAD.

## 1. Introducción

El zincon, Z, es una molécula que debido a su estructura química (ver figura 1) puede desempeñar el papel de base de Lewis para así formar compuestos coordinados. A pesar de que esta capacidad coordinante es aprovechada principalmente en la determinación de zinc, cobre, y cobalto a través de valoraciones complejométricas [1, 2]; la información disponible con respecto a su especiación química en medio acuoso aún permanece inconsistente. Mientras Ringbom [3] reporta dos valores de constantes de acidez:  $pK_{a1} = 4.5$  y  $pK_{a2} = 8.3$ ; Sadek y colaboradores [4] reportan tres constantes de acidez:  $pK_{a1} = 4.0$ ,  $pK_{a2} = 7.9$  y  $pK_{a3} = 15.0$ . Recientemente, en 2017, Kocyla y colaboradores [5] reportan también tres constantes de acidez:  $pK_{a1} = 2.6$ ,  $pK_{a2} = 4.0$  y  $pK_{a3} = 8.0$ . Este conjunto de valores presenta diferencias con respecto a los reportados previamente por [3] y [4].

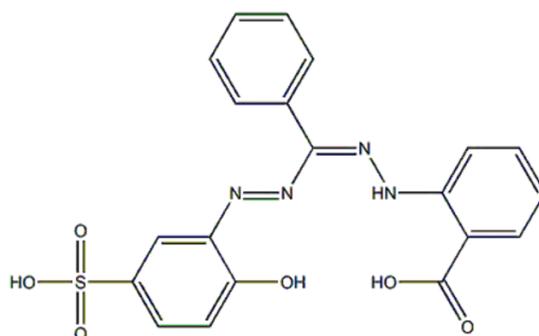


Figura 1. Estructura química del zincon, Z.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es esclarecer estas discrepancias contribuyendo en el estudio fundamental de los equilibrios químicos del Z en disolución acuosa determinando las constantes de acidez a fuerza iónica,  $I$ , igual a 0.5 M y temperatura,  $T$ , igual a  $(25.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$  por medio de una valoración ácido-base con monitoreo potenciométrico y espectrofotométrico en la región del espectro electromagnético UV-Vis.

## 2. Experimental

### 2.1. Estudio Potenciométrico

Se preparó una disolución de trabajo de zincon,  $[Z] = 10^{-4}$  M, en hidróxido de sodio,  $[\text{NaOH}] = 10^{-1}$  M y cloruro de sodio,  $[\text{NaCl}] = 10^{-0.3}$  M. La disolución de trabajo se burbujeó con  $\text{N}_{2(g)}$  y se mantuvo a  $(25.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$  empleando una celda de doble camisa conectada a un recirculador Gran W14. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) libre de materia orgánica. La disolución de trabajo de Z fue titulada con ácido perclórico

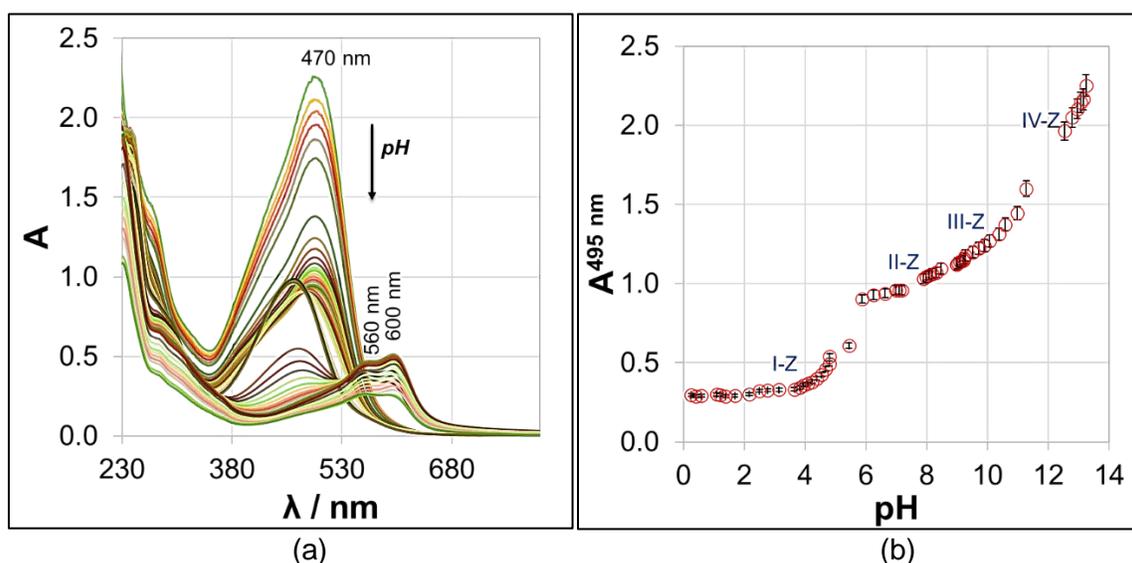
1 M, obteniéndose valores de pH en el intervalo de 0.3 a 13.3. Los valores de pH fueron obtenidos con un potenciómetro sensION equipado con un electrodo Hach 5014 T  $\text{Ag}^+|\text{AgCl}|\text{[KCl]} = 3 \text{ M}$ .

### 2.2. Estudio Espectrofotométrico

Para cada variación de pH se registró la absorbancia como una función de la longitud de onda usando un espectrofotómetro PERKIN ELMER equipado con celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud de paso óptico. El intervalo de longitud de onda fue de 200 a 800 nm.

## 3. Resultados y Discusión

En la figura 2a se muestra la familia de espectros de absorción del zincon como una función de la longitud de onda para cada valor de pH. A valores de pH básicos se aprecia un máximo de absorbancia a 470 nm el cual presenta un efecto hipocrómico e hipsocrómico conforme el valor de pH va disminuyendo. A valores de pH cercanos al neutro el comportamiento se invierte presentándose un efecto batocrómico. A valores de pH muy ácidos se logra distinguir dos bandas, a 560 y 600 nm. Estas diferencias que dependen del pH así como la evidencia de varios puntos isobésticos en 450 nm, 515 nm y 530 nm son evidencias de la presencia de al menos dos especies químicas y por tanto, de al menos un equilibrio químico de tipo ácido-base de Brønsted.

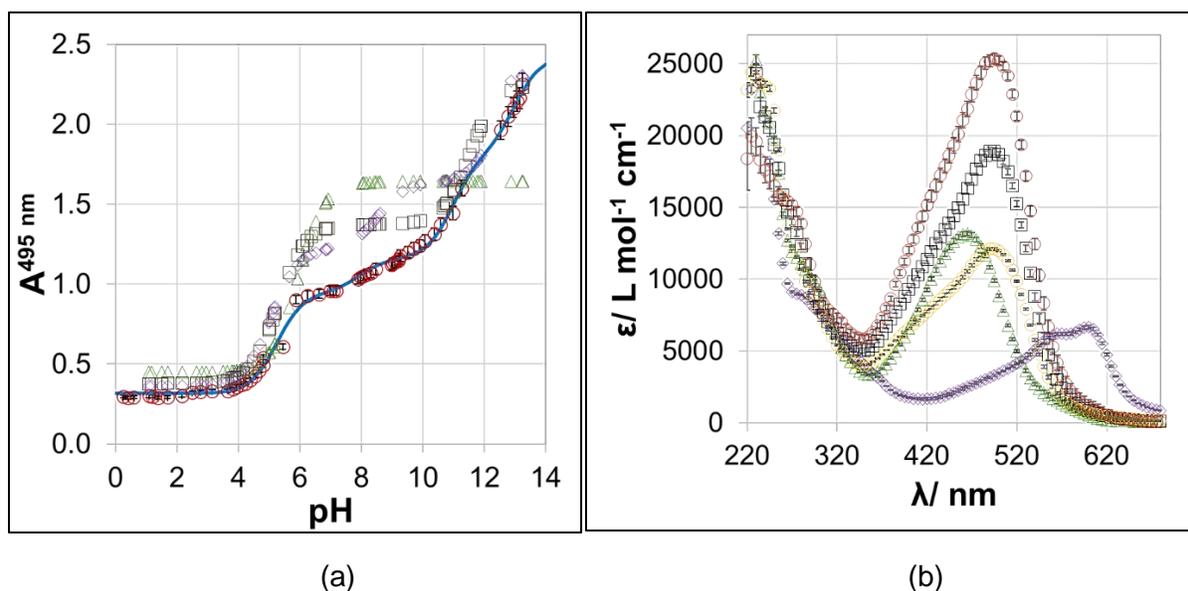


**Figura 2.** (a) Familia de espectros de absorción del Z; (b) Valores de absorbancia a 495 nm como una función del pH.

Con el objetivo de confirmar la presencia de uno o más equilibrios ácido-base que a su vez pudieran estar asociados a constantes de acidez ( $pK_a$ ), se grafica la absorbancia a 495 nm (que es una longitud de onda que, como en otras, se observan más cambios de absorbancia al variar el pH) como una función del pH, ver figura 2b. Es posible observar cuatro momentos importantes en la sigmoide, indicados en la figura 2b como I-Z a IV-Z. De esta manera I-Z, asociado al primer

$pK_a$ , se encontraría en un valor de pH cercano a 4, mientras que II-Z y III-Z estarían localizados en valores de pH próximos a 7 y 10 respectivamente; y IV-Z, correspondiente al cuarto valor de  $pK_a$  estaría comprendido en un valor cercano a pH 12.

Una vez localizados los posibles valores de  $pK_a$  se procede a realizar un refinamiento de datos utilizando el programa computacional SQUAD. Este programa funciona a través de una minimización de la suma residual cuadrática, dada entre la absorbancia experimental y la absorbancia calculada por SQUAD (U) a través de una regresión no lineal para un modelo químico en particular [6-8]. Los modelos químicos que se trataron y que fueron introducidos al archivo de entrada de SQUAD fueron aquellos que consideraban desde un equilibrio ácido-base, y por tanto un valor de  $pK_a$ ; hasta un modelo con cuatro equilibrios asociados a cuatro constantes de acidez. Así en la figura 3a se muestran a detalle los ajustes obtenidos para cada modelo químico que se probó donde el marcador  $\triangle$  representa a un modelo de un equilibrio químico ácido-base con un valor de  $pK_a$ , los marcadores  $\square$  y  $\diamond$  representan modelos de equilibrios químicos considerando al zincon como un sistema diácido y un triácido respectivamente; y la línea continua color azul — representa a un modelo con cuatro equilibrios químicos tipo ácido-base. Es posible notar que el mejor modelo químico que ajusta a los marcadores denotados por  $\circ$ , y que representan valores de absorbancia experimentales es el modelo de cuatro equilibrios lo cual implica que el zincon presenta cuatro constantes de acidez, ver tabla 1. Además del refinamiento de las constantes de equilibrio, SQUAD ofrece la determinación de los coeficientes de absorptividad molar para cada especie que absorbe en el sistema, figura 3b. Así, al tener cuatro valores de  $pK_a$  se tendría la presencia de cinco especies que absorben en el sistema donde la absorbancia experimental, sería la contribución de absorción de luz de cada una de estas especies químicas.



**Figura 3.** (a) Modelos de equilibrio químico de tipo ácido-base considerando un valor de  $pK_a$  ( $\Delta$ ), dos  $pK_a$  ( $\square$ ), tres  $pK_a$  ( $\diamond$ ) y cuatro  $pK_a$  ( $-$ ); (b) coeficientes de absorptividad molar de cada especie de Z como una función de la longitud de onda:  $\circ$   $Z^+$ ,  $\square$   $HZ^{3-}$ ,  $\circ$   $H_2Z^{2-}$ ,  $\Delta$   $H_3Z^-$  y  $\diamond$   $H_4Z$ .

**Tabla 1.** Valores de constantes de acidez para el zincon en medio acuoso a  $I = 0.5 \text{ M}$  y  $T = (25.0 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$ .

No. datos	$\lambda / \text{nm}$	Equilibrio químico	$pK_a \pm s$	U/n	$\sigma_{\text{reg}}$
54 espectros de 5 nm en 5 nm	200-800	$H_4Z \rightleftharpoons H_3Z^- + H^+$	$5.244 \pm 0.112$	$10^{-3.7}$	$3.02 \times 10^{-2}$
		$H_3Z^- \rightleftharpoons H_2Z^{2-} + H^+$	$7.938 \pm 0.098$		
		$H_2Z^{2-} \rightleftharpoons HZ^{3-} + H^+$	$10.968 \pm 0.067$		
		$HZ^{3-} \rightleftharpoons Z^+ + H^+$	$12.986 \pm 0.026$		

En la tabla 2 se muestra una comparación de los valores de  $pK_a$  obtenidos en este trabajo con respecto a los que están reportados en la literatura.

**Tabla 2.** Valores de constantes de acidez del zincon reportados en la literatura.

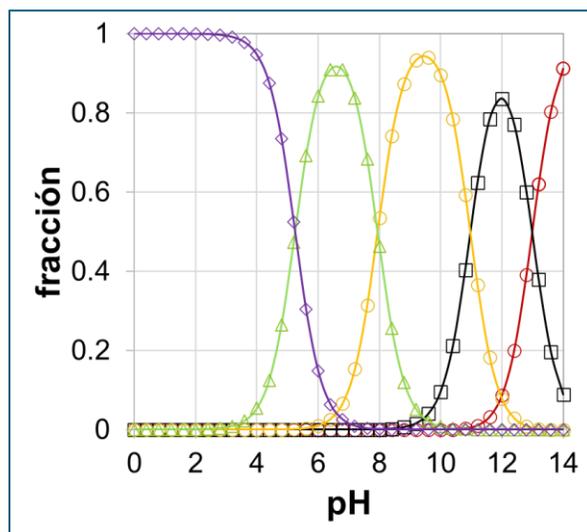
Referencia	$pK_{a-1} \pm s$	$pK_{a1} \pm s$	$pK_{a2} \pm s$	$pK_{a3} \pm s$	$pK_{a4} \pm s$
Ringbom y colab; 1979 [3]		$4.5 \pm \text{N.R.}$	$8.3 \pm \text{N.R.}$	$\text{N.R.} \pm \text{N.R.}$	$\text{N.R.}$
Sadek y colab; 1958 [4]		$4.0 \pm \text{N.R.}$	$7.9 \pm \text{N.R.}$	$15 \pm \text{N.R.}$	$\text{N.R.}$
Kocyla y colab; 2017 [5]	$2.6 \pm \text{N.R.}$	$4.0 \pm \text{N.R.}$	$8.0 \pm \text{N.R.}$	$\text{N.R.}$	$\text{N.R.}$
<i>Este trabajo</i>		$5.244 \pm 0.112$	$7.938 \pm 0.098$	$10.968 \pm 0.067$	$12.986 \pm 0.026$

N.R. significa No Reportada

Sólo Kocyla y colaboradores [5] dan un valor del  $pK_a$  más ácido (2.6). Es curioso notar que el  $pK_{a1}$  y el  $pK_{a2}$  obtenidos en este trabajo se asemejan a los valores reportados por Ringbom [3] así como a los de Sadek y colaboradores [4]; mostrando una diferencia máxima de 0.7 y 0.4 unidades respectivamente. Algo a destacar del aporte de este trabajo es que se logra reportar una cuarta constante de acidez que previamente no ha sido reportada.

Una vez conocidos los valores de constantes de acidez estos pueden ser capitalizados para que, a través de la metodología de Rojas-Hernández y colaboradores [9] se lleve a cabo la construcción de un diagrama de distribución de especies. Este tipo de representaciones gráficas en dos dimensiones son de suma importancia pues nos da información de la fracción estadística o distributiva de cada especie de zincon que predomina a un valor determinado de pH; incluso es posible destacar la presencia de tres anfolitos ácido-base intrínsecamente estables en medio

acuoso:  $\text{H}_3\text{Z}^-$ ,  $\text{H}_2\text{Z}^{2-}$  y  $\text{HZ}^{3-}$ , donde el valor de la constante de dismutación de cada uno de ellos es menor a la unidad, ver figura 4.



**Figura 4.** Diagrama de distribución de especies de zinc en medio acuoso.  $\circ$   $\text{Z}^{4-}$ ,  $\square$   $\text{HZ}^{3-}$ ,  $\circ$   $\text{H}_2\text{Z}^{2-}$ ,  $\triangle$   $\text{H}_3\text{Z}^-$  y  $\diamond$   $\text{H}_4\text{Z}$ .

#### 4. Conclusiones

Fue posible exponer en este trabajo evidencia experimental previamente no reportada en la literatura que pone de manifiesto que el mejor modelo de equilibrio químico para el zinc es aquél que presenta cuatro valores de  $pK_a$ , por tanto, cinco especies químicas que absorben en medio acuoso a  $I = 0.5 \text{ M}$ . El conocimiento de estas constantes de equilibrio es la base que permite la construcción de diferentes representaciones gráficas que permiten explicar la reactividad termodinámica del zinc en disolución acuosa, lo cual puede utilizarse para su mejor caracterización fisicoquímica, usando otras técnicas instrumentales, o aplicarse para el diseño de métodos analíticos de cuantificación más robustos.

#### 5. Agradecimientos

Jorge Martínez Guerra y Alberto Rojas Hernández agradecen al Consejo Nacional de Humanidades de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) así como al Sistema Nacional de Investigadoras e Investigadores (SNI) por el nombramiento y recursos otorgados. Jorge Martínez Guerra, Alberto Rojas Hernández y Luis Fernando Vazquez Zamora agradecen a la UAM Unidad Iztapalapa por la infraestructura y recursos para esta investigación.

## 6. Referencias

- [1] C. E. Sabel, J. M. Neureuther, S. Siemann. A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper and cobalt ions in metalloproteins using zincon. *Analytical Biochemistry*, **397** [2], 218-226, (2010).
- [2] G. K. Singhal, K. N. Tandon. Studies on metallochromic indicators-II: zincon and its mercury and zinc complexes as indicators in EDTA titrations. *Talanta*, **14** [11], 1351-1353, (1967).
- [3] A. Ringbom. Formación de complejos en química analítica. Alhambra, España, 431, (1963).
- [4] F. S. Sadek, W. W. Schmid, C. N. Rexllysz. Visual EGTA titration of calcium in the presence of magnesium. *Journal of Chemical Education*, **35** [6], 306-308, (1958).
- [5] A. Kocyla, A. Pomorski, A. Krężel. Molar absorption coefficients and stability constants of zincon metal complexes for determination of metal ions and bioinorganic applications. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **176**, 53-65, (2017).
- [6] D. J. Leggett, W. A. E. Mc Bryde. General computer program for the computation of stability constants from absorbance data. *Analytical Chemistry*, **47**, 1065-1070, (1975).
- [7] J. Martínez-Guerra, M. Palomar-Pardavé, M. Romero-Romo, S. Corona-Avenidaño, A. Rojas-Hernández, M. T. Ramírez-Silva. New insights on the chemical stability of curcumin in aqueous media at different pH: influence of the experimental conditions. *International Journal of Electrochemical Science*, **14**, 5373-5385 (2019).
- [8] J. Martínez-Guerra, M. Palomar-Pardavé, M. Romero-Romo, S. Corona-Avenidaño, D. S. Guzmán-Hernández, A. Rojas-Hernández, M. T. Ramírez-Silva. On the curcumin and  $\beta$ -cyclodextrin interaction in aqueous media. Spectrophotometric and electrochemical study. *ChemElectroChem*, **9**, 1-9, (2022).
- [9] A. Rojas-Hernández, M. T. Ramírez, I. González, J. G. Ibáñez. Predominance-zone diagrams in solution chemistry: dismutation processes in two-component systems (M-L). *Journal of Chemical Education*, **72**, 1099-1105, (1995).

## Separación electroforética de hidrocarburos monoaromáticos mediante cromatografía electrocinética micelar

Hernán Hernández González <sup>a</sup>, Israel Samuel Ibarra Ortega <sup>\*a</sup>, Juan Francisco Flores Aguilar <sup>a</sup>, Gabriela Islas Guerrero <sup>ab</sup>, María Elena Páez Hernández <sup>a</sup>, Salvador Pérez Estrada <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, 42184, Mineral de la Reforma, Hgo, Mexico, 771 717 2000. e-mail: [israel\\_ibarra@uaeh.edu.mx](mailto:israel_ibarra@uaeh.edu.mx)  
<sup>b</sup> Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Área de Ingeniería Agroindustrial, 42640 Tepatepec, Hgo, México, 738 724 1174

### Resumen

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como fenol (Ph), benceno (B), tolueno (T), etilbenceno (E) y p-xileno (X) tienen una alta presencia en el medio ambiente, que, sumado a sus características físicas y químicas, representan un riesgo para la salud cuando entran en el organismo humano. El presente trabajo describe los primeros pasos del desarrollo de una metodología para el análisis de los PhBTEX mediante electroforesis capilar por cromatografía electrocinética micelar (MEKC). En este sentido, la solución electrolito fue evaluada estudiando la influencia de la concentración de los siguientes componentes; Sales de boratos y fosfatos a distintas proporciones, dodecil sulfato de sodio (SDS),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y agentes orgánicos (acetonitrilo y metanol). Las variables críticas fueron optimizadas obteniendo las mejores condiciones en términos de separación y resolución electroforética empleando una mezcla de las sales de boratos y de fosfatos en el intervalo de 5 mmol L<sup>-1</sup>/10 mmol L<sup>-1</sup> - 40/20 mmol L<sup>-1</sup>, SDS a una concentración 20 mmol L<sup>-1</sup>, 1 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD y 10% de metanol

**Palabras clave.** BTEX, electroforesis capilar, cromatografía electrocinética micelar.

### Abstract

Volatile organic compounds (VOCs), such as phenol (Ph), benzene (B), toluene (T), ethylbenzene (E), and p-xylene (X), have a high presence in the environment, which, added to their physical and chemical characteristics, represent a risk to health when they enter the human body. The present work describes preliminary procedures for the development of a methodology for the analysis of PhBTEX using capillary electrophoresis by micellar electrokinetic chromatography (MEKC). In this sense, the electrolyte solution was evaluated by studying the influence of the concentration of the following components: borate and phosphate salts at different proportions, sodium dodecyl sulfate (SDS),  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD), and organic agents (acetonitrile and methanol). The critical variables were optimized by obtaining the best conditions in terms of separation and electrophoretic resolution using a mixture of borate and phosphate salts in the range of 5 mmol L<sup>-1</sup>/10 mmol L<sup>-1</sup> hasta 40/20 mmol L<sup>-1</sup>, SDS at a concentration of 20 mmol L<sup>-1</sup>, 1 mmol L<sup>-1</sup> of  $\beta$ -CD, and 10% methanol.

**Keywords.** BTEX, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography.

## 1. Introducción

En los últimos años, los compuestos orgánicos volátiles (VOC, de sus siglas en inglés) han comenzado a ganar relevancia debido a su elevada presencia en el medio ambiente y en consecuencia al impacto toxicológico que estos originan debido a sus propiedades químicas y físicas [1]. Los VOCs se subclasifican en grupos como sulfuros orgánicos, ésteres, alcoholes, aldehídos, alquenos, éteres, además de compuestos monoaromáticos como el fenol (Ph) y los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), estos últimos han recibido especial atención debido a los riesgos que causan a la salud humana [2]. Según diversos estudios, los BTEX y sus derivados pueden causar anemia, leucemia, irritación de los ojos, nariz y garganta, dificultad para respirar, daño al hígado, riñones y sistema nervioso, aunque, en casos extremos, algunos pacientes han desarrollado alguna forma de cáncer debido a la exposición prolongada [2-4].

En función de ello, surge la necesidad de desarrollar metodologías analíticas capaces de determinar y analizar estos compuestos. Técnicas como la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas (MS) y Raman han sido de las más implementadas para analizar estos compuestos, sin embargo, la instrumentación y el alto uso de solventes incrementan los costos operativos [5,6]. En contraste, electroforesis capilar (CE) es una técnica que cuenta con múltiples ventajas como cortos tiempos de análisis, bajo consumo de muestra y disolventes orgánicos, convirtiéndola en una técnica ambientalmente amigable [7, 8]. Se basa en la migración diferencial causada por la relación masa/carga de los analitos cuando es aplicado un potencial en un capilar, lo que ha permitido el desarrollo de metodologías analíticas eficientes para una gran variedad de analitos.

El desarrollo de un sistema electroforético depende en gran medida de la naturaleza del analito, composición del electrolito soporte, voltaje de separación, así como el posible uso de agentes orgánicos que mejoren la separación analítica [9,10]. Por su parte, para el análisis de compuestos neutros es necesario la incorporación de un agente que pueda proveerles de carga, utilizando regularmente surfactantes como el SDS, que encapsula a los analitos mediante la formación de micelas.

El presente trabajo plantea el desarrollo de un sistema electroforético de compuestos monoaromáticos (PhBTEX) mediante cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC, de sus siglas en inglés). Para ello, la composición de la solución electrolito se evaluó mediante el estudio del efecto de la concentración, pH de la solución electrolito, concentración del surfactante (SDS), así como el uso de los agentes  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), metanol y acetonitrilo como parte del electrolito soporte.

## 2. Experimental

### 2.1. Materiales y reactivos

El tetraborato de sodio, fosfato de sodio, ácido pícrico, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico fue obtenido de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El dodecil sulfato de sodio, metanol, fenol, benceno, tolueno, etilbenceno y p-xileno y la ciclodextrina fue proporcionada por Sigma Aldrich. Se emplearon soluciones estándar de concentración  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de todos los analitos, mismas

que fueron almacenadas a 4°C hasta el día de su análisis. Para preparar las soluciones estándar se utilizó agua desionizada.

## 2.2. Equipos

Los experimentos de CE se llevaron a cabo utilizando un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500, equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD), longitud de onda de 200 nm. La adquisición de datos de electroferogramas y el control del equipo se procesaron utilizando el software P/ACE MDQ versión 2.3. Se utilizó una capilar de sílice fundida (41.7 cm × 75 µm de diámetro interno) para la separación. El agua desionizada fue proporcionada por un sistema Milli-Q con una resistividad no menor a 18.2 Ω.

### *Procedimiento electroforético*

Cada día de trabajo, se activaba el capilar mediante la siguiente secuencia, 15 min de 1.0 mol L<sup>-1</sup> NaOH, 10 min de 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH, 10 min de agua desionizada y 10 min de electrolito soporte. Entre análisis se realiza un proceso de lavado mediante la inyección de 4 min de 1.0 mol L<sup>-1</sup> NaOH, 2 min de 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH, 2 min de agua desionizada y 4 min de electrolito soporte.

## 2.3. Optimización del sistema de separación

El sistema de separación se evaluó mediante la optimización de la composición del electrolito soporte. Para ello se implementó una λ de 200 nm, voltaje de separación de 20 kV, solución estándar que contiene los analitos de interés a una concentración de 5 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.3.1. Evaluación del efecto del pH

El efecto del pH se evaluó en el intervalo de pH de 7.0 hasta 10.5 empleando las sales de boratos y fosfatos con una concentración de 10 mmol L<sup>-1</sup> de la solución electrolito, SDS de 30 mmol L<sup>-1</sup>, variando 0.5 unidades de pH.

### 2.3.2. Evaluación de la proporción de las sales de borato y fosfato

Con la finalidad de mejorar las condiciones de separación y sensibilidad de los analitos, se analizó una solución electrolito constituida por una mezcla de boratos y fosfatos en diferentes proporciones en el intervalo de 10/50 mmol L<sup>-1</sup> hasta 50/100 mmol L<sup>-1</sup>.

### 2.3.3. Evaluación de la concentración del electrolito soporte

La concentración del electrolito soporte, define aspectos como la capacidad de conducción eléctrica, viscosidad del sistema, entre otros. Considerando las proporciones de la mezcla de las sales de boratos y fosfatos, se evaluó el efecto de las concentraciones en el intervalo de 5/10 mmol L<sup>-1</sup> hasta 50/100 mmol L<sup>-1</sup> y 10/5 mmol L<sup>-1</sup> hasta 100/50 mmol L<sup>-1</sup>.

### 2.3.4. Evaluación de la concentración de SDS

En técnicas de separación del tipo MEKC, la concentración del surfactante debe de asegurar la formación de micelas para los analitos y a su vez, evitar un exceso de micelas. Teniendo esto en consideración, se evaluó la concentración de SDS en el intervalo de 5 mmol L<sup>-1</sup> hasta 40 mmol L<sup>-1</sup>.

### 2.3.5. Efecto de la concentración de $\beta$ -CD

En sistemas de separación que cuentan con la presencia de isómeros como el etilbenceno y el p-xileno, los analitos tienen tiempos de migración similares, por lo que es necesario utilizar agentes modificadores para mejorar la separación y lograr tiempos de migración independientes. La  $\beta$ -CD permite la formación de cavidades que se unen a los analitos neutros, ayudando a mejorar la separación de los analitos. Por este motivo, se evaluó la concentración de la  $\beta$ -CD a concentraciones de 0.5 hasta 2.5 mmol L<sup>-1</sup>.

### 2.3.6. Evaluación de la concentración de agentes orgánicos (metanol y acetonitrilo)

El uso de agentes orgánicos en técnicas de separación permite la modificación de la constante dieléctrica del sistema, así como la viscosidad, cambiando a su vez la migración de los analitos y en algunos casos su resolución. En este sentido, de manera independiente, se evaluaron concentraciones de metanol y acetonitrilo a concentraciones de 2.5 hasta 15%.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Evaluación del efecto del pH

En la evaluación de la solución de fosfatos, se pudo apreciar la posible presencia de señales analíticas a tiempos de 4 y 6 minutos a pH de 8.5 y 9. Por otra parte, en la evaluación de la solución de boratos, se observaron hasta dos señales a tiempos de 2.3 y 3.0 min en los pH de 9.5-10.5, mientras que en los demás casos solo se observa una señal. Conforme a los resultados, fue visible un comportamiento similar en todos los casos, con la obtención de máximo dos señales analíticas de las cinco esperadas, no obstante, la resolución analítica de las mismas fue insuficiente.

### 3.2. Evaluación de la proporción de las sales de borato y fosfato

Al evaluar la mezcla de ambas sales a las diferentes proporciones, fue notable la mejora de las señales analíticas en función de la separación y resolución. Estas características se acentúan con las proporciones 2:1 (40/20 mmol L<sup>-1</sup>) y 1:2 (20/40 mmol L<sup>-1</sup>) (borato/fosfato). Por este motivo, se optó por evaluar estas mismas proporciones a diferentes concentraciones.

### 3.3. Evaluación de la concentración del electrolito soporte

Al modificar las concentraciones de la proporción 2:1, fue apreciable la presencia de una hasta cinco señales analíticas, siendo la de concentraciones 40/20 mmol L<sup>-1</sup> la que alcanza este máximo de señales, mientras que para los demás casos se obtienen hasta tres señales. En contraste, para la proporción 1:2, se puede apreciar la existencia de tres a cinco señales analíticas a concentraciones de 20/40 mmol L<sup>-1</sup> y 5/10 mmol L<sup>-1</sup>, siendo en esta última relación de concentraciones en las que son más notorias dichas señales. De esta manera, como es visible en la figura 1, hay tres condiciones prometedoras para la separación electroforética: 40/20 mmol L<sup>-1</sup>, 20/40 mmol L<sup>-1</sup>, 5/10 mmol L<sup>-1</sup>. Sin embargo, para subsecuentes análisis se empleó la proporción de 5/10 mmol L<sup>-1</sup>, debido al número de señales que se obtienen y a los tiempos de análisis del mismo.

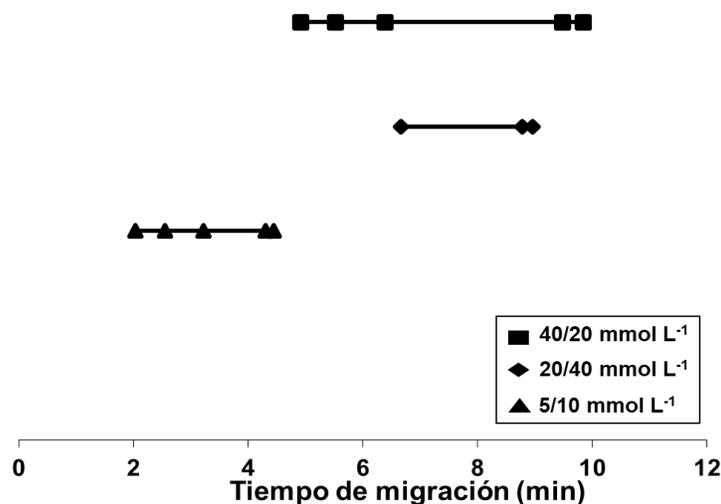


Figura 1. Gráfico correspondiente a la evaluación de la mezcla de borato/fosfato como parte de la solución amortiguadora. Concentración de SDS de 30 mmol L<sup>-1</sup>,  $\lambda=200$  nm y voltaje de 20 kV.

### 3.4. Evaluación de la concentración de SDS

Con base a los resultados obtenidos, la resolución de las señales analíticas aumentó conforme la concentración de SDS aumentaba hasta 30 mmol L<sup>-1</sup>, mientras que, a concentraciones superiores, fue notable un efecto adverso ya que las señales se solapan, por lo que se seleccionó una concentración de 20 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, al no observar diferencias significativas respecto de 30 mmol L<sup>-1</sup>.

### 3.5. Efecto de la concentración de $\beta$ -CD

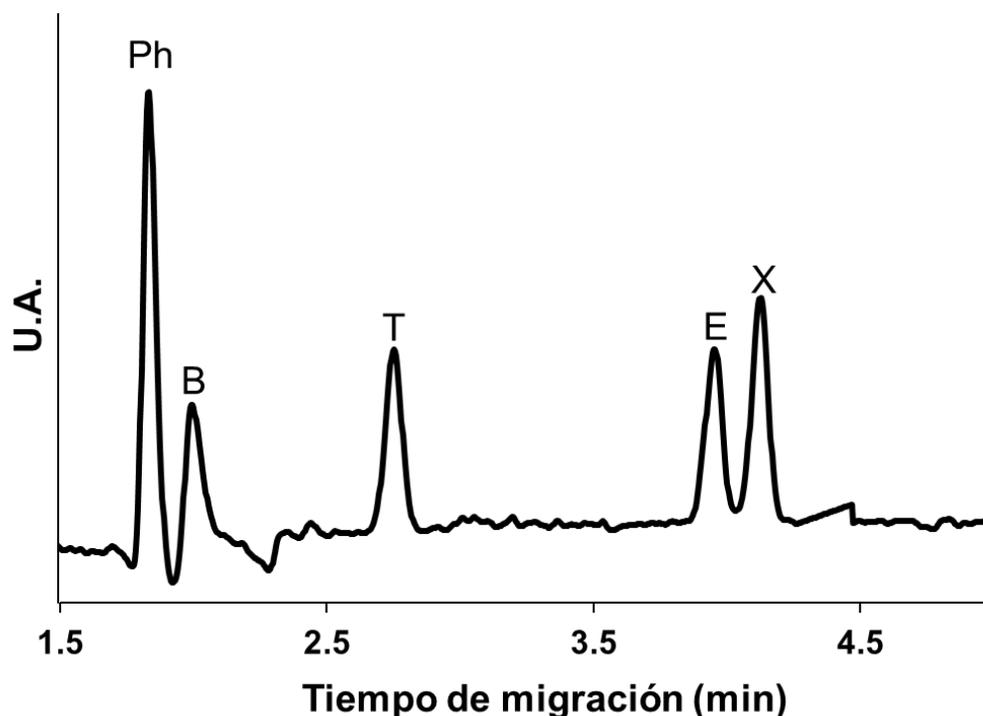
Conforme a los resultados obtenidos, al aumentar la concentración de  $\beta$ -CD de 0.25 hasta 1 mmol L<sup>-1</sup> la separación de los isómeros se ve mejorada, resultando en señales independientes para cada uno de los analitos. Al aumentar la concentración de  $\beta$ -CD, las señales comienzan a solaparse. Por esta razón, se utilizó una concentración de 1 mmol L<sup>-1</sup> para los siguientes análisis.

### 3.6. Evaluación de la concentración de agentes orgánicos (metanol y acetonitrilo)

Al evaluar acetonitrilo, las señales analíticas presentaron deformaciones en los picos, esto ya que en muchas ocasiones el acetonitrilo tiene el efecto de desestabilizar las micelas, descartando así su uso en el electrolito soporte. Por su parte, el metanol a concentraciones bajas permitió una buena separación de los cinco analitos, esto puede deberse a una mayor estabilidad de las micelas en presencia de metanol, en cambio a concentraciones más altas (>10%), es notable la deformación y disminución de las señales analíticas. En este sentido, se seleccionó una concentración de 10% como óptima para subsecuentes análisis.

Por último, se identificaron las señales mediante el análisis de soluciones estándares variando la concentración de cada analito, obteniendo el siguiente orden de separación; fenol (1.8 min), benceno (2.0 min), tolueno (2.7 min), etilbenceno (3.9 min) y p-xileno (4.1 min).

En la figura 2 se muestra un electroferograma obtenido a partir de las mejores condiciones de separación para los PhBTEX.



**Figura 2.** Electroferograma correspondiente a la evaluación de la composición del electrolito soporte, a  $\lambda$  de 200 nm y voltaje de 20 kV. Concentración de SDS,  $\beta$ -CD y metanol a 20 mmol L<sup>-1</sup>, 1 mmol L<sup>-1</sup> y 10 %, respectivamente.

Esta primera etapa de estudio ha dado resultados considerables para conocer el sistema electroforético, aun restan mas parámetros que analizar para poder mejorarla, sin embargo, serán evaluados en futuros trabajos.

#### 4. Conclusiones

Las condiciones para la separación electroforética fueron evaluadas para tener conocimiento de las variables críticas en la técnica de análisis. Las sales de boratos y de fosfatos en el electrolito soporte de manera individual, ofrecen una separación y sensibilidad pobre para los analitos de interés, sin embargo, la mezcla de ambos mejora estos aspectos. También, existe una gran influencia de la concentración y/o proporción de los modificadores SDS,  $\beta$ -CD y metanol que

mejoran la separación. Con esta información, se puede optimizar el sistema y mejorarla en función de la sensibilidad analítica, con la finalidad de poder ser aplicada en muestras reales que requieran analizar los PhBTEX.

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT).

## 6. Referencias

- [1] J.Q. Ni, W.P. Robarge, C. Xiao y A.J. Heber. Volatile organic compounds at swine facilities: A critical review. *Chemosphere*, 89(7), 769-788 (2012).
- [2] K. Rumchev, H. Brown, y J. Spickett. Volatile organic compounds: do they present a risk to our health?. *Reviews on environmental health*. 22(1), 39-56 (2007).
- [3] A. Masih, A.S. Lall, A. Taneja y R. Singhvi. Inhalation exposure and related health risks of BTEX in ambient air at different microenvironments of a terai zone in north India. *Atmospheric environment*. 147, 55-66 (2016).
- [4] M.T. Latif, H.H. Abd Hamid, F. Ahamad, M.F. Khan, M.S.M. Nadzir, M. Othman, y N.M. Tahir. BTEX compositions and its potential health impacts in Malaysia. *Chemosphere*, 237, 1-12 (2019).
- [5] M.J. Cugat, F. Borrull, y M. Calull. An overview of electrophoretic methods for the determination of benzene-and naphthalenesulfonates in water samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 20(9), 487-499 (2001).
- [6] B. Yu, Z. Yuan, Z. Yu y F. Xue-song. BTEX in the environment: An update on sources, fate, distribution, pretreatment, analysis, and removal techniques. *Chemical Engineering Journal*. 435, 13482- 134850 (2022).
- [7] L. Ferey, N. Delaunay, D.N. Rutledge, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil e I. Rivals. An experimental design based strategy to optimize a capillary electrophoresis method for the separation of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*. 820, 195-204 (2014).
- [8] S. Terabe. Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2(1), 99-120 (2009).
- [9] S.A.A. Rizvi, D.P. Do, y A. M. Saleh. Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *European Journal of Chemistry*. 2(2), 276-281 (2011).
- [10] J. Kim, K. Choi y D.S. Chung. Sample preparation for capillary electrophoretic applications. 3, 701-721 (2012).

# Aplicación de la Norma ISO 9001:2015 en el Diseño y Desarrollo de Métodos para la Detección Y Cuantificación de Saxitoxina en Moluscos Bivalvos mediante UPLC-MS/MS

Denise Reyes Garcia, Brenda Guadalupe Martinez Reséndiz, Diana Garcia Aguirre, Luz Sierra Gómez Pedroso, Susana Saval Bohórquez

a Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ingeniería. Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510. Tel: +52 (55) 56233600 ext 8715, e-mail: [DR ReyesG@iingen.unam.mx](mailto:DR ReyesG@iingen.unam.mx); [DGarciaA@iingen.unam.mx](mailto:DGarciaA@iingen.unam.mx); [luzcsierragp@gmail.com](mailto:luzcsierragp@gmail.com), [SSavalB@iingen.unam.mx](mailto:SSavalB@iingen.unam.mx)

## Resumen

El numeral 8.3 de la norma ISO 9001:2015 se utilizó para estructurar el proceso de diseño y desarrollo de métodos en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA), enfocado en la cuantificación de saxitoxina en moluscos bivalvos liofilizados por la técnica de cromatografía de líquidos con detección de masas triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS). Este proceso abarcó la organización, planificación, operación y control, integrándose en el contexto organizacional y diferenciando entre estrategia, táctica y operaciones, con una documentación exhaustiva para garantizar evidencia de los avances. Se definieron insumos, se recopiló información sobre el analito y la muestra, y se formalizaron acuerdos, logrando mejoras en la preparación de muestras, cromatografía y análisis de masas, además de identificar puntos críticos en el tratamiento de muestras y establecer criterios para informes. Como servicio dirigido a investigadores, el proceso incluyó consulta, colaboración, negociación de recursos y un reporte continuo de avances.

**Palabras clave.** *Saxitoxina, Diseño y desarrollo, ISO 9001:2015, Moluscos bivalvos.*

## Abstract

Clause 8.3 of the ISO 9001:2015 standard was used to structure the design and development process of methods in the Environmental Engineering Laboratory (LIA), focused on the quantification of saxitoxin in lyophilized bivalve mollusks using liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry detection (UPLC-MS/MS). This process encompassed organization, planning, operation, and control, integrating into the organizational context and differentiating between strategy, tactics, and operations, with comprehensive documentation to ensure evidence of progress. Inputs were defined, information on the analyte and sample was collected, and agreements were formalized, resulting in improvements in sample preparation, chromatography, and mass analysis, as well as identifying critical points in sample treatment and establishing criteria for reports. As a service aimed at researchers, the process included consultation, collaboration, resource negotiation, and continuous progress reporting.

**Keywords.** *Saxitoxin, Design and Development, ISO 9001:2015, Bivalve Mollusks.*

## 1. Introducción

Es necesario para una organización gestionar todos sus procesos bajo estándares internacionales de calidad que demuestren su competencia técnica y al mismo tiempo respalden que los resultados obtenidos a partir de estos procesos son confiables, válidos y seguros. Los requisitos establecidos por la organización internacional de normalización (ISO) simplifican esta gestión en un sistema estructurado y enfocado a la mejora continua en su norma ISO 9001:2015 [1].

La norma ISO 9001:2015, en su apartado 8.3, establece un marco detallado para asegurar la correcta provisión de productos y servicios a través de un proceso de diseño y desarrollo. Este apartado de la norma se subdivide en seis numerales que guían la implementación de un sistema de gestión de calidad eficiente. Dentro de este contexto, el objetivo principal del presente estudio es ilustrar el modo de utilizar la documentación y los requisitos de la norma ISO 9001:2015 para diseñar y desarrollar un método analítico en la investigación, específicamente para la cuantificación de saxitoxina (STX) en muestras liofilizadas de moluscos bivalvos utilizando la técnica UPLC-MS/MS. La hipótesis planteada es que, a partir de la información recolectada, los recursos disponibles y las pruebas experimentales realizadas, se podrán proponer mejoras significativas al planteamiento inicial del método, optimizando tanto la detección de STX como el tratamiento de las muestras.

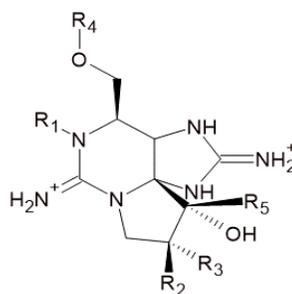
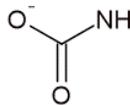
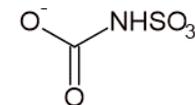
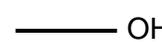
La STX presente en moluscos bivalvos, como el ostión, la almeja y el mejillón, es de gran relevancia sanitaria. Esta toxina, pertenece al grupo de las Toxinas Paralizantes de Mariscos (TPs), producidas principalmente por dinoflagelados marinos. Las TPs pueden bioacumularse en los tejidos de los moluscos debido a su alimentación por filtración y transferirse a lo largo de la cadena alimentaria, afectando tanto a los seres humanos como a otros depredadores. Este proceso no solo representa un riesgo significativo para la salud pública, al causar enfermedades como el envenenamiento paralizante por mariscos (PSP), sino que también puede alterar la estructura y estabilidad de los ecosistemas marinos, impactando negativamente la biodiversidad y las relaciones tróficas.

Las TP tienen un límite máximo de concentración permisible (LMP) en México de 80  $\mu\text{g}$  de STX equivalentes (eq) por gramo en tejido fresco de molusco ( $80 \mu\text{gSTXeq g}^{-1}$ ). [2]

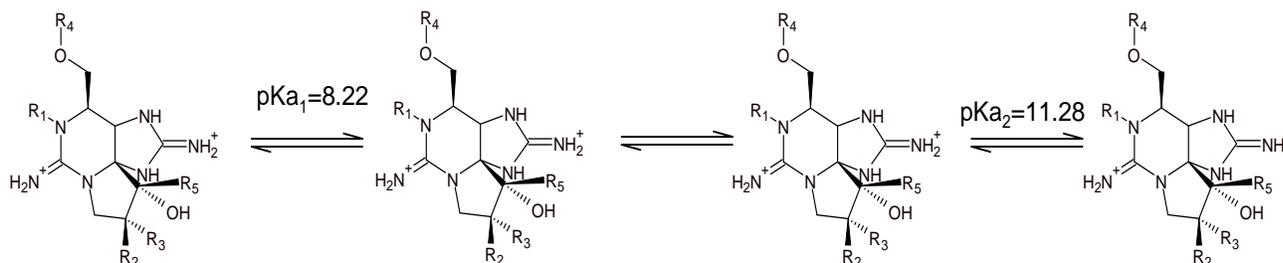
La STX es una molécula polar, soluble en agua y termoestable, que mantiene su estabilidad en soluciones biológicas y fisiológicas, salvo cuando se exponen de forma prolongada a condiciones alcalinas. La detección de STX presenta desafíos analíticos significativos, principalmente debido a la biotransformación de sus más de 50 análogos. En la Tabla 1 se muestran los más usados para detección en el laboratorio. Esta biotransformación puede dar lugar a la formación de nuevas toxinas que no son sintetizadas por cianobacterias o dinoflagelados, o a la generación de análogos menos tóxicos con diferentes estados de carga, influenciados por la presencia de grupos funcionales como carbamoil, N-sulfocarbamoil, hidroxilo y sulfato, los cuales pueden verse alterados por el pH [3]. Otro desafío importante es la evaluación específica de las especies en los equilibrios ácido-base característicos de estas moléculas (Figura 1). Además, en la detección mediante espectrometría de masas, varios análogos de STX presentan transiciones másicas idénticas, complicando su diferenciación y cuantificación. Finalmente, los problemas de almacenamiento también son destacables, ya que la inestabilidad de algunas variantes, como la

destrucción o transformación de las Gonyautoxinas (GTX) [4] en medios fuertemente ácidos, y la disminución de la concentración de STX durante el almacenamiento, representan retos adicionales. [5], [6]

**Tabla 1** Algunos análogos de STX, usados en las detecciones de laboratorio.

RADICALES				Carbamato	N-Sulfocarbamoilo	Decarbamoilo
				$\text{R}_4$ : 		
H	H	H	OH	Saxitoxina	GTX5 (B1)	dcSaxitoxina
OH	H	H	OH	Neosaxitoxina	GTX6 (B2)	dcNeosaxitoxina
H	H	$\text{OSO}_3^-$	OH	GTX2	C1	dcGTX2
H	$\text{OSO}_3^-$	H	OH	GTX3	C2	dcGTX3
OH	H	$\text{OSO}_3^-$	OH	GTX1	C3	dcGTX1

Tomado de Wiese, M., D'Agostino, P., Mihali, T., Moffit, M., & Neilan, B. (2010). Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs*, 8: 20 185-211.) [7]



**Figura 1.** Equilibrio ácido base de la molécula de STX y sus análogos carbamato. R1:H, R2:H, R3:H, R4:OH, R5:carbamato

El método analítico para detectar y regular las toxinas paralizantes (TPs) aceptado mundialmente durante más de cuatro décadas ha sido el bioensayo en ratón (MBA). Este método mide el tiempo

de muerte tras una inyección intraperitoneal de extracto de molusco. Sin embargo, ha recibido críticas éticas y una evaluación reciente ha demostrado que puede subestimar significativamente la concentración real de toxinas TP en los mariscos debido a altos contenidos de sales y metales como zinc, manganeso y cadmio, que interfieren severamente con las determinaciones del bioensayo, suprimiendo la toxicidad de las TPs. Por estas razones y por la preocupación en algunos países sobre el uso de ensayos con animales, es deseable desarrollar un método alternativo basado en análisis químicos, estudiado de manera colaborativa. [8]

El método analítico de cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia (CL-FDL) fue aceptado en la regulación de Estados Unidos de América (EU) en el año 2019 la detección química que utiliza oxidación pre-columna LC-Detección fluorescencia (FLD). Estos métodos han demostrado proporcionar un excelente nivel de protección. Sin embargo, las complejidades, incluyendo la necesidad de múltiples pasos de limpieza y análisis, han ralentizado históricamente el alejamiento de la dependencia del MBA. Por lo tanto, todavía se buscan métodos alternativos que permitan un análisis rápido, preciso y sensible de las toxinas paralizantes de los mariscos (TPs) en los moluscos bivalvos, tanto para la investigación como, en última instancia, para fines de monitoreo rutinario. [9]

Los métodos de cuantificación por cromatografía de líquidos triple cuadrupolo (UPLC-MSMS), que utilizan la extracción en fase sólida (SPE) como tratamiento de muestra, han demostrado ser más eficientes en términos de tiempo y carga de trabajo, especialmente cuando se requiere un método para el monitoreo rutinario de mariscos. Sin embargo, la sensibilidad inadecuada de algunos instrumentos, la supresión iónica observada y otros efectos de la matriz causados por extractos concentrados de mariscos han disuadido a las autoridades regulatorias de validar e implementar metodologías de espectrometría de masas en el monitoreo oficial de toxinas en mariscos. [10]

## 2. Experimental

Se recopilaron todos los experimentos realizados en un formato estructurado para el diseño y desarrollo, el cual incluye las siguientes secciones: **solicitud de requisitos y acuerdos, entrega-recepción de insumos, reactivos y materiales de referencia**, una **bitácora** para el registro diario del proceso, una sección dedicada a la **evaluación o validación del método**, y finalmente, una sección destinada a las **conclusiones** y al registro de los nombres de los programas generados en el equipo UPLC-MS/MS.

En la sección de **controles**, se documentó que no se dispuso de una muestra blanco libre de saxitoxina, procesada y almacenada bajo las mismas condiciones de liofilización y congelación aplicadas a las muestras previamente mencionadas.

En cuanto a las **referencias metodológicas**, se observó que, aunque existen publicaciones que describen procedimientos similares, estas no pueden ser implementadas en su totalidad debido a diferencias significativas. Entre ellas, destaca la falta de un mix de análogos que permita calcular el factor de toxicidad equivalente (TEFs) según lo descrito por la *European Food Safety Authority* (EFSA, [17]).

Entre los **materiales de referencia** disponibles, se utilizó el dihidrocloruro de saxitoxina certificado por la FDA/NIST 8642<sup>a</sup> ID160727. Se preparó una solución estándar a partir de una

ampolleta de 1000  $\mu\text{L}$  del material de referencia, ajustando un volumen final de 100 mL con agua acidulada con ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 3, obteniendo una concentración final de 1  $\mu\text{g/g}$ . El tiempo de vida útil de la solución estándar es de un mes, lo cual se consideró al planificar los experimentos. A partir de esta solución estándar, se preparó una dilución a una concentración de 242 nmol/L, la cual se infundió directamente al espectrómetro de masas a un flujo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  bajo las siguientes condiciones iniciales: voltaje de capilar de 3 kV, voltaje de cono de 40 V, y energía de colisión de 30 V en modo de ionización ESI+. Posteriormente, se determinaron las transiciones correspondientes al ion molecular de 300 m/z.

Posteriormente se realizaron las pruebas de cromatografía con las columnas: ZORBAX Eclipse Plus C18 de dimensiones 2.1 x 100 mm y una partícula de 1.8  $\mu\text{m}$ , HALO HILIC 2.1 x 75 mm, 2  $\mu\text{m}$  de la marca WATERS, y Ultisil UHPLC Polar-RP 2.1 x 150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  de la marca Welch. Las pruebas de la columna se realizaron con la fase móvil A que consistió en una solución de ácido fórmico al 0.01 % en agua y fase móvil B, que consistió en una solución de ácido fórmico 0.01 % en acetonitrilo. Las pruebas se realizaron cambiando las proporciones de las fases móviles en flujo isocrático constante. Para evitar cualquier contaminación entre inyecciones se estableció un tiempo de lavado de 0.5 minutos. Además se realizaron pruebas de temperatura de la columna entre 30  $^{\circ}\text{C}$  y 60  $^{\circ}\text{C}$ , mientras que la muestra se conservaba a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, el método de separación elegido utiliza la columna Ultisil UHPLC Polar-RP 2.1 x 150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$  a una temperatura de 50  $^{\circ}\text{C}$ . La fase móvil acuosa (A) consistió en una solución de H<sub>2</sub>O:ácido fórmico:hidróxido de amonio 1000:0.150:0.6, mientras que la fase orgánica (B) consistió en una solución de acetonitrilo:ácido fórmico 1000:1. El tiempo de corrida fue de 5 minutos, con un flujo de 0.3 mL/min, el gradiente descrito en la Tabla 2 y un tiempo de lavado de 1 minuto.

**Tabla 2. Condiciones cromatográficas.**

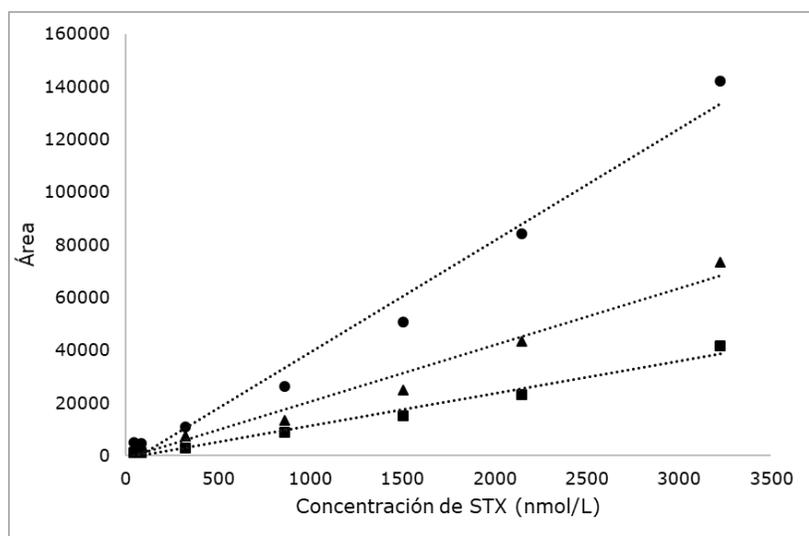
Tiempo (min)	% A	% B	Curva	
1	Inicio	50	50	6
2	0.50	50	50	6
3	1.00	20	80	6
4	3.50	20	80	6
5	7.00	50	50	6

Se realizó el análisis de una curva de calibración (Figura 3) preparada en extracto de muestra obteniendo una buena linealidad de las tres transiciones encontradas (Tabla 3). Esta curva se preparó entre 0.0130  $\mu\text{g STX}/\text{mL}$  y 0.9767  $\mu\text{g STX}/\text{mL}$ . La generación de esta curva inicial tuvo como objetivo determinar el intervalo lineal del método de análisis.

**Tabla 3** Ecuaciones de la recta y coeficientes de determinación para cada transición de la curva de STX por adiciones de estándar en el intervalo de medición de 400 a 800  $\mu\text{g STX}/\text{kg}$ .

Transición (ion padre-ion hijo)	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
------------------------------------	----------------------	--

300.094 > 282	$40916x + 997.114$	0.9951
300.094 > 204	$3755.3x + 291.14$	0.9954
300.094 > 179	$17733x - 65.701$	0.9995



Curva de calibración de estándar. Transiciones: ● 300.094 > 83.55,  
▲ 300.094 > 108.51 y ■ 300.94 > 204.00

**Figura 3.** Curva de calibración de estándar de STX. Transiciones: ● 300.094 > 83.55,  
▲ 300.094 > 108.51 y ■ 300.94 > 204.00

Las muestras analizadas consistieron en cuatro bolsas con 10 g de moluscos liofilizados, proporcionadas por el investigador (cliente). Estas muestras fueron analizadas previamente en Jena, Alemania, en 2003, empleando el método de Oshima (1995), modificado por Hummer et al. (1997) y Yu et al. (1998). Posteriormente, fueron almacenadas durante 20 años a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cabe destacar que el LIA no estuvo involucrado en la obtención ni el procesamiento de las muestras antes de su liofilización, y el proceso específico de liofilización realizado es desconocido. Para el análisis actual, el tratamiento de las muestras se realizó con base en el protocolo descrito por Boundy et al. (2015), adaptado específicamente para el manejo de muestras liofilizadas.

Se pesó 1 g de muestra liofilizada en un tubo para centrífuga de 50 mL previamente limpiado con isopropanol al 60 % en agua para disminuir la estática. Para hidratar la muestra, se añadieron 4 mL de ácido acético al 1 % en agua y se agitaron en vórtex durante 90 s. Se agregaron 3 mL más de ácido acético al 1 % en agua, se agitó durante 90 s y se colocó en un baño de agua hirviendo por cinco minutos. Posteriormente se enfrió en un baño de hielo durante 5 minutos y después se agitó por 90 s más. Durante el calentamiento y enfriamiento el tubo era destapado

constantemente para la liberación de gases. Una vez pasados los 5 minutos en el baño de hielo, el tubo se centrifugó en una centrífuga HERMLE Z 513 K a 4500 rpm y 4 °C durante 10 minutos y finalmente el sobrenadante se decantó en un matraz volumétrico de 10 mL. Con el contenido restante en el tubo se repitió el procedimiento desde la adición de 3 mL de ácido acético al 1 % en agua. Luego de reunir los sobrenadantes se llevaron a 10.0 mL con agua tipo I (extracto).

En el primer paso de la extracción en fase sólida, se llevó a cabo una prueba para determinar cuál de los dos cartuchos SPE era más adecuado. Se probaron los cartuchos Bond Elut Plexa y Supelclean ENVI-Carb, con 75  $\mu$ L de la solución estándar siguiendo las indicaciones de uso recomendadas por el fabricante. Las tres fases (paso de muestra, lavado y elución) se recolectaron y transfirieron a viales para cromatografía de 2 mL con las tapas con septas precortadas para su posterior análisis en el equipo de cromatografía.

Se preparó una curva de ocho niveles de concentración (0 a 0.9767  $\mu$ g STX/mL ) a partir de de un surrogado (o muestra cargada) adicionando el volumen necesario (0 a 750  $\mu$ L) a cada uno del estándar de 100  $\mu$ g STX/L. En el segundo paso, se siguieron los pasos indicados por Boundy y colaboradores (2015) con los mismos cartuchos (Bond Elut Plexa y Supelclean ENVI-Carb) se realizaron dos adiciones de ácido acético diluido y se calentó a ebullición durante una hora, se centrifugó. La extracción se realizó utilizando un colector para extracción en fase sólida. Para esta prueba, se tomó 1 mL de extracto para cada cartucho y se transfirió a un tubo safe lock (Eppendorf) de 1.5 mL. Luego, se añadieron 5  $\mu$ L de hidróxido de amonio al 25% al extracto preparado y se agitó. [11].

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Planificación del diseño y desarrollo del proceso

La ausencia de un control negativo, la imposibilidad de realizar un reanálisis de las muestras utilizando el método empleado hace 20 años y la falta de insumos necesarios para implementar un método como el descrito por Turner (2020), dificultaron tanto la comparabilidad de los resultados obtenidos como el avance esperado en el proyecto. Esta situación se agravó debido a que las expectativas iniciales eran muy altas, mientras que los recursos disponibles resultaron ser significativamente limitados.

Se resalta la importancia de llevar un registro detallado de todos los acuerdos, la comunicación realizada, los insumos, los controles y los materiales de referencia disponibles. Este registro es fundamental para garantizar la correcta interpretación de los resultados, la formulación de conclusiones adecuadas y el cierre adecuado del proceso de diseño y desarrollo.

La decisión de retomar los experimentos con nuevos acuerdos, insumos y modificaciones al procedimiento queda en manos de la cliente-investigadora, quien tiene pleno acceso a los resultados obtenidos y al progreso alcanzado hasta el momento.

Durante la entrevista con la investigadora solicitante, se identificaron sus necesidades y contexto específico y se colectaron en el expediente del diseño y desarrollo del método, en un formato hecho para este propósito. Su trabajo actual se centra en el análisis de toxinas en moluscos

bivalvos, utilizando técnicas de inmunoensayo en ratón y cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia (CL-FLD). Sin embargo, busca ampliar su investigación hacia el análisis de STX mediante UPLC-MSMS y es por esta razón por lo que no se realizó un tratamiento de muestra para estabilizar el analito con una derivatización. Sus expectativas incluyen desarrollar un método robusto para la detección de STX y colaborar en la interpretación de los resultados, con el objetivo de implementar un sistema autosustentable en la UNAM. Se estableció un plazo de dos años para entregar resultados que permitan evaluar el desempeño del método, y determinar si puede ser implementado como rutina o requiere mejoras adicionales

El objetivo principal para este periodo considero el tipo de muestras, la necesidad de adquisición de conocimiento del LIA y que a pesar de que los métodos reportados requieren es establecer las bases necesarias para el diseño y desarrollo de un método analítico bajo la norma ISO 9001:2015, adecuado para la cuantificación de STX en muestras liofilizadas de moluscos bivalvos. La hipótesis plantea que, a partir de la información y pruebas realizadas, se mejorará el planteamiento inicial del método para optimizar la detección y tratamiento de muestras utilizando UPLC-MSMS.

Durante el desarrollo, se abordaron varios aspectos clave: 1) Identificación de las necesidades legales de cuantificación, compra y almacenamiento de la toxina y disposición de residuos 2) Preparación y almacenamiento del material de referencia certificado, 3) Optimización de las transiciones y establecimiento de los métodos Tune y MRM, 4) Pruebas cromatográficas para definir la columna, fases móviles y condiciones óptimas, 5) Evaluación de diferentes tipos de cartuchos en la extracción en fase sólida, y 6) Análisis de los análogos de STX reportados en la bibliografía bajo las mejores condiciones encontradas.

Durante la revisión del proceso, se determinó la factibilidad del análisis de STX mediante UPLC-MSMS, dado su peso molecular ( $>100$  g/mol), su polaridad y capacidad de ionización. Sin embargo, surgieron desafíos relacionados con la biotransformación de la STX y sus más de 50 análogos, lo que exige un control riguroso del pH y la temperatura durante el tratamiento de muestras y análisis

Como resultado, se determinaron los siguientes objetivos analíticos: 1) Confirmar la viabilidad de una cuantificación con correlación lineal entre los límites de alerta ( $400 \mu\text{g eqSTX/kg}$ ) y los límites máximos permisibles ( $800 \mu\text{g eqSTX/kg}$ ), 2) Obtener curvas de calibración con correlación lineal entre la respuesta y la concentración del analito, 3) Establecer las necesidades de equipos, insumos y condiciones ambientales, y 4) Evaluar los riesgos con un enfoque basado en ISO 9001:2015. Se identificaron consecuencias potenciales ante el incumplimiento, incluyendo la imposibilidad de ofrecer el servicio de cuantificación de STX o la necesidad de replantear el proceso de diseño y desarrollo.

Se encontró que no hay comparabilidad entre la cuantificación de STX que se busca en el método de UPLC-MSMS y el reportado por el método de bioensayo en ratón. Puesto que el primero se busca reportar en unidades del Sistema Internacional de unidades y el método de bio ensayo en ratón habla de una toxicidad total del extracto de molusco, en donde no se consideran biotransformaciones, lo cual resalta la necesidad de la solicitud de obtención de un blanco de matriz y una muestra de concentración conocida, pero a través de un método de cuantificación en unidades del Sistema internacional.

El informe de resultados del análisis de STX en muestras de moluscos bivalvos cumplirá con los requisitos del Sistema de Gestión de la Calidad y además debe cumplir con los siguientes requisitos: incluir una nota que especifique los límites legales para las muestras, conforme a lo establecido en la norma NOM-242-SSA1-2009. Además, deberá reportarse la incertidumbre del método utilizado. Las unidades de medida estarán basadas en el Sistema Internacional (SI) y se proporcionará al cliente una tabla de equivalencias para facilitar la interpretación de los resultados en función del bioensayo en ratón (MBA). En cuanto a los riesgos, aquellos relacionados con la clasificación de resultados analíticos adversos serán transferidos al cliente mediante una declaración en el informe.

Se considera como una posibilidad de interés para el cliente hacer una determinación complementaria de metales presentes como zinc, manganeso y cadmio para realizar un seguimiento de su interferencia en la toxicidad del extracto de molusco en el método de Bioensayo en ratón.

### 3.2. Desarrollo del método Analítico

Las condiciones finales para la espectrometría de masas fueron el capilar 3.00 kV, cono 45.0 V, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo de gas en la fuente para la desolvatación 500 L/hora, y energía de colisión 20 V. El analizador LM1 11.20, HM1 9.80, energía ion 1 -0.20, resolución LM2 9.79, HM2 10.0, energía ion 2 -0.20, temperatura de la fuente 150 °C. Las transiciones encontradas se reportan en la Tabla 2.

Se obtuvieron las condiciones de cromatografía y se confirmó la linealidad en el intervalo de medición de 400 µg STX/kg a 800 µg STX/kg (Tabla 2), El método de separación cromatográfica elegido utiliza la columna Ultisil UHPLC Polar-RP 2.1 x 150 mm, 1.8 µm a una temperatura de 50 °C. La fase móvil acuosa A consistió en una solución de H<sub>2</sub>O:ácido fórmico:hidróxido de amonio 1000:0.150:0.6, mientras que la fase orgánica B consistió en una solución de acetonitrilo:ácido fórmico 1000:1. El tiempo de corrida fue de 7 minutos, con un flujo de 0.3 mL/min, el gradiente descrito en la Tabla 3 y un tiempo de lavado de 1 minuto. Sin embargo, es importante mencionar la pérdida de la linealidad obtenida en solución ácida cuando las curvas son preparadas en extracto de molusco liofilizado.

El mejor cartucho de SPE entre las 3 opciones probadas para la extracción de STX del extracto de molusco adicionado fue Supelclean ENVI-Carb. El método establecido para SPE es el siguiente: acondicionamiento con 3 mL de la solución de elución y 3 mL de hidróxido de amonio 0.1 % en agua. Posteriormente, añadir 400 µL del extracto previamente preparado, lavado con 700 µL de agua tipo I y elución con 2 mL de la solución de extracción

Como productos adicionales del proceso, Se generaron el métodos de lavado y los acuerdos para el manejo de residuos y el almacenamiento de estándar y reactivos.

Gracias a la versatilidad del equipo UPLC-MS/MS se exploró la posibilidad de transformaciones entre STX y algunos de sus análogos (neoSTX, dcSTX, dcneoSTX, M1 y M5), lo que podría afectar la cuantificación debido a cambios en el pH y la masa de las moléculas. Tomando en cuenta, además, la complejidad para el análisis las transiciones de los análogos que comparten iones precursores e iones producto entre sí, dificultando la identificación y cuantificación precisa.

Fue posible la inclusión de estos análogos en el análisis bajo las condiciones de espectrometría de masas y cromatografía propuestas para STX

#### 4. Conclusiones

La implementación del numeral 8.3 de la norma ISO 9001:2015 permitió estructurar de manera efectiva el proceso de diseño y desarrollo de un método analítico para la cuantificación de STX en muestras de moluscos bivalvos liofilizados utilizando UPLC-MS/MS. Se lograron avances significativos en la identificación de las necesidades del cliente, la preparación de material de referencia certificado y la optimización de condiciones tanto cromatográficas como de espectrometría de masas. El proceso estableció criterios claros para la cuantificación de STX, logrando linealidad en el intervalo de medición de 400 a 800 µg STX/kg, y demostró la viabilidad de emplear este método analítico en futuras rutinas de laboratorio, sujeto a posibles mejoras adicionales.

Durante el desarrollo del método, se identificaron y abordaron desafíos importantes relacionados con la biotransformación de STX y sus análogos, que requieren un control riguroso del pH y la temperatura para garantizar resultados precisos. También se confirmó que el cartucho de SPE Supelclean ENVI-Carb fue el más eficiente para la extracción de STX, mejorando el rendimiento en las muestras analizadas. A pesar de estos avances, se observó una pérdida de linealidad cuando las curvas fueron preparadas en extractos de molusco, lo que resalta la necesidad de ajustar el método para mejorar la precisión en muestras reales.

El análisis también evidenció la falta de comparabilidad entre los métodos de cuantificación de STX mediante UPLC-MS/MS y el bioensayo en ratón (MBA). Esta discrepancia refuerza la importancia de reportar los resultados en unidades del Sistema Internacional (SI), lo que facilita una interpretación más precisa y científicamente válida. Además, se sugiere considerar la determinación complementaria de metales como zinc, manganeso y cadmio, que podrían interferir en la toxicidad del extracto de molusco en el MBA, ampliando así el alcance del análisis.

Finalmente, el enfoque de trabajo colaborativo y continuo con la investigadora permitió ajustar las expectativas y los plazos, fijando un horizonte de dos años para evaluar el desempeño del método y su posible implementación como rutina. Las bases establecidas, junto con la documentación exhaustiva y el control de riesgos, aseguran que el método desarrollado cumple con los estándares de calidad exigidos por la norma ISO 9001:2015, proporcionando un servicio confiable y científicamente sólido a la comunidad investigadora.

#### 5. Referencias

- [1] Comité Técnico ISO/TC 176, Gestión y aseguramiento de la calidad, Sistemas de Gestión de la Calidad - Requisitos, vol. ISO 9001:2015 (Traducción oficial).S. C. d. I. e. Ginebra, Ed.
- [2] «NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.,» 23 agosto 2024. [En línea]. Available: <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4295/salud2a/salud2a.htm>.
- [3] C. Dell'Aversano , J. A. Walter, I. W. Burton y D. J. Stirling, «Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels,» *Journal of Natural Products*, vol. 71, n° 9, 2008.
- [4] C. Dell ´Aversano, P. Hess y M. A. Quilliam, «Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins,» *Journal of Chromatography A*, vol. 1081, n° 2, pp. 190-201, 2005.
- [5] G. R., «Food safety and solid phase extraction - an essential guide for switching from a manual to an automated protocol,» 2023.
- [6] A. D. Turner, M. Dhanji-Rapkova, S. Y. Fong, J. Hungerford, P. S. McNabb, M. J. Boundy y D. T. Hardwood, «Ultrahigh-Performance Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in Mussels, Oysters, Clams, Cockles, and Scallops: Collaborative Study,» *Journal of AOAC International Vol. 103, N° 2*, pp. 533-562, 2020.
- [7] M. Wiese, P. D ´Angostino, T. Mihali, M. Moffit y B. Neilan, «Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and its analogs,» *Marine Drugs*, vol. 8, n° 20, pp. 185-211, 2010.
- [8] P. Gopalakrishnakone, J. V. Haddad y A. Tubaro, Saxitoxin and Other Paralytic Toxins: Toxicological Profile, [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6419-4\\_25](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6419-4_25): Marine and Freshwater Toxins. Toxinology. Springer, 2016.
- [9] J. F. Lawrence , B. Niedzwiadek y C. Menard , «Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study.,» *JAOAC*, vol. 88(6), n° PMID: 16526455, pp. 1714-32, 2005.
- [10] E. Turrell, L. Stobo, J.-P. Lacaze, S. Piletsky y E. Piletska, «Optimization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Development of Solid-Phase Extraction for the Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins,» *Journal of AOAC International*, vol. 91, n° 6, pp. 1372-1386, 2008.
- [11] M. Boundy, A. Selwood, D. Harwood, P. McNabb y A. Tuner, «Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction,» *Journal of Chromatography A*, n° 1387, pp. 1-12, 2015.

- [12] B. Ben-Gigirey , M. Rodríguez-Velasco, A. Otero, J. Vieites y A. Cabado, «A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish,» *Toxicon*, vol. 60, nº 5, pp. 864-873, 2012.
- [13] S. Gawankar y R. H. Lahr, *Detection of Saxitoxins from Source and Drinking water using Solid-Phase Extraction and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HILIC-MS)*, Michigan State University, 2020.
- [14] A. R. Humpage, V. F. Magalhães y S. M. Froscio, «Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC)*, nº 397, pp. 1655-1671, 2010.
- [15] B. G. Martínez Reséndiz, Desarrollo de un método analítico para la determinación de saxitoxina en moluscos bivalvos liofilizados por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS), vol. Tesis de Licenciatura, F. d. Química, Ed., CDMX: UNAM, 2024.
- [16] Y. Oshima, «Postcolumn derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins.,» *J. Assoc. Off. Anal. Chem. International*, vol. 78, pp. 795-799, 1995.
- [17] European Food Safety Authority (2009) EFSA J. 1019, 1–76. doi:10.2903/j.efsa.2009.1019

## Adsorción de cobre mediante el uso de masilla modificada químicamente

Oliver Robinson Pacheco <sup>a</sup>, Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo <sup>a</sup>, Javier Emmanuel Castillo Quiñones <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Baja California, FCQI, Universidad 14418, UABC, Parque Internacional Industrial Tijuana, 22390 Tijuana, B.C. Tel. 6649797500 email. [oliver.robinson@uabc.edu.mx](mailto:oliver.robinson@uabc.edu.mx), [gaby@uabc.edu.mx](mailto:gaby@uabc.edu.mx), [castillo@uabc.edu.mx](mailto:castillo@uabc.edu.mx)

### Resumen

La masilla, conocida como Brewer Spent Grain (BSG), es el principal subproducto de la producción de cerveza. Contiene entre 14% y 30% de proteína, 50% a 70% de fibra, y otros componentes menores. Estos materiales poseen una composición química con potencial para la adsorción de iones de metales pesados. Utilizar los desechos de la producción de cerveza para generar adsorbentes de celulosa no solo contribuye al reciclaje de residuos, sino que también reduce la carga ambiental, mejorando así la bioeconomía circular. El objetivo de este trabajo es modificar químicamente a la masilla de la cervecería Heineken (Tecate, Baja California), y realizar una isoterma de adsorción como estrategia para estudiar la remoción de cobre presente en un medio acuoso. La concentración de cobre se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico. Los resultados indican que la partícula de masilla modificada con HCl adquiere propiedades adsorbentes favorables hacia iones metálicos de cobre, la capacidad máxima de adsorción para cobre es de 1.1513 mg de Cu por gramo de masilla modificada químicamente.

**Palabras clave.** *Masilla, Adsorción de Iones Metálicos, Isoterma de Adsorción, Langmuir, Freundlich.*

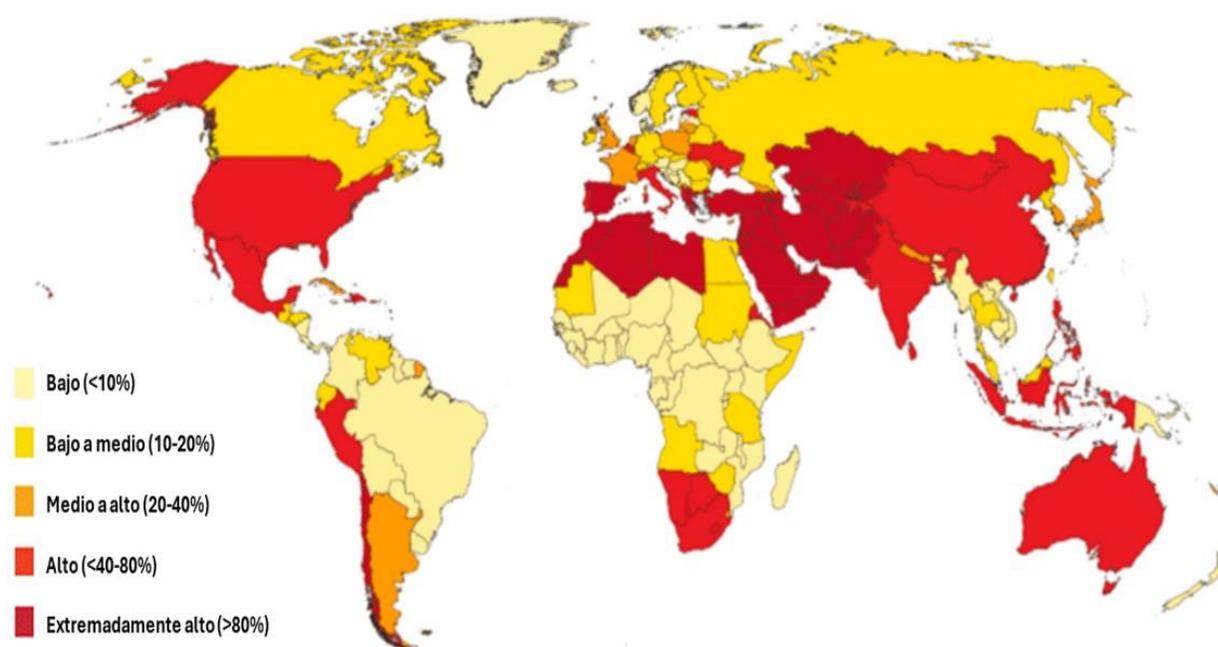
### Abstract

The mash, also referred to as Brewer Spent Grain (BSG), is the main byproduct of beer production. It contains between 14% and 30% protein, 50% to 70% fiber, and other minor components. These materials have a chemical composition with a potential for the adsorption of heavy metal ions. Using the production waste of beer industry to generate cellulose adsorbents not only contributes to waste recycling, but also reduces the environmental burden, with the possibility to improve the circular economy. The goal of this study was to chemically modify the BSG from the Heineken brewery (Tecate, Baja California), and perform an adsorption isotherm as an approach to investigate the removal of copper ions present in an aqueous solution. The copper concentration was determined by a spectrophotometric assay. The results indicate that the HCl-modified BSG particle acquires favorable adsorption properties towards copper metal ions, the maximum adsorption capacity for copper is 1.1513 mg Cu per gram of chemically modified putty.

**Keywords.** *Brewer's spent grain, Adsorption of Metal Ions, Adsorption Isotherm, Langmuir, Freundlich.*

## 1. Introducción

El agua dulce es esencial para la salud pública, para uso industrial, doméstico, para beber, para preparar alimentos o con fines recreativos [1]. La mejora del suministro de agua y el saneamiento, y una mejor gestión de los recursos hídricos, pueden impulsar el crecimiento económico de los países [2]. Por lo tanto, el tratamiento de agua con contaminantes es un tema de importancia para los científicos y especialistas en el campo de la remediación de aguas [3]. Según las estadísticas del Instituto de Recursos Mundiales (WRI) [4], aproximadamente la mitad de la población global sufrirá de estrés hídrico de medio a alto o muy alto en el año 2040, ver Figura 1 [5].



**Figura 1.** Estrés hídrico en 2040 [5].

Los desechos y subproductos agrícolas e industriales consisten en materiales con celulosa, hemicelulosa y lignina como componentes estructurales principales. Se ha demostrado que este tipo de materiales son respetuosos con el medio ambiente ya que exhiben una capacidad alta de biosorción. Las principales ventajas de emplear estos materiales como adsorbentes para el tratamiento de agua residual incluyen: regeneración y reciclaje de biosorbentes, generación mínima de lodos, alta eficiencia, y bajo costo, entre otros [6].

La masilla es el subproducto principal de los procesos de maceración y filtración en la producción de cerveza a nivel industrial [7]. Actualmente, México ocupa el 6° lugar en producción de cerveza

a escala mundial y el principal exportador con presencia en más de 180 países [8]. En la Figura 2 se muestra el proceso de generación de la masilla.

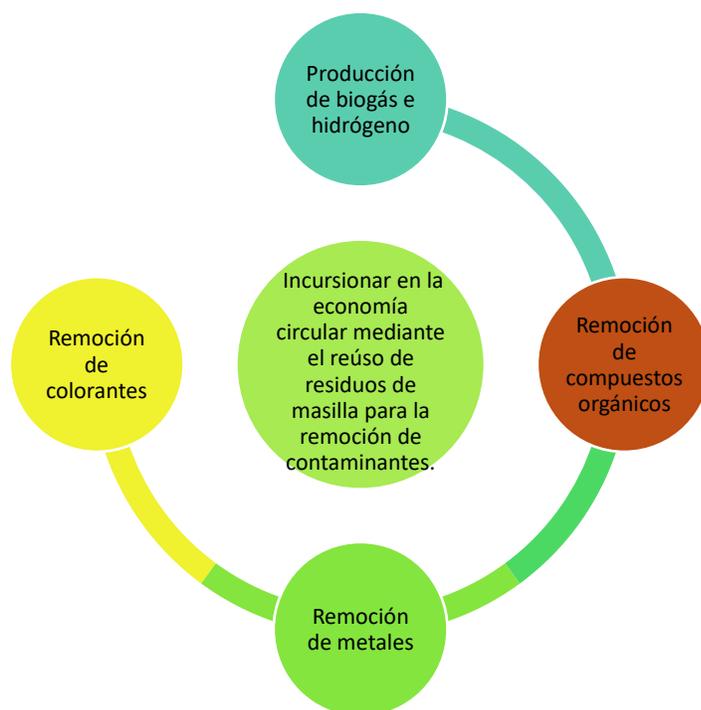


**Figura 2.** Proceso de producción de masilla. En la elaboración de cerveza tradicional que usa un lauter, la masilla juega un papel importante ya que forma el lecho a través del cual se filtra el mosto [9].

La masilla generalmente contiene de 14 a 30 % de proteína, de 50 a 70 % de fibra (sobre una base seca) y otros componentes menores, incluidos lípidos, minerales y compuestos fenólicos. Debido a su alto contenido de fibra, la masilla se usa principalmente como alimento para ganado de bajo valor o simplemente se desecha en vertederos, lo que genera una pérdida sustancial de recursos. Además, el alto contenido de humedad de la masilla (77–81 %) y el contenido moderado de nutrientes (p. ej., proteínas, grasas, vitaminas) lo hacen susceptible al crecimiento microbiano y al deterioro. La masilla estropeada causaría importantes problemas ambientales, como la acidificación del suelo y la contaminación de las aguas subterráneas [10].

Hay dos formas principales de tratar la masilla: como un residuo, lo que conduce a la contaminación ambiental y al desperdicio de recursos, o como alimento [11-13]. Debido al alto contenido de proteínas y celulosa de la masilla, algunos investigadores la han utilizado en la producción de hojuelas, pan integral, galletas y aperitivos, pero la cantidad añadida de masilla fue muy pequeña [14-17].

Para desarrollar la economía circular y darle una valorización efectiva a la conversión de la masilla en productos de valor agregado, se propone darle un reúso a la masilla para la remoción de contaminantes como se muestra en la Figura 3 [18].



**Figura 3.** Uso de masilla para la remoción de contaminantes.

La celulosa, uno de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica, es el biopolímero más abundante en el planeta. El uso de biomasa lignocelulósica para producir adsorbentes de celulosa contribuye al reciclaje de desechos y reduce la carga ambiental, mejorando así la bioeconomía circular [18]. La adsorción es uno de los métodos más adecuados y prometedores para la eliminación de metales pesados presentes dentro de efluentes acuosos de algunos procesos industriales, por ejemplo, de plantas de tratamiento de agua residual [19]. Se ha reportado que los adsorbentes a base de celulosa son eficaces para eliminar metales pesados, incluidos oro, platino, plomo, cromo, cadmio, zinc y cobre [20-23].

La adsorción, referida como la acumulación de una sustancia en la interfase de dos estados: sólido y líquido o sólido y gas [24], es uno de los métodos más populares por su sencillez de operación, alta eficiencia, fácil recuperación, capacidad de renovación y rentabilidad [25-28]. Sin embargo, la elección de un adsorbente ideal es un reto constante por su actividad multifacética [29]. Como características destacables de un adsorbente ideal se considera tener una alta área de superficie, eficiente capacidad de adsorción, estabilidad mecánica y de fácil regeneración. Otros parámetros como el pH de la solución, la temperatura, el tiempo de contacto y la dosis de adsorbente también tienen un impacto significativo en la efectividad de la adsorción [30].

El objetivo de este trabajo fue modificar químicamente a la masilla de la cervecería Heineken (Tecate, Baja California), y realizar una isoterma de adsorción como estrategia para estudiar la remoción de cobre presente en un medio acuoso. La concentración de cobre se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico.

## 2. Experimental

Se recolectó una muestra de masilla húmeda procedente de la cervecería Heineken (Tecate, Baja California), se tomaron 20 g de muestra y se mezclaron con 80 mL de ácido clorhídrico. La mezcla masilla-HCl se agito durante 24 horas, con varillas tipo propela a 40 rpm y posteriormente se filtro por gravedad usando papel whatman tipo cualtitativo. La masilla modificada químicamente se secó por un periodo de 72 horas dentro de una estufa a 95 °C. El material seco obtenido se trituró usando un mortero para homogenizar el tamaño de las partículas. Este material se empleó en estas condiciones de elaboración para realizar la isoterma de adsorción.

En la Figura 4 se muestra el proceso para la determinación de cobre. El ácido bicinconínico no reacciona fácilmente con  $\text{Cu}^{+2}$ , por lo tanto la determinación comienza reduciendo a  $\text{Cu}^{+1}$ , utilizando un agente reductor como ascorbato de sodio, en un medio regulado a un  $\text{pH}=6.7$ , lo que permite la determinación de  $\text{Cu}^{+1}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ . Así el ácido bicinconínico reacciona con  $\text{Cu}^{+1}$  para producir un complejo de color púrpura el cual se mide espectrofotométricamente en la región del visible a 560 nm [31].

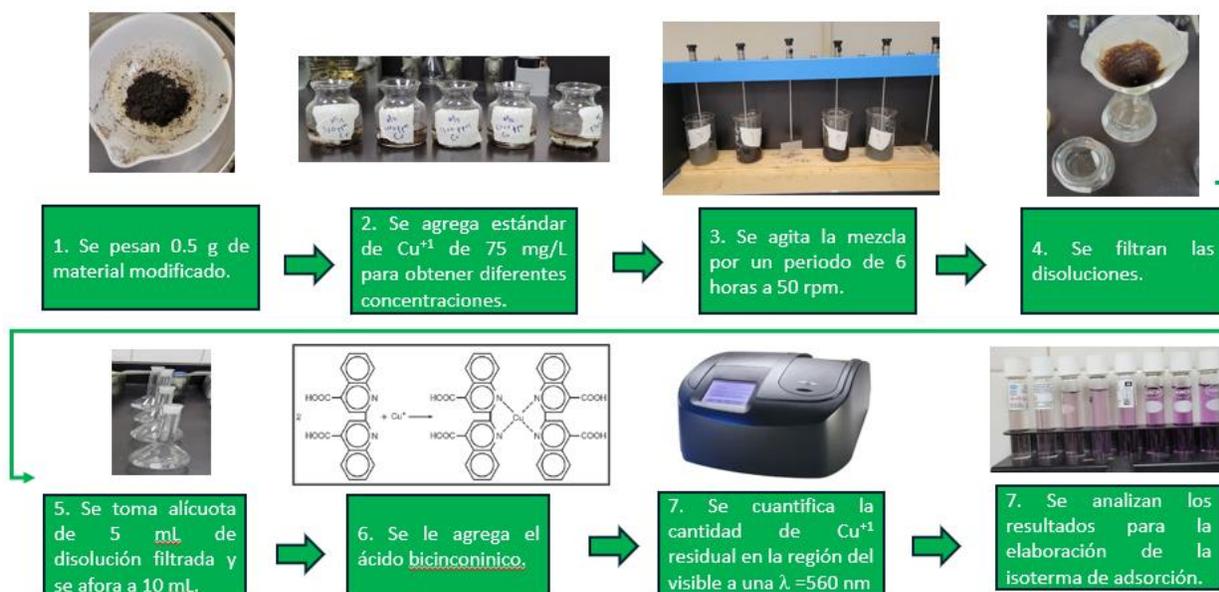


Figura 4. Proceso para la cuantificación de cobre

Para la determinación del tamaño de partícula, muestras de 25 mg de masilla modificada se mezclaron con diferentes concentraciones de soluciones dispersantes tanto de NaOH (0.05, 0.10 y 0.15 M) como de HNO<sub>3</sub> (0.05, 0.10 y 0.15 M). Enseguida, la dispersión se favoreció colocando las mezclas en un baño ultrasónico durante 30 minutos. Al término de este proceso, 1 mL de cada dispersión se colocó en celdas para la determinación de potencial Z (ver Figura 5).



Figura 5. Medición de carga superficial y tamaño de partícula

### 3. Resultados y Discusión

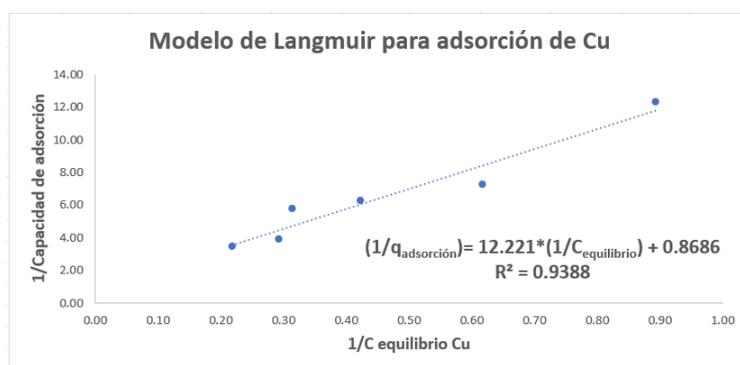
Se determinó la capacidad de adsorción ( $q_{\text{adsorción}}$ ) expresada en (mg Cu/g masilla), con la ecuación 1, donde V es el volumen de muestra utilizada en litros (L) y C representa la concentración del metal (mg/L) [32].

$$q_{\text{adsorción}} = \frac{(C_{\text{inicial}} - C_{\text{equilibrio}}) * V}{g_{\text{masilla}}} \quad (1)$$

En la Isotherma de Langmuir el modelo describe cualitativamente la adsorción en monocapa sobre una superficie sólida homogénea, lo que indica que presenta un número finito de sitios idénticos para la adsorción. Además, el modelo asume energías uniformes en el proceso de adsorción y con interacción despreciable entre las moléculas [33].

El modelo lineal de Langmuir está representado por la ecuación 2, el parámetro  $q_{\text{max}}$  representa la capacidad de adsorción máxima del Cu por la masilla modificada químicamente y el parámetro b refleja la afinidad de la masilla modificada químicamente por el Cu [34].

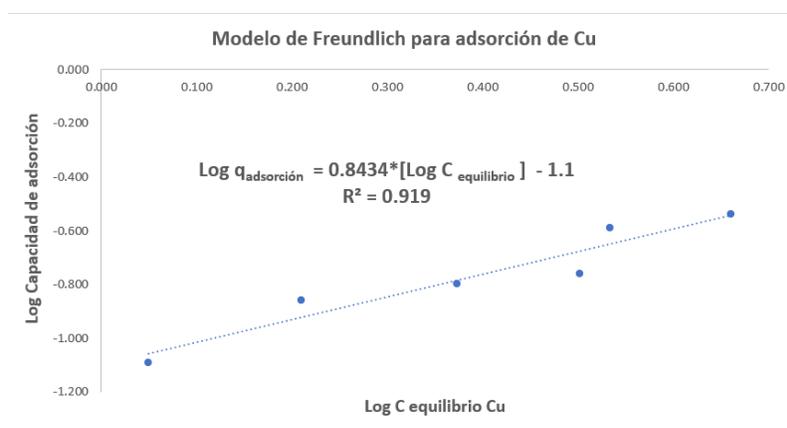
$$\frac{1}{q_{\text{adsorción}}} = \left[ \frac{1}{b * q_{\text{max}}} \right] * \left[ \frac{1}{C_{\text{equilibrio}}} \right] + \frac{1}{q_{\text{max}}} \quad (2)$$



**Figura 6.** Modelo lineal de Langmuir para cobre

Para el caso de la Isoterma de Freundlich es un modelo puramente matemático empírico que supone que la superficie del sólido es heterogénea. El modelo tiene el inconveniente de que no conduce a una adsorción finita, si no que esta aumenta sin límite con el aumento de la concentración en el equilibrio, lo que implica que el modelo describe una adsorción heterogénea en multicapas dándose un recubrimiento infinito [35]. La ecuación 3 lineal de Freundlich, el parametro se relaciona con la afinidad de la masilla modificada químicamente por el Cu, mientras que n es un parametro empirico que varia con el grado de heterogeneidad,  $C_{\text{equilibrio}}$  es la concentración del metal en el equilibrio y  $q_{\text{adsorción}}$  representa la capacidad de adsorción [32]

$$\log q_{\text{adsorción}} = \left[ \frac{1}{n} * \log C_{\text{equilibrio}} \right] + \log K \quad (3)$$



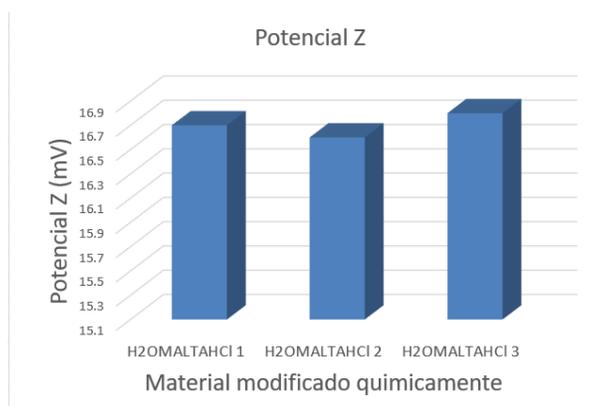
**Figura 7.** Modelo lineal de Freundlich para cobre

En la tabla 1 se resumen los valores obtenidos para los parámetros de las isothermas de adsorción para ambos modelos aplicados a la adsorción de cobre.

**Tabla 1** Parámetros de isotermas de adsorción de Cu

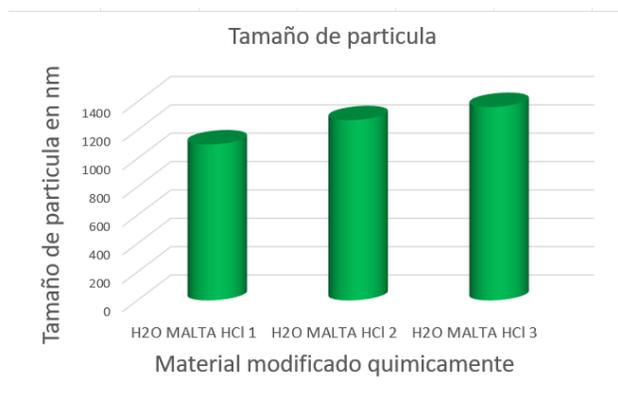
Modelo Langmuir		Modelo Freundlich		
$Q_{\max}$ (mg Cu/g masilla)	$R^2$	K	n	$R^2$
1.1513	0.9388	0.0794	1.1857	0.919

La carga de la partícula modificada de masilla es positiva. De acuerdo con la Figura 8 la réplica 1 presenta una carga superficial de 16.7 mV, la réplica 2 16.6 mV y la réplica 3 16.8 mV, presentando un promedio de carga superficial de **16.7 ± 0.1 mV**.



**Figura 8.** Carga de la partícula modificada

En la Figura 9 se muestra que la réplica 1 presentó un tamaño de 1100 nm, las réplicas 2 y 3 muestran 1271 nm y 1364 nm respectivamente, siendo el promedio de **1245 nm**.



**Figura 9.** Tamaño de partícula de la masilla modificada químicamente

#### 4. Conclusiones

El beneficio que se encuentra en la estrategia del uso de la masilla modificada químicamente para estudiar la remoción de cobre presente en un medio acuoso empleando una isoterma de adsorción, de acuerdo al modelo de Langmuir la capacidad máxima de adsorción para cobre es de 1.1513 mg de Cu por gramo de masilla modificada químicamente, mostrando un alto potencial para la remoción de cobre en efluentes acuosos, lo que permite especular que esta tecnología pudiera ser transferida a procesos de eliminación de otros metales pesados en soluciones acuosas como níquel.

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Baja California (<https://ror.org/05xwqc167>) por su apoyo a través de la 22va Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación a Cuerpos Académicos reconocidos ante PRODEP.

## 6. Referencias

- [1] M. Adel, M.A. Ahmed, A.A., Mohamed. A facile and rapid removal of cationic dyes using hierarchically porous reduced graphene oxide decorated with manganese ferrite. *FlatChem* **26**, 100233 (2021).
- [2] C. Tortajada, A.K. Biswas. Achieving universal access to clean water and sanitation in an era of water scarcity: strengthening contributions from academia. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* **34**, 21–25 (2018).
- [3] H. Mirzazadeh, M. Lashanizadegan. Binary semiconductor oxide nanoparticles on graphene oxide (CdO/CeO<sub>2</sub>/RGO) for the treatment of hazardous organic water pollutants. *Korean J. Chem. Eng.* **35**, [3], 684–693 (2018).
- [4] M.A. Ahmed, N.M. Abdelbar, A.A. Mohamed. Molecular imprinted chitosan- TiO<sub>2</sub> nanocomposite for the selective removal of Rose Bengal from wastewater. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 1046–1053, (2018).
- [5] Luo, T., Young, R., Reig, P. Aqueduct projected water stress country rankings. World Resources Institute. Technical Note 1-16 (2015).
- [6] M. Mussa, S. Mateso, Y. Chebude. Potentials of agricultural wastes as the ultimate alternative adsorbent for cadmium removal from wastewater. A review. *Scientific African* (2021).
- [7] TTB. Beer Statistics U.S. Department of the Treasury. <https://www.ttb.gov/beer/statistics> (accessed on March 12th, 2021).
- [8] La cerveza mexicana deleita al mundo. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. [https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-cerveza-mexicana-deleita-al-mundo#:~:text=Actualmente%20M%C3%A9xico%20ocupa%20el%206, en%20m%C3%A1s%20de%20180%20pa%C3%ADses](https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-cerveza-mexicana-deleita-al-mundo#:~:text=Actualmente%20M%C3%A9xico%20ocupa%20el%206, en%20m%C3%A1s%20de%20180%20pa%C3%ADses.). (Consultado el 10 de septiembre 2024).
- [9] K.M. Lynch, E.J. Steffen, E.K. Arendt. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* **122**, [4], 553-568 (2016).
- [10] S.I. Mussatto, G. Dragone, G.J.M. Rocha, I.C. Roberto. Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping. *Carbohydr. Polym.* **64**, [1], 22-28 (2006).

- [11] H. Imaizumi, F. Batisel, J. De Souza, F.A. Santos. Replacing soybean meal for wet brewer's grains or urea on the performance of lactating dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.* **47**, [5], 877-882 (2015).
- [12] C. Bougrier, D. Dognin, C. Laroche, J. A. Cacho Rivero. Use of trace elements addition for anaerobic digestion of brewer's spent grains. *J. Environ. Manage.* **223**, 101-107 (2018).
- [13] E. J. Lao, N. Dimoso, J. Raymond, E. R. Mbega. The prebiotic potential of brewers' spent grain on livestock's health: A review. *Trop. Anim. Health Prod.* **52**, [2], 461-472 (2020).
- [14] H. Z. Hassona. High fibre bread containing brewer's spent grains and its effect on lipid metabolism in rats. *Food/Nahrung* **37**, [6], 576-582 (1993).
- [15] A. Ktenioudaki, N. O'Shea, E. Gallagher. Rheological properties of wheat dough supplemented with functional by-products of food processing: Brewer's spent grain and apple pomace. *J. Food Eng.* **116**, 362-368 (2013).
- [16] A. L. McCarthy, Y. C. O'Callaghan, C. O. Piggott, R. J. FitzGerald, N. M. O'Brien. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: A review. *Proc. Nutr. Soc.* **72**, [1], 117-125 (2013).
- [17] O. O. Awolu, R. O. Osemeke, B. O. Ifesan. Antioxidant, functional and rheological properties of optimized composite flour, consisting wheat and amaranth seed, brewers' spent grain and apple pomace. *J. Food Sci. Technol.* **53**, [2], 1151-1163 (2016).
- [18] Y. He, A. M. Dietrich, Q. Jin, T. Lin, D. Yu, H. Huang. Cellulose adsorbent produced from the processing waste of brewer's spent grain for efficient removal of Mn and Pb from contaminated water. *Food and Bioproducts Processing* **135**, 227-237 (2022).
- [19] Zhao, J., Liu, J., Li, N., Wang, W., Nan, J., Zhao, Z., Cui, F. Highly efficient removal of bivalent heavy metals from aqueous systems by magnetic porous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MnO<sub>2</sub>: Adsorption behavior and process study. *Chem. Eng. J.* **304**, 737-746 (2016).
- [20] F.B. Biswas, I.M.M. Rahman, K. Nakakubo, M. Endo, K. Nagai, A.S. Mashio, T. Taniguchi, T. Nishimura, K. Maeda, H. Hasegawa. Highly selective and straightforward recovery of gold and platinum from acidic waste effluents using cellulose-based bio-adsorbent. *J. Hazardous Materials.* **410**, 124569 (2021).
- [21] N.A. Fakhre, B.M. Ibrahim. The use of new chemically modified cellulose for heavy metal ion adsorption. *J. Hazard. Mater.* **343**, 324-331 (2018).
- [22] C. Li, H. Ma, S. Venkateswaran, B.S. Hsiao. Highly efficient and sustainable carboxylated cellulose filters for removal of cationic dyes/heavy metals ions. *Chemical Engineering Journal.* **389**, 123458 (2020).
- [23] S. H. Park, S. S. Shin, C. H. Park, S. Jeon, J. Gwon, S. Y. Lee, S.S. Kim, H. J. Kim, J. H. Lee. Poly (acryloyl hydrazide)-grafted cellulose nanocrystal adsorbents with an excellent Cr (VI) adsorption capacity. *J. Hazard. Mater.*, **394**, 122512 (2020).
- [24] A. Bhatnagar, M. Sillanpää. Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment-a review. *Chemical Engineering Journal.* **157**, [2-3], 277-286 (2010).
- [25] S. Bashir, Q. Hussain, J. Zhu, Q. Fu, D. Houben, H. Hu, Efficiency of KOH-modified rice straw-derived biochar for reducing cadmium mobility, bioaccessibility and bioavailability risk index in red soil. *Pedosphere* **30**, [6], 874-882 (2020).

- [26] B.B. Mathew, M. Jaishankar, V.G. Biju, K.N. Beeregowda, Role of bioadsorbents in reducing toxic metals, *J. Toxicol.* (2016).
- [27] M.A. Renu, K. Singh, S. Upadhyaya, R.K. Dohare, Removal of heavy metals from wastewater using modified agricultural adsorbents, *Materialstoday* **4** [9] 10534–10538 (2017).
- [28] Z. Shen, X. Fan, D. Hou, F. Jin, D. O'Connor, D.C.W. Tsang, Y.S. Ok, D.S. Alessi, Risk evaluation of biochars produced from Cd-contaminated rice straw and optimisation of its production for Cd removal, *Chemosphere* **233** 149–156 (2019).
- [29] K. Kelly-Vargas, M. Cerro-Lopez, S. Reyna-Tellez, E.R. Bandala, J.L. Sanchez-Salas, Biosorption of heavy metals in polluted water, using different waste fruit cortex, *Phys. Chem. Earth* **37–39**, 26–29 (2012).
- [30] K. Pyrzynska, Removal of cadmium from wastewaters with low-cost adsorbents, *J. Environ. Chem. Eng.* **7**, [1], 102795 (2019).
- [31] G.A. Sánchez Gallegos, E. G. Carrillo Cedillo, M.P. Cañizares Macías, J.A. Rodríguez Ávila. Determinación de cobre por flujo continuo. *Aplicaciones de la Química Analítica al 2015 en México*. **1**, 238-243 (2015).
- [32] E. L. Sánchez, M. T. Garza, V. Almaguer Cantú, I. C. Sáenz Tavera, A. Liñán Montes, Estudio cinético e isothermas de adsorción de Ni(II) y Zn(II) utilizando biomasa del alga *Chlorella* sp. Inmovilizada. *Ciencia UANL* **XI**, [2], 168-176 (2008).
- [33] A. O. Dada, A. P. Olalekan, A. Olatunya, O. O. Dada. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of  $Zn^{+2}$  Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk. *IOSR Journal of Applied Chemistry*. **3** [1], 38-45 (2012).
- [34] M. Penedo-Medina; E. M. Manals-Cutiño; F. Vendrell-Calzadilla; D. Salas-Tort. Adsorción de níquel y cobalto sobre carbón activado de cascarón de coco *Tecnología Química, Universidad de Oriente Santiago de Cuba* **XXXV**, [1], 73-91 (2015).
- [35] N. B. Garcés Guamba, B. A. Morillo Morales. Estudio de la adsorción de cinc mediante el uso del compuesto magnetita/óxido de grafeno para su remoción en aguas sintéticas (2019).

## Parámetros cromatográficos de los derivados de 2,4-DNPH de carbonilos comunes en un ambiente laboral

Norma Ruth López Santiago<sup>a\*</sup>, Diana Patricia Fernández Domínguez<sup>a</sup>, Gema Luz Andraca Ayala<sup>b</sup> y Margarita Eugenia Gutiérrez Ruiz<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, CDMX. Tel: 5556223899 ext. 44455, e-mail: nruthls@quimica.unam.mx.

<sup>b</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático. Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, CDMX. Tel: 5556224240, e-mail: gema@atmosfera.unam.mx

### Resumen

Existen diversos contaminantes químicos en el ambiente laboral, como los carbonilos (aldehídos y cetonas), estos compuestos son generados por la industria o por materiales y productos usados en el día a día y su importancia reside en su impacto en la salud en ambiente interior y su potencial fotoquímico de ser precursor de ozono troposférico en el ambiente exterior. En México la Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014, establece los criterios para el reconocimiento, evaluación y control de los agentes químicos contaminantes presentes en el ambiente laboral, el cual es definido como el conjunto de elementos físicos, químicos y biológicos presentes en el centro de trabajo, de ahí su importancia de su análisis. Los parámetros cromatográficos de 15 derivados de carbonilos con 2,4-Dinitrofenilhidrazina, incluyen valores de  $\alpha$  superiores a 1 y separaciones cercanas al 100% para la mayoría de los compuestos. Estos resultados demuestran que las condiciones actuales son altamente efectivas para el análisis de carbonilos y proporcionan una base sólida para la optimización del método analítico.

**Palabras clave.** *Parámetros cromatográficos, carbonilos, ambiente laboral.*

### Abstract

There are various chemical pollutants in the work environment, such as carbonyls (aldehydes and ketones), these compounds are generated by industry or by materials and products used on a daily basis and their importance lies in their impact on health in the indoor environment and their photochemical potential to be a precursor of tropospheric ozone in the outdoor environment. In Mexico, Official Mexican Standard NOM-010-STPS-2014, establishes the criteria for the recognition, evaluation and control of chemical pollutants present in the work environment, which is defined as the set of physical, chemical and biological elements present in the workplace, hence its importance of its analysis. The chromatographic parameters of 15 carbonyl derivatives with 2,4-Dinitrophenylhydrazine include  $\alpha$  values greater than 1 and separations close to 100% for most compounds. These results demonstrate that the current conditions are highly effective for carbonyl analysis and provide a solid basis for the optimization of the analytical method.

**Keywords.** *Chromatographic parameters, carbonyls, working environment.*

## 1. Introducción

Los carbonilos, aldehídos y cetonas, son contaminantes químicos comunes en muchos entornos laborales donde existan agentes químicos que sean capaces de modificar las condiciones ambientales del lugar de trabajo, su presencia puede tener efectos adversos significativos sobre la salud humana, especialmente cuando se encuentran en concentraciones elevadas, incluyendo irritación respiratoria, daño ocular y efectos carcinogénicos en concentraciones elevadas [1], exposiciones prolongadas pueden causar síntomas graves como mareos, náuseas y daño a órganos internos [1, 2, 3]. La presencia de carbonilos en el ambiente puede exacerbar enfermedades respiratorias preexistentes y contribuir a afecciones pulmonares crónicas a largo plazo [4]. La regulación precisa y el monitoreo de estos compuestos son esenciales tanto para cumplir con normativas legales, como para mejorar las condiciones laborales y de salud [3]. En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-2014 establece las directrices para la identificación, evaluación y control de agentes químicos en el ambiente laboral [5], esta normativa es fundamental para proteger la salud de los trabajadores y prevenir enfermedades relacionadas con la exposición a contaminantes.

El análisis de carbonilos en el ambiente laboral junto con una gestión adecuada de los niveles de concentración es fundamental para preservar un entorno laboral seguro y saludable, protegiendo tanto la salud de los trabajadores como el bienestar general de la organización. En este sentido la cromatografía de líquidos es una herramienta decisiva para su identificación y cuantificación, por lo que la obtención de los parámetros cromatográficos (PC) es fundamental. Conocer el tiempo de retención ( $t_r$ ), la resolución ( $R_s$ ), el factor de retención ( $k'$ ) o el número de platos teóricos ( $N$ ), es vital en la efectividad de esta técnica [6, 7]. Comprender y aplicar adecuadamente los PC permite una cuantificación precisa y confiable de los carbonilos, y también contribuye a la implementación de medidas correctivas y preventivas para proteger la salud de los trabajadores. En consecuencia, el análisis cromatográfico bien optimizado es esencial para el monitoreo efectivo de contaminantes químicos en el entorno laboral.

El objetivo de este trabajo fue obtener los parámetros cromatográficos de 15 derivados de carbonilos al reaccionar con 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), compuestos frecuentes en un entorno laboral, que permitan la identificación y optimización los procesos analíticos para su cuantificación y contribuir a la investigación científica sobre el impacto de estos compuestos en la salud y el medio ambiente.

## 2. Experimental

**Reactivos.** Estándar T011/IP-6A Aldehyde/ketone-DNPH Mix (Carbonilos), Acetonitrilo grado cromatográfico Tesaquim. Agua Tipo II.

**Materiales.** Matraces volumétricos clase A de 5 mL. Micropipeta marca Rainin Pipet- Line XLS de volumen variable (100-1000 uL). Jeringa Hamilton de 100 uL para cromatografía de líquidos. Columna de ACE 5 C18, 5  $\mu$ m, 25 cm  $\times$  4.6 mm I. D.

**Equipo.** Waters 510 HPLC Pump Modelo 510 Solvent Delivery System acoplado a un detector de Ultravioleta-Visible, Spectra Focus Forward Optical Scanning. Software Millenium.

**Condiciones cromatográficas.** Columna de ACE 5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 25 cm  $\times$  4.6 mm I. D. Fase móvil Acetonitrilo:agua (60:40), corrida isocrática, 2 mL/min. 360 nm. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ .

**Obtención de los parámetros cromatográficos (PC).** Para obtención de los PC se preparó una disolución de los carbonilos a 0.4 mg/L. Se realizaron 3 inyecciones a las condiciones cromatográficas indicadas.

### 3. Resultados y Discusión

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es una técnica que consiste en separar mezclas multicomponentes, la separación es resultado de sus diferentes velocidades de migración a lo largo del lecho de la fase estacionaria [8]. Cada separación se caracteriza por parámetros cromatográficos (PC), entre otros: tiempo de retención ( $t_r$ ), factor de retención ( $k'$ ), selectividad ( $\alpha$ ), eficiencia ( $N$ ), altura de plato teórico ( $H$ ) y resolución ( $R_s$ ) [6, 7, 9, 10]. En la Tabla 1 se presentan los parámetros sus definiciones y ecuaciones empleada para su cálculo en este trabajo.

**Tabla 1.** Parámetros cromatográficos: definiciones y ecuaciones

Parámetro		Definición	Ecuaciones de cálculo
Parámetros de retención	Tiempo de retención ( $t_r$ ),	Es el tiempo que transcurre entre el inicio de una inyección y la aparición del pico máximo del analito	$t_r$
	Factor de retención ( $k'$ ),	Es una medida del tiempo que el componente de la muestra reside en la fase relativa al tiempo que reside en la fase móvil	$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$ (1)
	Selectividad ( $\alpha$ ),	El valor de retención relativo calculado para dos picos adyacentes. Por definición siempre es mayor a 1	$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m} = \frac{k'_2}{k'_1}$ (2)
Términos que expresan la eficiencia de la separación	Eficiencia ( $N$ ),	Número indicativo del rendimiento de la columna	$N = 16 \left( \frac{t_r}{W_b} \right)^2$ (3)
	Altura de plato teórico ( $H$ )	La longitud de la columna dividida por el número teórico de la placa	$H = \frac{L}{N}$ (4)
	Resolución ( $R_s$ )	La separación de dos picos en términos de su anchura media de pico en la base ( $t_{r2} > t_{r1}$ )	$R_s = \frac{2\Delta t_r}{W_{b2} + W_{b1}}$ (5)

$t_m$  : tiempo muerto,  $W_b$  Ancho a la base,  $L$  largo de la columna. Con información de [6, 7, 9, 10, 11]

En la Figura 1 se presenta un cromatograma de los derivados de carbonilos DNPH y en las Tablas 2 y 3 se presentan los PC obtenidos bajo las condiciones cromatográficas descritas.

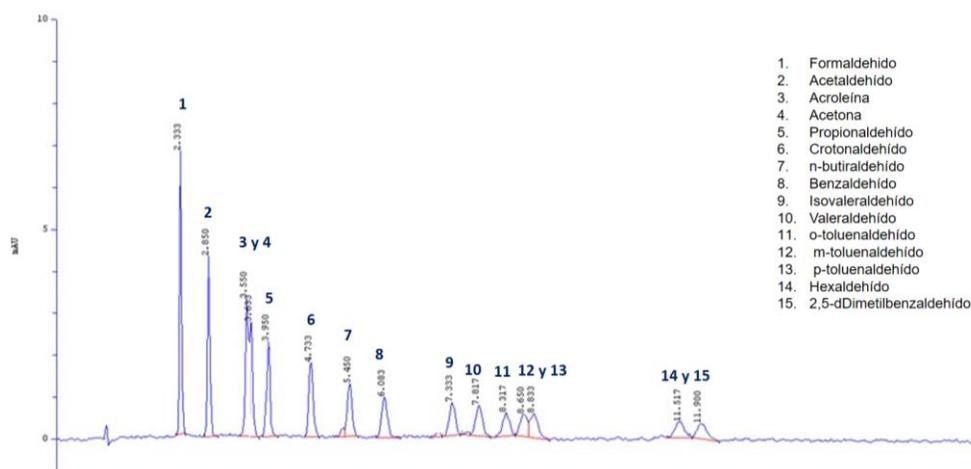


Figura 1. Cromatograma derivados de carbonilos DNPH.

Tabla 2. Parámetros cromatográficos de los derivados de 2,4-DNPH de carbonilos (Parte I)

Pico	Derivado de DNPH	Parámetros cromatográficos I			
		tr (min)	k'	N	H
1	Formaldehído	2.43	1.9	634	0.042
2	Acetaldehído	2.92	2.5	702	0.038
3	Acroleína	3.52	3.2	4970	0.005
4	Acetona	3.61	3.3	6204	0.004
5	Propionaldehído	3.88	3.7	1973	0.013
6	Crotonaldehído	4.55	4.5	1526	0.018
7	n-Butiraldehído	5.17	5.2	1575	0.017
8	Benzaldehído	5.63	5.8	2525	0.010
9	Isovaleraldehído	6.73	7.1	7770	0.0032
10	Valeraldehído	7.14	7.1	7770	0.0032
11	o-Toluenaldehído	7.48	8.0	10340	0.0024
12	m-Toluenaldehído	7.74	8.3	21560	0.0012
13	p-Toluenaldehído	7.91	8.5	8730	0.0029
14	Hexaldehído	10.17	11.2	5818	0.0043
15	2,5-Dimetilbenzaldehído	10.37	11.5	11379	0.0022

El  $t_r$  permite identificar los diferentes carbonilos basándose en su migración a través de la columna, así cada derivado de DNPH, fue identificado con su  $t_r$  (comparativo con el cromatograma de le estándar T011/IP-6A Aldheyde/ketone-DNPH Mix). Mismo que permitieron calcular los demás parámetros.  $N$  y  $H$  proporcionan información sobre la eficiencia de la columna cromatográfica, a distintas retenciones (poco retenidos 2-4 minutos,-derivados del formaldehído

y acetaldehído-, retención intermedia (4.1-8 min) derivados de benzaldehído y n-Butiraldehído y los más retenidos ( $t_r > 10$  min) -derivados del Hexaldehído y 2,5-Dimetilbenzaldehído-), Tabla 2. Estos parámetros permiten ajustar las condiciones experimentales para mejorar la separación y cuantificación de los carbonilos, facilitando el cumplimiento de las normativas de seguridad y salud en el trabajo. La resolución asegura la separación adecuada de picos adyacentes en el cromatograma, lo cual es esencial para distinguir entre compuestos con tiempos de retención similares.

**Tabla 3.** Parámetros cromatográficos de los derivados de 2,4-DNPH de carbonilos (Parte II)

N.	Picos adyacentes (derivados DNPH)	$\alpha$	$R_s$
1	Formaldehído/Acetaldehído	1.31	1.2
2	Acetaldehído/Acroleína	1.29	1.9
3	Acroleína/Acetona	1.03	0.4
4	Acetona/Propionaldehído	1.10	1.0
5	Propionaldehído/Crotonaldehído	1.22	1.6
6	Crotonaldehído/n-butiraldehído	1.17	1.2
7	n-butiraldehído/Benzaldehído	1.11	0.9
8	Benzaldehído/Isovaleraldehído	1.23	2.9
9	Isovaleraldehído/Valeraldehído	1.00	1.3
10	Valeraldehído/o-toluenaldehído	1.13	1.1
11	o-toluenaldehído/m-toluenaldehído	1.04	1.0
12	m-toluenaldehído/p-toluenaldehído	1.02	0.6
13	p-toluenaldehído/hexaldehído	1.32	5.2
14	Hexaldehído/2,5-Dimetilbenzaldehído	1.02	0.4

En este estudio la acroleína y acetona tienen  $t_r$  muy cercanos (3.52 y 3.61 respectivamente), con una selectividad ( $\alpha$ ) de 1.03, la Figura 1, y una resolución de 0.4, para un porcentaje de separación ~80%, Tabla 3. Como la selectividad se puede modificar cambiando la composición de la fase móvil (FM) o cambiando la fase estacionaria, si quisiéramos usar la misma columna podríamos hacer ajustes a la composición de la FM para mejorar la selectividad [10]. La importancia de los PC [7, 10] en la determinación de carbonilos es:

- ( $t_r$ ), conocerlo permite la identificación de los carbonilos presentes en una muestra, ya que cada uno tiene un tiempo de retención característico bajo condiciones específicas.
- ( $k'$ ), permite a evaluar la retención de diferentes compuestos.
- $\alpha$ , nos permite evaluar la separación entre dos picos adyacentes en el cromatograma. El factor de separación es una medida del tiempo o la distancia entre los máximos de dos picos. Si  $\alpha = 1$ , los dos picos tienen el mismo tiempo de retención y coelución.
- ( $R_s$ ), una alta resolución es esencial para separaciones útiles.
- $N$  y  $H$ , pueden ser empelados para dar seguimiento al desgaste de la columna. Un número de platos teóricos alto, es sinónimo de picos agudos y estrechos, mayor capacidad de analizar muestras complejas. Las columnas con números de placa altos son más

eficientes. Una columna con un  $N$  alto tendrá un pico más estrecho en un tiempo de retención dado que una columna con un número  $N$  más bajo.

#### 4. Conclusiones

Se obtuvieron los parámetros cromatográficos de 15 carbonilos con las condiciones empleadas proporcionan una base sólida para la optimización del método analítico. Los resultados demostraron  $\alpha$  mayores a 1 y separaciones  $\sim 100\%$  para la mayoría de los compuestos carbonílicos, indicando que las condiciones actuales son altamente eficaces para el análisis de estos compuestos.

El entendimiento y la aplicación adecuada de estos, es crucial para lograr un análisis óptimo que facilite la vigilancia efectiva de contaminantes químicos que contribuye a mantener un entorno laboral seguro y libre de riesgos asociados a los compuestos carbonilos, sino que también asegura un riguroso control de calidad de la columna cromatográfica. La implementación de estas condiciones mejora la fidelidad del análisis y fortalece la capacidad de monitoreo y control en aplicaciones prácticas. Conocer los parámetros cromatográficos es fundamentales para la optimización de condiciones cromatográficas, la identificación y cuantificación de compuestos, y la mejora de la calidad del análisis, son esenciales en una variedad de aplicaciones científicas, industriales y de investigación

#### 5. Agradecimientos

A la DGAPA por el financiamiento a través del proyecto *PE102223 Guion de laboratorio para la determinación de la concentración de agentes tóxicos en fase gas en el ambiente laboral a través de un sistema de monitoreo semiautomático.*

#### 6. Referencias

- [1] IARC. (2012). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Volume 100F: Chemical Agents and Related Occupations. International Agency for Research on Cancer. Volume 100F: Chemical Agents and Related Occupations. International Agency for Research on Cancer. Suiza. DOI:ISBN 978 92 832 1323 9
- [2] H. S. Qian Xi, (2019). Levels Characterizing summer and winter carbonyl compounds in Beijing atmosphere. *Atmospheric Environment*, 214, 1-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.116845>
- [3] Y.-H. Choi, H. Kim, J. Sohn, J. Seo, (2023). Occupational exposure to VOCs and carbonyl compounds in beauty salons and health risks associated with it in South Korea. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1(253), 1-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114873>
- [4] EPA. (2024). Integrated Risk Information System. Recuperado el 03 de 09 de 2024, de <https://www.epa.gov/iris>
- [5] STPS (2014). NOM-010-STPS-2014, Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control. *Diario Oficial de la Federación*, 1-73.

- [6] D. A. Skoog, (2023). Fundamentos de química analítica (págs. 835-855). CV., Cengage Learning Editores SA.
- [7] Separation science. (2024). HPLC Back to Basics. Recuperado el 09 de 2024, de [https://learning.sepscience.com/hubfs/Guides/HPLC%20Solutions/HPLC\\_BtB\\_v2.pdf](https://learning.sepscience.com/hubfs/Guides/HPLC%20Solutions/HPLC_BtB_v2.pdf)
- [8] W. Parys, M. Dołowy, A. Pyka-Paja, (2022). Significance of Chromatographic Techniques in Pharmaceutical Analysis. Processes, 10(172), 2-38. doi:<https://doi.org/10.3390/pr10010172>
- [9] P. Ravisankar, S. Anusha, K. Supriya, U. A. Kumar, (2019). International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research(09), 46-50. doi:ISSN 0976 – 044X
- [10] Agilent. (2024). Agilent. Obtenido de <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- [11] International Union of Pure and Applied Chemistry, (1993). Nomenclature for chromatography. Pure and Applied Chemistry, 65(4), 819-872. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac199365040819>.

# Desarrollo de un método de extracción asistida por ultrasonido y microextracción en una sola gota por inmersión directa para la detección de cannabidiol en una muestra comercial de cigarro

Ileana Jiménez Rabadán<sup>a</sup>, Silvia G. Ceballos Magaña<sup>b</sup>, Roberto Muñoz Valencia<sup>a</sup>,  
Hortensia Parra Delgado<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Colima. Carr. Colima-Coquimatlán km. 9, Coquimatlán, Col., México. C.P. 28400. e-mail: [ijimenez14@ucol.mx](mailto:ijimenez14@ucol.mx) (IJR), [robemuva@yahoo.com](mailto:robemuva@yahoo.com) (RMV), [hparra@ucol.mx](mailto:hparra@ucol.mx) (HPD)

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias. Universidad de Colima. Bernal Díaz Castillo 340, Colima, Col., México. C.P. 28045. e-mail: [silvia\\_ceballos@ucol.mx](mailto:silvia_ceballos@ucol.mx) (SGCM)

## Resumen

En México, existe una variedad de productos derivados de la planta *Cannabis sativa* L. que se venden principalmente con fines recreativos. Estos productos incluyen ungüentos, bebidas, gomitas, tinturas, aceites, endulzantes, licores e incluso croquetas para perro, con supuestas propiedades antidepresivas, ansiolíticas, somníferas etc. Sin embargo, muchos de estos productos carecen de etiquetado adecuado o tienen información deficiente sobre su composición y proceso de elaboración, así como sobre su impacto en la salud. Además, la regulación de estos productos en México es mínima en comparación con la cantidad existente en el mercado.

Tradicionalmente, la extracción de cannabinoides se ha realizado mediante procesos de extracción sólido-líquido y líquido-líquido, que requieren grandes volúmenes de disolventes con alto impacto ambiental y tiempos experimentales prolongados. En los últimos años, las técnicas de preparación de muestras han incursionado en otras más amigables con el medio ambiente utilizando técnicas miniaturizadas en procesos de limpieza y preconcentración.

En este estudio, se desarrolló y optimizó una metodología de extracción asistida por ultrasonido y microextracción en una sola gota a una muestra comercial de cigarro del quimiotipo cannabidiol y cannabigerol, analizada mediante GC-FID. Se encontró que 20 mg de muestra, 3 mL de 100% ACN y 1 min de centrifugación permite obtener la máxima respuesta. Además, la mejor fase donadora es la relación 2:8 ACN/H<sub>2</sub>O, la mejor fase receptora es el tolueno, el tiempo de inmersión óptimo es 12.5 min, con 500 rpm de agitación y un pH del sistema de 13.

**Palabras clave.** Cannabis sativa L., GC-FID, técnicas miniaturizadas, cannabigerol, cannabidiol

## Abstract

In Mexico, there is a variety of products derived from the *Cannabis sativa* L. plant that are primarily sold for recreational purposes. These products include ointments, beverages, gummies, tinctures, oils, sweeteners, liquors, and even dog treats, all claiming to have antidepressants, anxiolytic, and sleep-inducing properties. However, many of these products lack proper labeling or have insufficient information regarding their composition and manufacturing process, as well as their health impacts. Additionally, the regulation of these products in Mexico is minimal compared to the amount available in the market.

Traditionally, cannabinoid extraction has been conducted through solid-liquid and liquid-liquid extraction processes, which require large volumes of solvents that have a significant environmental impact and lengthy experimental times. In recent years, sample preparation techniques have shifted towards more environmentally friendly methods using miniaturized techniques in cleaning and preconcentration processes.

In this study, an ultrasound-assisted, single-drop microextraction methodology was developed and optimized for a commercial cigar sample of cannabidiol and cannabigerol chemotypes analyzed by GC-FID. For sample pretreatment, it was found that 20 mg of sample, 3 mL of 100% ACN and 1 min of centrifugation allows the maximum response to be obtained. In the case of Single Drop MicroExtraction (SDME), the best donor phase was 2:8 ACN/H<sub>2</sub>O ratio, the best acceptor phase was toluene, the optimum immersion time was 12.5 min, at 500 rpm agitation and system pH of 13.

**Keywords.** *Cannabis sativa L.*, GC-FID, miniaturized techniques, cannabigerol, cannabidiol, cannabidiol

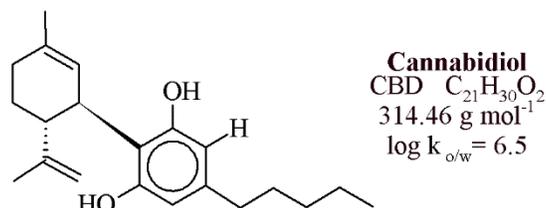
## 1. Introducción

Los terpenofenoles están presentes en una gran variedad de plantas, entre las cuales destaca la *Cannabis sativa* L., donde se han encontrado cannabino-olivetoides y cannabino-varinoides [1]. Esta planta, de la familia *Cannabaceae*, género *Cannabis*, especie *sativa* L., tiene tres subespecies principales: 1) ssp. *sativa* de porte alto, delgado y con hojas finas, 2) ssp. *indica* (Lam) de porte bajo, frondoso y con hojas gruesas, y 3) ssp. *ruderalis* (Janisch) con hojas de morfología distinta a las demás y que no suele comercializarse [2], [3], [4]. En la planta de *Cannabis sativa* L., se han identificado más de 1000 compuestos, de los cuales destacan más de 20 flavonoides, más de 30 terpenos y más de 120 cannabinoides; estos últimos son los compuestos mayoritarios de la planta, donde se encuentran en forma ácida: no psicoactiva, y que, tras un proceso de descarboxilación (mediante calentamiento, combustión o acción UV), dan lugar a las especies neutras: psicoactivas y/o psicotrópicas [1], [5], [6], [7], [8], [9].

A nivel mundial, existe una gran variedad de productos derivados de la planta *Cannabis sativa* L. con fines recreativos y, en los últimos años, con relevancia terapéutica y medicinal, donde destaca su uso como antidepresivos, analgésicos, antieméticos, anticonvulsivos, ansiolíticos, somníferos, entre otros [10]. En países como Canadá, Uruguay, Australia, Nueva Zelanda, Chile y República Checa está regulado el uso integral (medicinal/científico, recreativo e industrial) de la planta y sus derivados [11]. Sin embargo, en México no existe normatividad sobre la planta ni sus derivados a pesar de que en el artículo 235 Bis (2017) de la Ley General de Salud se menciona que la Secretaría de Salud es la responsable de diseñar y ejecutar políticas que regulen el uso de los productos farmacológicos del cannabis, destacando el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) y sus isómeros ( $\Delta^{6a}$ ,  $\Delta^7$ ,  $\Delta^8$  y  $\Delta^{10}$ ). En la misma ley, fracción II del artículo 245 (2017), estos productos se definen como psicotrópicos con algún valor terapéutico pero que representan un problema grave para la salud en concentraciones mayores al 1% y, en la fracción IV, como psicotrópicos con amplios usos terapéuticos que representan un problema menor para la salud en concentraciones menores al 1% [12].

Existen en la literatura diferentes metodologías para el análisis de cannabinoides en tres tipos de muestras: fisiológicas, ambientales y alimenticias. En matrices fisiológicas, se han desarrollado métodos analíticos para la determinación de cannabinoides naturales, sintéticos, así como sus metabolitos. En matrices ambientales, los métodos analíticos se orientan más a la determinación de cannabinoides naturales principalmente en productos botánicos: flores, hojas, resina y semillas. Mientras que, en matrices alimenticias, se han desarrollado métodos analíticos para determinar la concentración de cannabinoides en aceite, bebidas, dulces, gomitas, cartuchos para vaporizadores, cigarros, y productos tópicos, entre las matrices menos estudiadas. Los analitos más estudiados en matrices alimenticias son:  $\Delta^9$ -THC, cannabidiol (CBD), ácido tetrahidrocannabinólico (THC-A), cannabinol (CBN, producto de degradación del THC) y cannabigerol (CBG, precursor biosintético de los cannabinoides).

En la **Figura 1**, se presentan las estructuras y propiedades fisicoquímicas del cannabidiol.



**Figura 1.** Estructura y propiedades fisicoquímicas del cannabidiol.

Como técnicas de preparación de muestra en materia de cannabinoides se han aplicado históricamente la extracción sólido-líquido (SLE), extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE), donde usaban grandes volúmenes de disolvente [13], [14], [15], [16]. Los disolventes más empleados para la extracción son metanol, etanol, acetonitrilo, triclorometano. Sin embargo, hoy en día, la tendencia es el desarrollo de metodologías verdes, como las técnicas miniaturizadas en las que se usa poco volumen de disolventes. En cuanto a la instrumentación analítica, la Cromatografía de Líquidos (LC) es la más utilizada, seguida por la Cromatografía de Gases (GC) y por último la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC). Dichos cromatógrafos se acoplan a detectores ultravioleta (UV), espectroscopia de masas (MS), arreglo de fotodiodos-espectroscopia de masas (PDA-MS), entre otros [13], [16].

A pesar de que en México hay una regulación restrictiva, se comercializan muchos productos derivados de la planta de *Cannabis sativa* L., cuya información de contenido en su etiqueta es deficiente o nula; y el proceso de elaboración no se describe. Tampoco describe los posibles efectos adversos ni los posibles impactos en la salud de las personas, mascotas y ambiente. En este contexto, es imperante la implementación de protocolos de preparación de muestra acopladas a técnicas de separación y detección de cannabinoides presentes en muestras de interés analítico que permitan, a su vez, ser utilizados como métodos de control de calidad y monitoreo. En este sentido, el objetivo del trabajo es plantear la metodología desarrollada para una muestra comercial de cigarro y su optimización mediante la implementación de dos diseños de experimentos factoriales fraccionados, uno al pretratamiento (extracción asistida por ultrasonido) y otro para el tratamiento de limpieza y preconcentración del extracto (microextracción asistida por ultrasonido).

## 2. Experimental

### 2.1. Reactivos y materiales

Estándar de cannabidiol (CBD) pureza superior a 99%. Todos los disolventes usados (agua ultrapura, acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), tolueno, n-hexano, 1-octanol, entre otros) fueron grado LC, con una pureza mayor a 99%. Se preparó una solución madre de 1000 mg/L semanalmente disolviendo el estándar de CBD en ACN, a partir de la cual, se preparó una solución de trabajo a 50 mg/L diluyendo la solución madre con ACN. Ambas soluciones se almacenaron protegidas de la luz a 4 °C. La solución de trabajo se utilizó para la optimización del método GC-FID.

Para el sistema cromatográfico se utilizaron gas nitrógeno, hidrógeno y aire. Para la preparación de la muestra se utilizaron diversos materiales como micro-jeringa de GC, material de vidrio, entre otros. Los cigarros de cáñamo Chief Stix del quimiotipo CBG+CBD con 1200 mg de CBD por cajetilla, se adquirieron de forma legal en Manzanillo, Colima.

## 2.2. Equipos

Balanza analítica CX220 de Citizen Scale (Metuchen, NJ, EE.UU.), baño ultrasónico Branson 5510 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT), horno de convección Venticell LSIK-B2V/VC55 (MMM Medcenter Enrich Tungen GmbH), molino de especias (Brando Moon), centrífuga LaboGene 1580R (LaboGene, Lyngby, Dinamarca), centrífuga Frontier FC5816 (OHAUS), sistema de purificación de agua Direct-Q 3 (Millipore, Billerica, MA), medidor de pH Orion 3 Star, placa de calentamiento y agitación digital Cimarec (ambos marca Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), baño de ultrasonido 2510-R-MTH (Branson 40 KHz), agitador vortex Genie 2 G560 (Scientific Industries), mortero de porcelana con pistilo, y micro-jeringa Hamilton Microliter 701N de 10  $\mu$ L con punta biselada (Hamilton Co, Reno, NE, EUA). Se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer GC acoplado a un detector de ionización de flama (FID). El control del sistema GC-FID y la adquisición de datos se realizaron por el software TotalChrom v6.3.4. Se utilizó la columna analítica HP-5MS (30 m, 0.25 mm d.i., 0.25  $\mu$ m de grosor de película).

## 2.3. Pretratamiento de la muestra

El material botánico del cigarro se debe de limpiar antes del tratamiento, para lo cual se eliminan las fibras para posteriormente pulverizar en un mortero con pistilo. Se pesan 0.5 g en un vial, se calienta a 140 °C por 30 min para descarboxilar los cannabinoides [17]. En seguida, se toman 50 mg y se realiza la extracción asistida por ultrasonido (UAE) con 3 mL de ACN durante 5 min a 30 °C. Posteriormente, se centrifuga a 8000 rpm por 1 min.

## 2.4. Tratamiento con microextracción en una sola gota (SDME)

Se prepara la solución donadora mezclando 2 mL del sobrenadante del pretratamiento con 8 mL de agua ultrapura en un tubo. Antes de iniciar el procedimiento, la microjeringa de un volumen de 10  $\mu$ L se lava cinco veces con tolueno (disolvente extractante o receptor). Posteriormente se introducen 2  $\mu$ L de tolueno en la micro-jeringa; la aguja se introduce a través del septo de la tapa del vial y se exponen 1.5  $\mu$ L por inmersión directa en solución donadora a una profundidad de 1cm. La inmersión se lleva a cabo durante 15 minutos, a temperatura ambiente y agitando a 500 rpm. Una vez finalizado el tiempo de extracción, la micro-gota se retrae en la micro-jeringa y se inyecta 1.0  $\mu$ L en el sistema GC-FID inmediatamente. Cada análisis de extracción de muestra se realizó por triplicado.

### 2.5. Análisis mediante GC-FID

El sistema cromatográfico GC-FID utiliza como gas acarreador nitrógeno a una presión constante de 30 psi. La temperatura del inyector se fija a 220 °C.

Para la formación de la llama del FID se emplea hidrógeno y aire a 50 mL/min y 450 mL/min, respectivamente.

Las condiciones de operación del FID se fijaron a una temperatura de 200 °C, rango de 1, offset de 0 y atenuación de 0. La separación se realiza en modo gradiente utilizando una rampa de temperatura que comienza en 150 °C, se mantiene durante 3 min y posteriormente se incrementa a 310 °C en una tasa de 30 °C/min, temperatura que se mantiene durante 1.67 min, dando como resultado un tiempo de análisis de 10 min.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Sistema de micro-extracción en una sola gota por inmersión directa (DI-SDME).

Previo a la optimización de la extracción por inmersión directa SDME se seleccionaron los disolventes para el sistema de preparación de muestras. Hay que tener en cuenta que la microextracción SDME involucra una fase donadora y una fase receptora.

Primero, la fase donadora proviene del extracto resultante del pretratamiento del cigarro de cáñamo Chief Stix mediante la extracción asistida por ultrasonido, en donde se probaron MeOH y ACN como agentes de extracción. Con este objetivo, se realizó la extracción asistida por ultrasonido (UAE) de 50mg de cigarro durante 5 min a 30 °C con 2 disolventes 3 mL de ACN y 3 mL de MeOH en dos tubos distintos. Posteriormente, ambos extractos se centrifugaron a 8000 rpm por 2.5 min. La preparación de la fase donadora consistió en tomar 2 mL de cada sobrenadante y añadir 8 mL de agua en dos matraces volumétricos distintos.

Enseguida, se determinó la velocidad de agitación más adecuada de ambas fases donadoras (MeOH/H<sub>2</sub>O y ACN/H<sub>2</sub>O) para DI-SDME mediante pruebas de homogeneización. Para lo cual, se agregó una gota de colorante alimenticio artificial como indicador y se registró el tiempo que tardó en distribuirse en todo el sistema en función de la velocidad de agitación. Se probaron 100, 200, 300, 400, 500 y 600 rpm y se determinó que a 500 rpm le tomaba 20s homogeneizarse. Es decir, en este tiempo la interacción de la fase donadora con la gota receptora será completa

Posteriormente, se evaluó la estabilidad de la fase receptora (volúmenes de gota de 1 y 1.5 µL) a una profundidad de 1 cm de inmersión en ambas fases donadoras (MeOH/H<sub>2</sub>O y ACN/H<sub>2</sub>O) a tres velocidades de agitación de 300, 400 y 500 rpm y 5 temperaturas diferentes: 15, 25, 30, 40 y 50 °C. Como fase receptora se compararon los disolventes: 1-hexanol, 1-octanol, tolueno, ciclohexano y nonano. En estas pruebas, se determinó que los disolventes más adecuados eran tolueno, nonano y ciclohexano con una gota de 1.5 µL, a las temperaturas 15-40 °C.

Tras el análisis mediante GC-FID de los microextractos con tolueno, nonano y ciclohexano con ambas fases donadoras y los diferentes disolventes receptores, se determinó que la mejor fase

donadora es la relación 2:8 de ACN/H<sub>2</sub>O y que la mejor fase receptora es el tolueno. Las condiciones de DI-SDME fueron: gota de 1.5  $\mu$ L, 15 min de agitación, 500 rpm y temperatura ambiente. Cabe mencionar que la microgota de ciclohexano fue inestable a tiempos mayores a 10 min, por lo que se descartó.

De acuerdo con la información del empaque de la muestra, al tomar 50 mg de cigarro la concentración de CBD en la fase donadora del sistema es de 343  $\mu$ g/mL.

### 3.2. Optimización del pretratamiento de muestra.

Como primer paso de la preparación de muestra de material botánico obtenido del cigarro de cáñamo Chief Stix, se realizó una extracción asistida por ultrasonido, ya que tiene la ventaja de agitar más eficientemente debido al efecto de cavitación. Para la optimización se desarrolló un diseño factorial fraccionado ( $3^{3-1}$ ) donde los factores evaluados fueron masa, proporción de los disolventes ACN y MeOH, y el tiempo de centrifugación. El diseño se realizó en tres niveles, siendo para la masa: 20, 50 y 100 mg de material botánico; para la proporción ACN/MeOH (v/v): 0:100, 50:50 y 100:0 y para el tiempo de centrifugación: 1, 3 y 5 min. Con lo cual se realizaron nueve experimentos y la variable de respuesta que se evaluó fue el área bajo el pico cromatográfico del cannabidiol. En la **Tabla 1** se presentan los experimentos del diseño y su respuesta en términos de señal obtenida (área) del CBD.

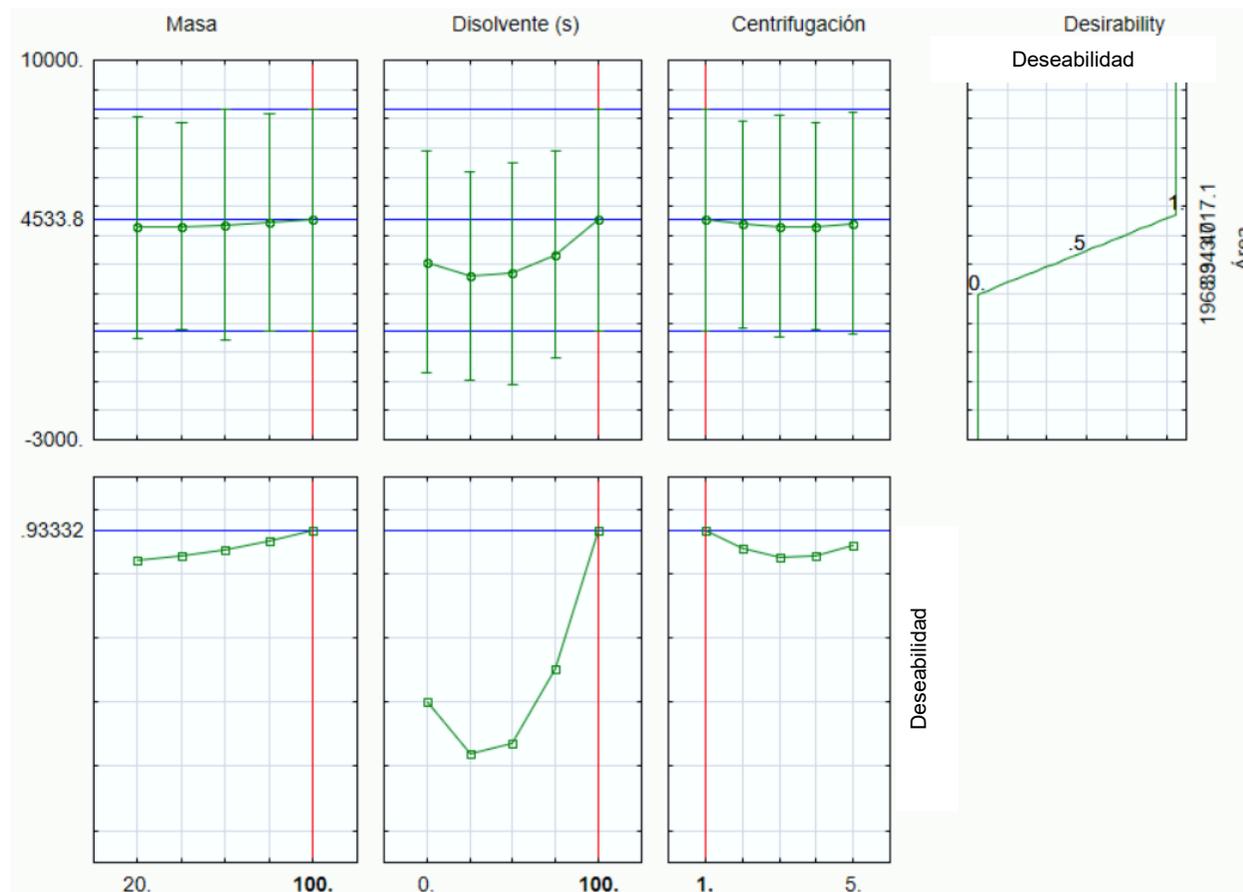
**Tabla 1.** Diseño de experimentos para el pretratamiento (UAE) del cigarro, área correspondiente al CBD.

Sistema	Masa mg	Disolvente ACN:MeOH	t <sub>centrif</sub> min	Señal de CBD (área)
1	20	0:100	1	2,503.24
2	20	50:50	5	1,968.89
3	20	100:0	3	4,717.05
4	50	0:100	5	3,416.75
5	50	50:50	3	1,984.66
6	50	100:0	1	3,987.32
7	100	0:100	3	2,499.22
8	100	50:50	1	3,381.24
9	100	100:0	5	4,087.74

A partir de la **Tabla 1**, se graficó la deseabilidad (**Figura 2**), donde se pueden observar los diagramas de deseabilidad de cada variable en función de su respuesta analítica (área). Según las cuales, es posible afirmar que entre mayor sea el porcentaje de ACN en el disolvente de

extracción, mayor es la deseabilidad, mientras que, la masa de cigarro y el tiempo de centrifugación no implican mayor efecto en la respuesta.

Adicionalmente, en la **Tabla 2**, se presentan las ecuaciones de deseabilidad de los gráficos de superficie obtenidos durante el pretratamiento de muestra (**Figura 3**). De acuerdo con la gráfica de superficie correspondiente a la masa vs. el disolvente, las variables con mayor deseabilidad son 100 mg de masa y 100% ACN como extractante en UAE.

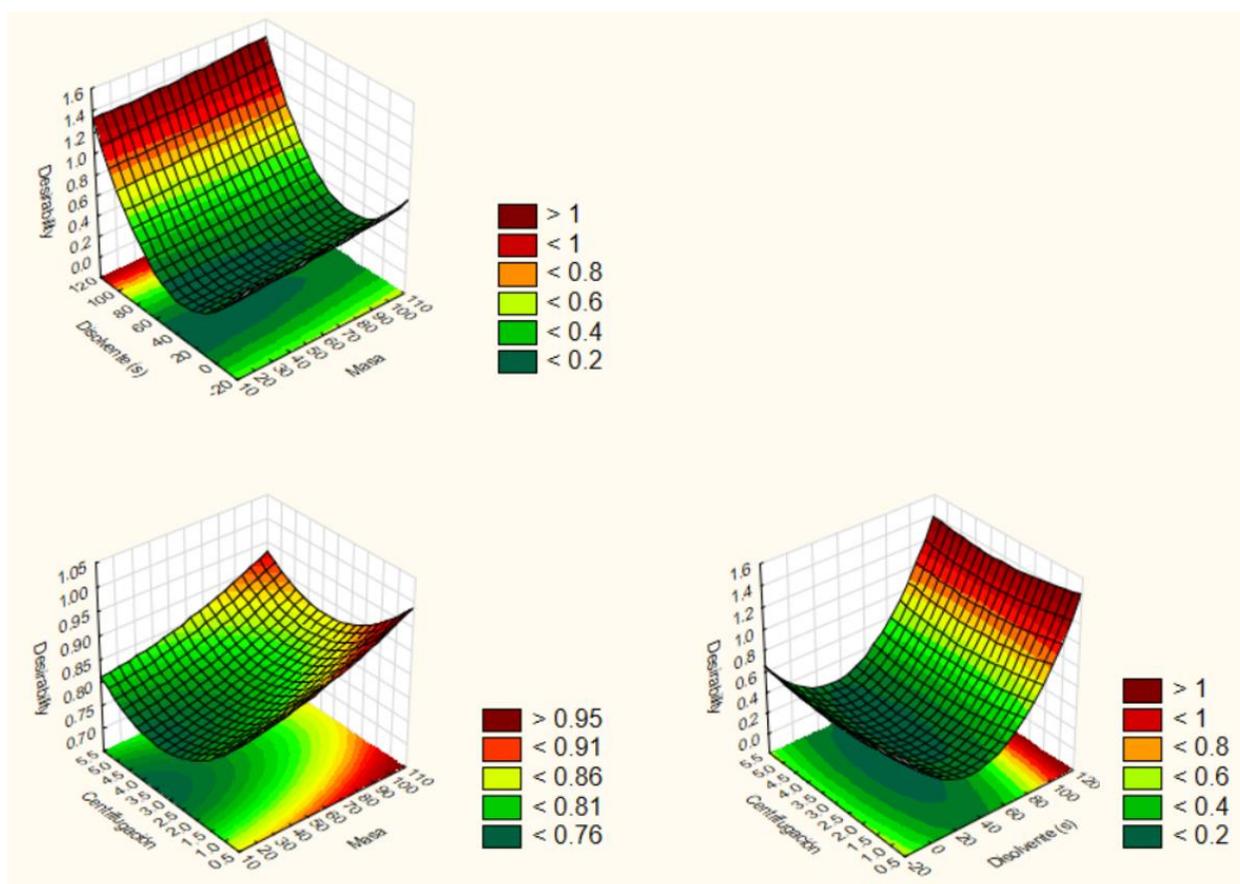


**Figura 2.** Diagramas de deseabilidad vs factores (masa, proporción ACN/MeOH y tiempo de centrifugación).

Por otro lado, en el gráfico de tiempo de centrifugación con respecto al disolvente, las variables más adecuadas son 100% ACN y el tiempo de centrifugación no representa un efecto importante sobre la respuesta.

**Tabla 2.** Ecuaciones de deseabilidad de los factores evaluados durante el pretratamiento de muestra.

Factor 1 (x)	Factor 2 (y)	Ecuación de deseabilidad (D)
Masa	Disolvente	$D = 0.023 x^2 + 0.3967 y^2 + 4e^{-9} xy + 0.0472 x + 0.2652 y + 0.2011$
Masa	Centrifugación	$D = 0.023 x^2 + 0.0572 y^2 - 1.7764e^{-17} xy + 0.0472 x - 0.0242 y + 0.7817$
Disolvente	Centrifugación	$D = 0.3967 x^2 + 0.0572 y^2 - 8e^{-9} xy + 0.2652 x - 0.0242 y + 0.19$



**Figura 3.** Gráficos de superficie de respuesta del pretratamiento de muestra: deseabilidad vs factores.

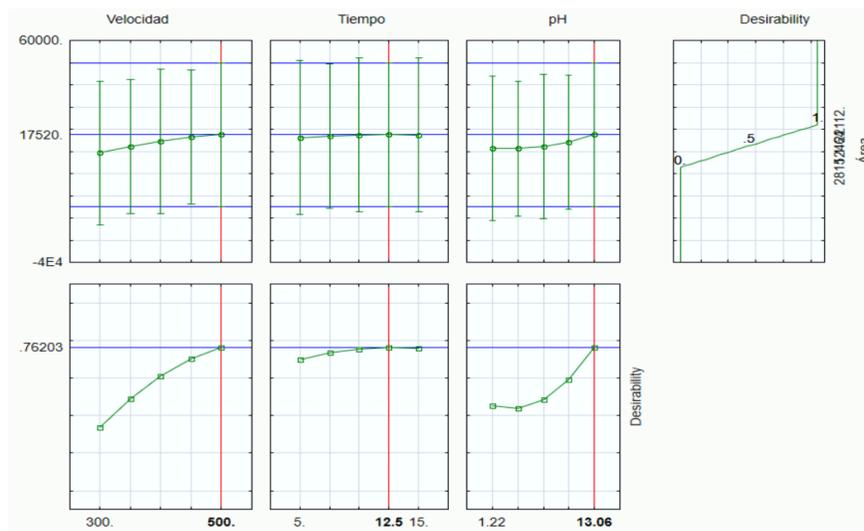
Finalmente, en el gráfico de superficie de las variables tiempo de centrifugación vs masa, lo más adecuado es emplear un tiempo de centrifugación bajo y la masa de 100 mg. Sin embargo, las fases donadoras incrementaron su turbidez al aumentar la cantidad de masa.

Se decidió emplear 20 mg de muestra dado que, si observamos la **Tabla 1**, el sistema 3 con 20 mg de masa y 100% ACN obtuvo la mayor respuesta (área). Además, a mayor cantidad de masa, mayor turbidez en la fase donadora DI-SDME, lo cual dificulta la visualización y recuperación de la gota para su posterior inyección.

De esta forma, las condiciones óptimas para la extracción fueron: 20 mg de masa, 100% ACN como agente de extracción y 1 min de centrifugación.

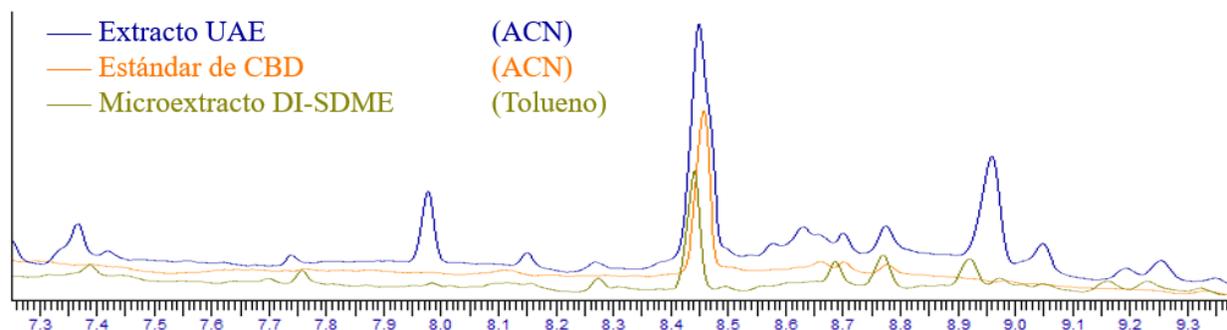
### 3.3. Optimización de la microextracción DI-SDME

El sobrenadante resultante de la extracción asistida por ultrasonido de 20 mg de cigarro (CBD a 137  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se utilizó para realizar la optimización de la micro-extracción en una sola gota por inmersión directa (DI-SDME) aplicando un diseño de experimentos factorial fraccionado en tres niveles. Dichos factores fueron: velocidad de agitación (300, 400 y 500 rpm), tiempo de extracción (5, 10 y 15 min) y pH del sistema (1, sin ajuste y 13). Como factor de respuesta se utilizó el área bajo el pico cromatográfico del CBD. De igual forma, se graficó la deseabilidad con los resultados, la cual se presenta en la **Figura 4**, donde se pueden observar las condiciones más deseables para cada factor. Con base en la respuesta para cada factor en los tres niveles, es posible afirmar que entre mayor sea la velocidad de agitación y el pH, mayor es la deseabilidad, mientras que el tiempo de extracción no implica mayor efecto en la respuesta.



**Figura 4.** Diagramas de deseabilidad vs factores (velocidad de agitación, tiempo de extracción y pH del sistema) del diseño factorial fraccionado.

Tomando en cuenta que el CBD es una especie ácida ( $pK_a = 9.43$ ) [18] y que el pH óptimo es básico, existe la liberación de un  $H^+$  de su estructura, lo que hace que se vuelva inestable y prefiera migrar a la fase receptora (tolueno). Adicionalmente, un tiempo de agitación mayor, favorece la saturación de la gota, y la tasa de agitación óptima permite su estabilidad. Es decir, si se empleara una velocidad de agitación mayor, la gota se desprendería de la microjeringa imposibilitando su recuperación e inyección.



**Figura 5.** Cromatogramas obtenidos en cada etapa del tratamiento del cigarro. Tiempo de retención de CBD de 8.4 minutos.

En la **Figura 5** se muestran los cromatogramas obtenidos con el extracto después del tratamiento con ultrasonido, el correspondiente a la solución de trabajo y el obtenido a partir del microextracto con tolueno en las condiciones óptimas. Finalmente, las condiciones óptimas para la DI-SDME fueron: 500 rpm, tiempo de inmersión de 15 min y pH de 13.

#### 4. Conclusiones

En este estudio, se establecieron las condiciones óptimas para el pretratamiento de muestra mediante extracción asistida por ultrasonido, y para la técnica de limpieza y preconcentración de microextracción en una sola gota por inmersión directa. Para lo cual, se usaron dos diseños de experimentos factoriales fraccionados  $3^{3-1}$  con un total de 18 experimentos (9 cada uno).

Las condiciones óptimas de extracción asistida por ultrasonido son 20 mg de muestra, 100% ACN como disolvente de extracción y 1 min de centrifugación. Respecto a la microextracción en una sola gota por inmersión directa, el sistema 2:8 ACN/ $H_2O$  es el más adecuado como fase donadora y tolueno el disolvente más adecuado como fase receptora. De igual forma, las condiciones óptimas para DI-SDME son velocidad de 500 rpm, tiempo de inmersión de 12.5 min y pH 13.

Estas condiciones no solo mejoran la eficacia del proceso de DI-SDME, sino que también proporcionan un marco sólido para futuras investigaciones en esta área. La implementación de estos parámetros puede contribuir a avances en la detección y análisis de CBD en diversas aplicaciones en química analítica.

## 5. Agradecimientos

La autora IJR agradece al CONACHyT la beca de posgrado otorgada para cursar el Doctorado Directo en Ciencias Químicas de la Universidad de Colima.

## 6. Referencias

- [1] L. O. Hanuš, S. M. Meyer, E. Muñoz, O. Tagliabatella-Scafati, and G. Appendino, "Phytocannabinoids: a unified critical inventory," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 33, no. 12, pp. 1357–1392, 2016, doi: 10.1039/C6NP00074F.
- [2] <https://eol.org/pages/594919> Consultado el 23 de febrero de 2023.
- [3] <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cannabaceae/cannabis-sativa/fichas/ficha.htm> Consultado el 23 de febrero de 2023.
- [4] C. L. Schoch *et al.*, "NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools," *Database*, vol. 2020, p. baaa062, Jan. 2020, doi: 10.1093/database/baaa062.
- [5] J. L. Bautista, S. Yu, and L. Tian, "Flavonoids in Cannabis sativa: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology," *ACS Omega*, vol. 6, no. 8, pp. 5119–5123, Mar. 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c00318.
- [6] <https://cannabispopular.com/educacion/cultivo/de-que-le-sirven-los-cannabinoides-a-la-planta/> Consultado el 24 de febrero de 2023.
- [7] R. Deidda, "Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, p. 10, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.032>.
- [8] B. A. Potter, *Terpenes: The Magic in Cannabis*. Ronin Publishing, 2019.
- [9] B. F. Thomas and M. A. ElSohly, *The analytical chemistry of cannabis: quality assessment, assurance, and regulation of medicinal marijuana and cannabinoid preparations*. in Emerging issues in analytical chemistry. Amsterdam ; Boston: Elsevier/RTI International, 2016.
- [10] <https://www.economista.com.mx/arteseideas/Que-productos-de-cannabis-libero-la-Cofepris-y-cual-es-su-uso-20181126-0052.html> Consultado el 29 de octubre de 2021.
- [11] <https://www.publico.es/internacional/marihuana-mapa-mundial-cannabis-paises-han-acometido-regulacion.html> Consultado el 29 de octubre de 2021.
- [12] Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, "Ley General de Salud," p. 466, Feb. 1984.
- [13] C. Citti, D. Braghiroli, M. A. Vandelli, and G. Cannazza, "Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 565–579, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.003.
- [14] S. Erridge, N. Mangal, O. Salazar, B. Pacchetti, and M. H. Sodergren, "Cannflavins – From plant to patient: A scoping review," *Fitoterapia*, vol. 146, p. 104712, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.fitote.2020.104712.

- [15] L. Nahar, S. J. Uddin, Md. A. Alam, and S. D. Sarker, "Extraction of naturally occurring cannabinoids: an update," *Phytochem. Anal.*, vol. 32, no. 3, pp. 228–241, May 2021, doi: 10.1002/pca.2987.
- [16] A. J. Pandopulos *et al.*, "Towards an efficient method for the extraction and analysis of cannabinoids in wastewater," *Talanta*, vol. 217, p. 121034, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121034.
- [17] M. Wang *et al.*, "Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry," *Cannabis Cannabinoid Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 262–271, Dec. 2016, doi: 10.1089/can.2016.0020.
- [18] J. Vacek *et al.*, "Antioxidant function of phytocannabinoids: Molecular basis of their stability and cytoprotective properties under UV-irradiation," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 164, pp. 258–270, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.012.