ISSN Impreso: 1810-634X
ISSN on line. : 2309-8740

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL CONTINUA

Volumen 90 Nº 2
ABRIL - JUNIO 2024

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
(Rev Soc Quím Perú)
ISSN impreso: 1810-634X
ISSN on line: 2309-8740
Revista Trimestral

COMITÉ EDITOR

Presidenta : Ana Cecilia Valderrama Negrón
Editor en Jefe : Hugo Alarcón Cavero
Miembros : Julio Santiago Contreras
Julio Ruiz Quiróz

COMITÉ CONSULTIVO

Dr. Hugo Arturo Alarcón Cavero
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Jacinto Hernández, Christian Ronald
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Olivio Nino Castro Mandujano
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Juan Montes de Oca Ávalos
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Mario Ceroni Galloso
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Julio Santiago Contreras
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Juan Dávalos Prado
Instituto de Química-Física "Rocasolano"
España

Dra. Ana Valderrama Negrón
Universidad Nacional de Ingeniería

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex
Sede: Av. Nicolás de Aranibar 696 Santa Beatriz – Lima 01
Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú
Teléfono (511) 960 189 928
e-mail: sqperu@gmail.com
Portal web: www.sqperu.org.pe
Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú
Certificado N 95-1567

Vol 90 **ABRIL – JUNIO 2024** **N° 2**

En el Perú: N° suelto S/ 15 Suscripción anual: S/ 60.00 En el extranjero suscripción anual: US $ 50

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(Marzo 2024 – Marzo 2026)

Presidente	:	Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón
Vicepresidente	:	Dr. Mario Ceroni Galloso
Secretario	:	Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga
Director Administrativo	:	Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
Tesorero	:	Dr. Christian Ronald Jacinto Hernández
Vocales	:	Mg. Elizabeth Deza Marti
		Dra. Santos Haydeé Chávez Orellana
		Mg. José Gonzalo Beretta Enciso
		Dr. Juan José León Cam
		Dra. Mercedes Puca Pacheco
		Mg. Norma Amparo Cuizano Vargas

Comisión de Economía y Finanzas
Presidente: Dr. Juan José León Cam

Comisión de Publicaciones
Presidente: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científcas
Presidente: Dr. Juan Manuel Parreño Tipián

INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

CONTENIDO
(Vol. 90 – N° 2 – 2024)

- Composición Química, actividad antioxidante y anti - *Candida Albicans* de aceite esencial de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", por Norma Ramos Cevallos, Américo Castro Luna, Felix Castillo Morales, Lourdes Victoria Tinoco, Sixto Gonzáles Elera, Mario Alcarraz Curi, Arcadio Zuñiga Santi, Nicole Arquinigo Bazan, Diana Victorio Cruz, Diana Chavez Rojas, Yahaira Tapia Burga. Págs. 52 - 61

- Develando el potencial de *Chlorella sp.* para la eliminación de BTEX: un enfoque innovador para la biorremediación, por Brenda Kristell Nuñez Mork, Brenda Tatiana Nuñez Lozada, Edilberto Vicente Medina Cabrera, Ricardo Alonso Abril Ramírez, Tiffanny Lynne Vincent Lozano, Joshelyn Mariangela Paredes Zavala, Jaime Dante Cárdenas García. Págs. 62 - 79

- Influencia de la cobertura vegetal en la calidad del agua de la cuenca Mantaro, Perú por Katheryne Priscilla Zambrano Delgadillo, Manuel Alfredo Ñique Alvarez, Elvis Anthony Medina Dionicio. Págs. 80 - 94

- Predicción del coeficiente de partición de sideróforos usando redes neuronales artificiales, por Jesús Alvarado _ Huayhuaz, Miquéias Amorim Santos Silva, Karina dos Satos Machado, Ana Cecilia Valderrama Negrón. Págs. 95 - 104

- Síntesis y caracterización de polímeros telequelicos de 2 – oxazolinas, por Juan Carlos Rueda, Hellyn Gudiel Honores. Pags. 105 - 117

- Informaciones

Revista Arbitrada

Derechos reservados: Prohibido el uso total o parcial del material de esta revista sin indicar la fuente de origen.

Nota: Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta preferentemente los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como, los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las "Instrucciones para los autores", la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación, pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

Los artículos de investigación son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

Las comunicaciones cortas son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidos a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

Las cartas al editor son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

Los trabajos de revisión se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

Los artículos de enseñanza de la química son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad.

Las notas informativas corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos al correo electrónico revsqperu@gmail.com a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 soles (autores nacionales) ó 30 dólares (autores extranjeros) por concepto de gastos administrativos (por revisión del artículo), como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago de las siguientes sumas:
Cuando todos los autores son socios: S/ 120.00
Cuando todos los autores no son socios: S/ 200.00
Si entre los autores hay socios y no socios: S/ 150.00
Si los autores residen en el extranjero US $ 110.00

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, S/ 30.00 por cada autor en exceso.

Si el trabajo es enviado del extranjero, será US $ 15.00 más por cada autor en exceso.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará después de la segunda, un mínimo de S/ 30.00.

The publication of each work is subject to payment of the following ones:
When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/ 120.00
When all the authors are not partners: S/ 200.00
If among the authors there are partners and non partners: S/ 150.00
If the authors reside abroad US $ 110.00

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US $ 15.00 for each author in excess.

Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico revsqp@gmail.com

El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 1 1/2, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción "justificar"). Los decimales deben llevar coma.

Los idiomas de publicación son español e inglés.

El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico después de la dirección postal completa de su institución.

Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (Abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con tamaño de fuente 12 y en negrita.).

Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos de género y especie van en cursiva (itálica).

El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.

Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábiga seguido de punto. A continuación, se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.

Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.

Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (http://www.cas.org/sent.html) y List of Journals Indexed in Index Medicus, (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

DOI 10.37761/rsqp.v90i2.464

Recibido: 20.11.24
Aceptado: 25.11.24

COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTI-*Candida albicans* DE ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano"

Norma Ramos Cevallos[*a], Américo Castro Luna[a], Felix Castillo Morales[a], Lourdes Victoria Tinoco[a], Sixto Gonzáles Elera[a], Mario Alcarraz Curi[b], Arcadio Zuñiga Santi[a], Nicole Arquinigo Bazan[a], Diana Victorio Cruz[a], Diana Chavez Rojas[a], Yahaira Tapia Burga[a]

RESUMEN

Introducción. - El "nogal peruano" es un árbol grande distribuido en varias regiones del Perú, principalmente en áreas de bosques secundarios tardíos y maduros. Las especies proveedoras de aceites esenciales antioxidantes son consideradas valiosas para aplicaciones en el área de la salud. Los aceites esenciales con diversos constituyentes muestran efectos sinérgicos y pueden ser una alternativa eficaz para prevenir enfermedades.
Objetivos. - Evaluar la composición química, actividad antioxidante y anti-C*andida albicans* del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels.
Materiales y métodos. - Se obtuvo el aceite esencial mediante una destilación por arrastre de vapor de agua. Se analizó su composición química por un análisis GC-MS y se evaluó su actividad antioxidante según los métodos de DPPH• y ABTS•+. Además, se determinó su actividad anti-Candida albicans, adaptando protocolos, utilizando ketoconazol como referencia. Se diluyó el aceite en DMSO y se incubó con C*andida albicans*, midiendo el crecimiento mediante lecturas a las 24 horas en microplacas de 96 pocillos.
Resultados. - El análisis de la composición química por GS-MS reveló la presencia de compuestos como el fitol, α-pineno, α-caryophyllene, copaeno y D-limoneno. Según el método DPPH•, el aceite esencial mostró un IC_{50} de 52,25 ul/ml. Con el método ABTS•+ el IC_{50} fue de 34,65 ul/ml. Sin embargo, no se observó actividad anti-*Candida albicans*.
Conclusiones. - Los compuestos químicos de mayor importancia del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels fueron el α-pineno, D-limoneno y Copaeno. Además, presentó una actividad antioxidante regular y una nula actividad anti-*Candida albicans*.

Palabras clave: antioxidantes, *Candida albicans*, aceites volátiles, *Juglans*, antifúngicos, fitoquímicos.

[a] Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno N.° 1002, Lima, Perú.
[b] Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Av. Germán Amézaga Nº 375 N.° 15081, Lima, Perú. *Autor de correspondencia: nramosc@unmsm.edu.pe

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTI-C*andida albicans* ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM THE LEAVES OF *Juglans neotropica* Diels "peruvian walnut".

ABSTRACT

Introduction. - The "nogal peruano" is a large tree distributed in several regions of Peru, mainly in areas of late secondary and mature forests. Species supplying antioxidant essential oils are considered valuable for health applications. Essential oils with various constituents show synergistic effects and can be an effective alternative to prevent diseases.
Objectives. - To evaluate the chemical composition, antioxidant and anti-*Candida albicans* activity of the essential oil of *Juglans neotropica* Diels leaves.
Materials and methods. - The essential oil was obtained by steam distillation. Its chemical composition was analyzed by GC-MS analysis and its antioxidant activity was evaluated according to DPPH• and ABTS•+ methods. In addition, its anti-*Candida albicans* activity was determined, adapting protocols, using ketoconazole as a reference. The oil was diluted in DMSO and incubated with Candida albicans, measuring growth by 24-hour readings in 96-well microplates.
Results. - Chemical composition analysis by GS-MS revealed the presence of compounds such as phytol, α-pinene, α-caryophyllene, copaene and D-limonene. According to the DPPH• method, the essential oil showed an IC50 of 52.25 ul/ml. With the ABTS•+ method the IC50 was 34.65 ul/ml. However, no anti-*Candida albicans* activity was observed.
Conclusion. - The most important chemical compounds of the essential oil of *Juglans neotropica* Diels leaves were α-pinene, D-limonene and Copaene. In addition, it presented regular antioxidant activity and null anti-*Candida albicans* activity.

Key words: antioxidants, *Candida albicans*, oils volatile, *Juglans*, antifungal agents, phytochemicals.

INTRODUCCIÓN

El "nogal peruano" (*Juglans neotropica* Diels) es un árbol de gran tamaño, con un tronco recto y cilíndrico, que puede alcanzar hasta 35 metros de altura y tener un diámetro de entre 30 y 120 centímetros. En el Perú, se encuentra distribuido en varias regiones, incluyendo Amazonas, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Junín, La Libertad, Lambayeque, Cerro de Pasco y desde altitudes de 500 hasta 3300 metros sobre el nivel del mar, principalmente en áreas de bosques secundarios tardíos y maduros [1,2].
Las especies proveedoras de aceites esenciales con actividad antioxidante se consideran como fuentes potenciales para el descubrimiento y desarrollo de compuestos activos con aplicaciones médicas, farmacéuticas y cosméticas. Tienen una gran ventaja sobre los antioxidantes sintéticos que se sospecha sean nocivos para la salud [3]. Actualmente existe

un gran interés en el diseño y desarrollo de formulaciones innovadoras que incluyen estos aceites esenciales.

Los aceites esenciales pueden contener más de 50 constituyentes en su composición química y sus evaluaciones in vitro e in vivo están asociadas a los efectos sinérgicos resultantes [4]. Se ha demostrado que los aceites esenciales ricos en fenoles como el eugenol y timol exhiben un buen potencial antioxidante en los sistemas biológicos, a comparación de los no fenólicos [5]. Por esta razón, los aceites esenciales pueden ser alternativa eficaz para prevenir la auto oxidación, mantener el equilibrio endógeno entre los antioxidantes y la generación de radicales libres, y así revertir y mejorar las enfermedades degenerativas [6].

El contenido de compuestos bioactivos en las plantas es dependiente del ambiente y manera en la que se desarrolló; estos factores afectan en gran medida sus compuestos químicos y por ende sus propiedades medicinales [7]. El objetivo del presente trabajo es evaluar la composición química, actividad antioxidante y anti-*Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta y tratamiento de las muestras

Las hojas de *Juglans neotropica* Diels fueron adquiridas en el distrito de Chachapoyas, departamento de Amazonas, Perú. El proceso de recolección tuvo lugar a principios del año 2023. Posteriormente, las hojas se dejaron al aire libre, expuestas directamente a la luz solar, con el fin de llevar a cabo su secado.

Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de las hojas de *Juglans neotropica* Diels se obtuvo utilizando un destilador semi industrial de acero inoxidable que funcionaba con vapor de agua. Cada destilación se llevó a cabo con una cantidad de 6 Kg de material, y en total se procesaron 13 kg de materia vegetal seca. El rendimiento final fue de 0,03 % v/p de aceite esencial de *Juglans neotropica* Diels.

Determinación de la composición química

La composición química del aceite esencial extraído de las hojas de *Juglans neotropica* Diels fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando el equipo GC Thermo Finnigan, TRACE-MS Cuadrupolo con el método de inyección líquida. Se empleó una columna capilar RESTEK 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane, 30 m x 0,25 mm x 0,25 um a una temperatura inicial de 80 °C. La velocidad de flujo utilizada fue de 1 ml/min, y se utilizó helio como gas de arrastre. Para la identificación de los compuestos químicos volátiles presentes en la muestra, se compararon los tiempos de retención y los datos espectrales con la librería NIST 2014.

Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)

Se desarrolló la metodología propuesta por Blois [8], a partir de una solución stock al 40 % de 2,2-Difenil-1-Picril Hidrazilo se preparó una solución de trabajo en el rango de 0,6

a 0,7 de absorbancia. Este radical cromóforo de color violeta es estable, y cuando es reducido a hidracina se decolora a amarillo pálido a una longitud de onda de 517 nm. Este radical diluido se enfrentó con las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ul/ml de aceite esencial *Juglans neotropica* Diels.

Determinación de la actividad antioxidante in vitro por el método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)- 6-sulfónico (ABTS•+)

Se desarrolló la metodología de Re [9], la cual utiliza al radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, 2,2'-azinobis (3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico), cromóforo azul-verdoso, que es inhibido a una longitud de onda de 734 nm por compuestos antioxidantes. Se preparó una solución de trabajo a partir de 3,92 mg/ml del radical $ABTS^{\bullet+}$ hasta llegar al rango de 0,680 - 0,720 de absorbancia. Este radical diluido se enfrentó con las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ul/ml de aceite esencial *Juglans neotropica* Diels.

Determinación de la actividad anti-*Candida albicans*

Se realizó una prueba de microdilución cuantitativa de la muestra del aceite esencial de *Juglans neotropica* Diels, para determinar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento de *Candida albicans* siguiendo los protocolos modificados de Liu *et al.* en 2007 [10]. Se diluyó el aceite esencial en DMSO, adaptando el esquema de diluciones de drogas insolubles en agua de los protocolos CLSI M27-A2 [11] en un rango de 0,078125 y 40 ul/ml. Se usó como antifúngico de referencia al ketoconazol en concentraciones entre 0.0313 y 16 ug/ml. La cepa de *Candida albicans* fue inoculada en agar dextrosa Sabouraud a 37°C, para luego diluir en solución salina al 0,85% hasta obtener 1,5 x 10^6 UFC/ml. Se usó microplacas de 96 pocillos, en cada pocillo se colocó 100 ul de la muestra o referencia y 100 ul de inóculo con indicador de resazurina 20 mg/ml y se realizó la lectura 24 horas después a una incubación de 37°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la composición química

El análisis cromatográfico de gases acoplado a espectrometría de masa reveló la presencia de diversos compuestos de interés como lo es el fitol, α-pineno, copaeno, α-caryophyllene, Germacrene D, entre otros. Cada compuesto presentó un tiempo de retención característico que se puede apreciar en la Tabla 1.

La composición química del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels destaca la presencia de α-pineno, α-caryophyllene y D-limoneno, los cuales son característicos en el género *Juglans* [12,13], además, se encontró la presencia de α-Muuralene, ɣ-Muuralene y Germacrene D compuestos sesquiterpénicos estudiados gracias a su potencial antimicrobiano y antifúngico [14].

Tabla 1. Datos cromatográficos de los compuestos químicos del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels

Componente	Tiempo de retención
α-pineno	1,02
D-limoneno	1,13
Copaeno	1,99
Copaeno	2,13
Biciclo[7.2.0]undec-4-eno,4,11,11-trimetil-8-metilen-, (1R,4Z,9S)-	2,35
α-caryophyllene	2,47
ɣ-Muuralene	2,54
Germacrene D	2,61
alpha-muurolene (naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S,4aS,8aR)-)	2,64
Cis-asarone	2,88
Spathulenol	3,03
Aromadendrene oxide (2)	3,32
Phytol	5,25

Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH•)

El aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una actividad antioxidante alta según el método DPPH• en un rango de 10 y 50 ul/ml con un porcentaje de inhibición de radicales libres del 14,26% y 48,18% respectivamente como se puede apreciar en la Tabla 2.

La actividad antioxidante de los radicales libres depende de la estructura química y de la cantidad de los componentes químicos que poseen los aceites esenciales, uno de ellos son los compuestos dadores de hidrógeno y electrones [15]. Uno de los componentes identificados por el análisis GC/MS, es el fitol, un diterpeno de los alcoholes cíclicos insaturados, que por la presencia de un doble enlace no conjugado no es un excelente dador de electrones, no obstante, es considerado un precursor de filoquinonas y tocoferoles los cuales son compuestos con gran capacidad antioxidante [16], además, el grupo hidroxilo del fitol podría estabilizar algunos radicales libres [17]. Algunos autores sugieren que el fitol en un medio lipofílico puede tener acción más inhibidora [18], una característica de los aceites esenciales es que la mayoría son solubles en alcoholes.

Tabla 2. Captación de radical libre DPPH• del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels

Juglans neotropica **Diels (µL /ml)**	**Prom. Abs**	**%Inhibición DPPH•**
0	0,4207	0,00
10	0,3607	14,26
20	0,3150	25,12
30	0,2817	33,04
40	0,2407	42,79
50	0,2180	48,18
	IC 50 = 52,25 ul/ml	

El copano ha sido un componente químico de otros aceites esenciales, los cuales han presentado en los métodos in vitro actividad antioxidante distantes a la de los estándares como el trolox y ácido ascórbico [19]. En un aislamiento de α-pineno ha presentado un valor de IC50 = 310 ug/ml en el método DPPH• [20], lo cual indicaría y le estaría otorgando al aceite esencial un poder antioxidante muy inferior al estándar Trolox. En otras investigación el trolox ha presentado ABTS y DPPH inhibición del radical, tres veces mejor que el D-limoneno ha presentado en el método [21].

Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de captación del radical acido 2,2'-azinobis (3-etilbezotiazolin)- 6-sulfonico (ABTS•+)

El aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una actividad antioxidante alta según el método ABTS•+ en un rango de 10 y 50 ul/ml con un porcentaje de inhibición de radicales libres del 22,50% y 63,03% respectivamente como se puede apreciar en la Tabla 3.

Los IC50 obtenidos fueron de 52,25 ul/ml y 34,65 ul/ml de aceite esencial *Juglans neotropica* Diels en los métodos DPPH• y ABTS•+, respectivamente. El estándar trolox presentó IC50 de 2,0219 x 10^{-3} ul/ml en el método DPPH• y 2,649 x 10^{-3} ul/ml en ABTS•+, lo cual indica que el aceite esencial de *Juglans neotropica* Diels si posee actividad antioxidante pero muy inferior al estándar. Los resultados de la presente investigación en ambos métodos muestra mejor inhibición del radical ABTS•+, este radical tiene mayor afinidad en los medios de reacción hidrofílicos y lipofílico, a diferencia del DPPH• caracterizado por el medio lipofílico [22]. Es importante resaltar que

los compuestos bioactivos en conjunto pueden presentar acción sinérgica o antagónica, lo cual influye en la actividad inhibitoria de radicales libres [23].

Tabla 3. Captación de radical catiónico ABTS•+ del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels

***Juglans neotropica* Diels (µL /ml)**	**Prom. Abs**	**%Inhibición ABTS$^{\bullet+}$**
0	0,659	0,0000
10	0,5107	22,5038
20	0,3941	40,1973
30	0,3365	48,9378
40	0,2899	56,0091
50	0,2436	63,0349
IC 50 = 34,65 ul/ml		

Determinación de la actividad anti-*Candida albicans*

El aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una concentración mínima inhibitoria (CMI) de > 40 ul/ml a las 24 y 48 horas según la Tabla 4 por lo que no se considera que tenga una actividad anti-*Candida albicans* en las concentraciones ensayadas.

Tabla 4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de hojas de *Junglans neotropicans* Diels frente a *Candida albicans*

Tratamiento	***C. albicans* (24 h)**	***C. albicans* (48 h)**
Ceite esencial de *J. neotropicans* Diels	> 40 ul/ml	> 40 ul/ml
Ketoconazol	2 ug/ml	8 ug/ml

El aceite esencial de las hojas de *Juglans neotropica* Diels presentó un CMI de > 40 ul/ml a las 24 y 48 horas. por lo que se concluye que no tiene actividad anti-*Candida albicans* en las concentraciones ensayadas. El control ketoconazol también disminuyó su valor de CMI de 2 a 8 ul/ml, lo cual denota una actividad fungistática y no fungicida. Autores como Omar *et al*. (2001) estudiaron en Colombia la corteza de 14 árboles usados

tradicionalmente para tratar infecciones cutáneas en búsqueda de nuevos antifúngicos, el extracto de corteza de árbol de *Juglans neotropica* Diels presentó una actividad anti-*Candida albicans* mínima, mientras que el extracto de corteza de árbol de *Juglans cinerea* tuvo el espectro más amplio de actividades contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* de una magnitud más considerable [24]. Reynaldo *et al*. (2021) realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels en Perú, determinaron un baja actividades contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo, se deduce que la poca actividad que presenta es gracias a los hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados como el D-limoneno [25]. Otros estudios afirman la baja actividad del aceite esencial de hojas del género *Juglans* frente a *Staphylococcus epidermidis* (15,62 ug/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (31,25 ug/ml) y *Staphylococcus aureus* (15,62 ug/ml) y *Candida albicans (> 40 ul/ml)* [26,27].

CONCLUSIONES

Se logró evaluar la composición química del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels, siendo los compuestos de mayor importancia el α-pineno, D-limoneno y Copaeno; debido a que son característicos de la especie y con gran potencial antioxidante. La actividad antioxidante del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels se evaluó mediante los métodos DPPH• y ABTS•+ obteniendo un IC50 de 52,25 uL/mL y 34,65 uL/mL, respectivamente, evidenciando una alta capacidad antioxidante del aceite. Finalmente, la actividad anti-*Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Juglans neotropica* Diels exhibió una concentración mínima inhibitoria (CMI) de >40 uL/mL a las 24 y 48 horas, por lo tanto se evidencia una actividad nula de las concentraciones ensayadas.

AGRADECIMIENTO

Agradecer al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales ¨Juan de Dios Guevara¨ y al Grupo de Investigación Recursos Naturales ¨RENATU¨ por brindar los laboratorios y equipos necesarios para realizar la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramírez F, Kallarackal J. The phenology of the endangered Nogal (*Juglans neotropica* Diels) in Bogota and its conservation implications in the urban forest. Urban Ecosyst. 2021;24(6):1327-1342.
2. Reynel C, Marcelo J. Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos. Manual de Identificación de Especies. Serie Investigación y Sistematización N°9. Lima: Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION. 2009.
3. Tit DM, Bungau SG. Antioxidant Activity of Essential Oils. Antioxidants. 2023;12(2):10-3. doi: 10.3390/antiox12020383.
4. Do Nascimento LD, de Moraes AAB, da Costa KS, Galúcio JMP, Taube PS, Costa Cml, et al. Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils

from spice plants: New findings and potential applications. Biomolecules. 2020;10(7):998. doi: 10.3390/biom10070988.
5. Chen X, Shang S, Yan F, Jiang H, Zhao G, Tian S, et al. Antioxidant Activities of Essential Oils and Their Major Components in Scavenging Free Radicals, Inhibiting Lipid Oxidation and Reducing Cellular Oxidative Stress. Molecules. 2023;28(11):4559. doi: 10.3390/molecules28114559.
6. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. J Agric Food Chem. 2013;61(46):10835-47.
7. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53(10):4290-302.
8. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181(4617):1199-200.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 2007;26(9/10):1231-7.
10. Liu M, Seidel V, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeast. Methods. 2007; 42: 325-329.
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSIdocument M38-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2008.
12. Panth N, Paudel KR, Karki R. Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia*. J Integr Med. 2016;14(5):359-373.
13. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICFR, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem Toxicol. 2007;45(11):2287-2295.
14. St-Gelais A, Mathieu M, Levasseur V, Ovando JF, Escamilla R, Marceau H. Preisocalamendiol, shyobunol and related oxygenated sesquiterpenes from Bolivian Schinus molle Essential Oil. Nat Prod Commun. 2016;11(4):547-550.
15. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? Plant Physiol Biochem. Elsevier Masson SAS; 1 nov 2019;144:135-43.
16. Thejanuo Rhetso, R. Shubharani, M. Roopa, V. Sivaram. Chemical constituents, antioxidant, and antimicrobial activity of Allium chinense G. Don. Future J Phar Sci. 2020 Nov 27;6: 102. doi: 10.1186/s43094-020-00100-7.
17. Islam MT, Ali ES, Uddin SJ, Shaw S, Islam MA, Ahmed MI, et al.. Phytol: A review of biomedical activities. Food Chem Toxicol. 2018 Nov;121:82-94.
18. Islam T, Streck L, Correia MF, de Castro JM, Oliveira MV, Oliveira AM, et al. Preparation of Phytol-Loaded Nanoemulsion and Screening for Antioxidant Capacity. Int Arch Med. 2016; 9(70). doi: 10.3823/1941.
19. Huaraca R, Delgado MDC, Tapia F, Nolasco G. Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. Rev Alfa. 2021;5(14):153-65.
20. Bouzenna H, Hfaiedh N, Giroux-Metges MA, Elfeki A, Talarmin H. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. Biomed Pharmacother. 2017 Sep;93:961-968.
21. Shah BB, Mehta AA. In vitro evaluation of antioxidant activity of D-Limonene. Asian J Pharm Pharmacol. 2018;4(6):883-7.

22. Cano A, Maestre AB, Hernández-Ruiz J, Arnao MB. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. Processes. 2023;11(1): 185. doi: 10.3390/pr11010185.
23. Efferth T, Koch E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. Curr Drug Targets. 2010;12(1):122-32.
24. Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GH, Goel K, Arnason JT. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. J Ethnopharmacol. 2000 Nov;73(1-2):161-70.
25. Ruiz J, Salazar ME. Composición química y actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus paradisi*, *Juglans neotropica* Diels, *Schinus molle* y *Tagetes elliptica* Smith. Rev Soc Quím Perú. 2021; 87(3): 228-241.
26. Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. Phytomedicine. 2012 Oct 15;19(13):1185-90.
27. Bardales-Chuquilin AMT, Ureta-Lumbe YMS. Actividad antifúngica con infusión de J*uglans neotropica* Diels (nogal) en colonias de Candida albicans (ATCC 10231). [Tesis de título]. Cajamarca: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo; 2017.

DOI 10.37761/rsqp.v90i2.465

Recibido : 20.11.24
Aprobado: 25.11.24

DEVELANDO EL POTENCIAL DE *Chlorella sp.* PARA LA ELIMINACIÓN DE BTEX: UN ENFOQUE INNOVADOR PARA LA BIORREMEDIACIÓN

Brenda Kristell Núñez Mork[a], Brenda Tatiana Núñez Lozada[a], Edilberto Vicente Medina Cabrera[a], Ricardo Alonso Abril Ramírez[a], Tiffanny Lynne Vincent Lozano[a], Joshelyn Mariangela Paredes Zavala[a], Jaime Dante Cárdenas García*[a]

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) son contaminantes persistentes y tóxicos provenientes de actividades industriales y derrames de petróleo que afectan significativamente la calidad del agua, del suelo y la salud humana. Dadas las limitaciones de los métodos fisicoquímicos para la remediación de estos contaminantes, la biorremediación, particularmente mediante el uso de microalgas como *Chlorella sp*., emerge como una alternativa eficiente y sostenible debido a su capacidad para biodegradar compuestos orgánicos contaminantes y adaptarse a diversas condiciones ambientales. Es por eso que este estudio evaluó la eficiencia de biodepuración de hidrocarburos BTEX utilizando la microalga *Parachlorella kessleri*, aislada y caracterizada morfológica y molecularmente. Se determinó su cinética de crecimiento, obteniendo una fase exponencial de 120 horas, una velocidad específica de crecimiento μ=0,0230 h^{-1} y un tiempo de generación G=30,15 h. La medición de BTEX mediante cromatografía de gases FID mostró alta precisión y selectividad, con concentraciones mínimas detectables para benceno de 0,4 mg/L, tolueno 1,7 mg/L, etilbenceno 4,7 mg/L y xilenos entre 1,4-7,2 mg/L. *Parachlorella kessleri* demostró una notable capacidad de biorremediación, eliminando hasta 93,6% de benceno, 78,1% de tolueno, 66,0% de etilbenceno y 73,7% de xilenos en cinco días. Estos resultados destacan el enorme potencial de las microalgas en la mitigación de la creciente contaminación ambiental e invita a revalorar el papel de la biotecnología para enfrentar de manera sostenible los desafíos ambientales globales contemporáneos.

Palabras clave: *Chlorella*, Hidrocarburos aromáticos, Biorremediación, BTEX, Biotecnología

[a] Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María. Urbanización San José s/n, Umacollo, 04013, Arequipa, Perú. jcardenas@ucsm.edu.pe

UNLOCKING THE POTENTIAL OF *Chlorella sp.* FOR BTEX REMOVAL: AN INNOVATIVE APPROACH TO BIOREMEDIATION

ABSTRACT

BTEX aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) are persistent and toxic pollutants from industrial activities and oil spills that significantly affect water and soil quality as well as human health. Given the limitations of physicochemical methods for the remediation of these contaminants, bioremediation, particularly through the use of microalgae such as *Chlorella sp*., emerges as an efficient and sustainable alternative due to its ability to biodegrade contaminating organic compounds and adapt to various environmental conditions. Hence, this study evaluated the efficiency of BTEX hydrocarbon biopurification using the microalgae *Parachlorella kessleri*, isolated and morphologically and molecularly characterized. Its growth kinetics were determined, obtaining an exponential phase of 120 hours, a specific growth rate μ=0.0230 h^{-1} and a generation time G=30.15 h. Measurement of BTEX by FID gas chromatography showed high precision and selectivity, with minimum detectable concentrations for benzene of 0,4 mg/L, toluene 1,7 mg/L, ethylbenzene 4,7 mg/L, and xylenes between 1,4-7,2 mg/L. *Parachlorella kessleri* demonstrated a remarkable bioremediation capacity, removing up to 93,6% of benzene, 78,1% of toluene, 66,0% of ethylbenzene and up to 73,7% of xylenes in five days. These results highlight the enormous potential of microalgae in mitigating growing environmental pollution and sets an invitation to reevaluate the role of biotechnology to sustainably address contemporary global environmental challenges.

Keywords: Chlorella, Aromatic hydrocarbons, Bioremediation, BTEX, Biotechnology

INTRODUCCIÓN

Los impactos de la contaminación a causa de hidrocarburos aromáticos, y en especial los hidrocarburos aromáticos, mono y disustituidos, conocidos como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) representan un problema ambiental crítico que repercute en ecosistemas acuáticos y terrestres[1,2]. La procedencia principal de estos contaminantes corresponde a actividades industriales, derrames de petróleo y el excesivo uso de productos derivados del petróleo. Estos se caracterizan por una elevada persistencia y toxicidad, lo que compromete significativamente la calidad del agua, del suelo, y la salud de los organismos vivos[3]. Adicionalmente, los BTEX están asociados a posibles efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos en animales y humanos[4], lo que señala la necesidad de desarrollar métodos sostenibles y eficientes para su remoción del medio ambiente.

Los métodos tradicionales de remediación de BTEX incluyen técnicas fisicoquímicas como la adsorción con carbón activado, la oxidación avanzada y la filtración mediante membranas. Aunque estas tecnologías han demostrado ser efectivas en la eliminación de BTEX, presentan limitaciones significativas, tales como altos costos operativos, generación de subproductos tóxicos y dependencia de condiciones específicas que pueden

no ser factibles en todos los contextos[5-7]. En este sentido, la biorremediación emerge como una alternativa prometedora y más ecológica, aprovechando la capacidad de algunos organismos vivos para degradar compuestos orgánicos contaminantes de manera natural[8].

La biorremediación es una estrategia para la descontaminación de ambientes contaminados que emplea organismos como microalgas, hongos, bacterias, consorcios microbianos o procesos (aeróbicos o anaeróbicos)[9], para reducir la concentración y toxicidad de determinados contaminantes, basada en la aceleración del proceso natural de biodegradación de determinadas sustancias en el medio ambiente; donde la velocidad del proceso depende de condiciones ambientales como temperatura, presencia de oxígeno, nutrientes y pH[10]. Estos microorganismos pueden utilizar contaminantes, compuestos orgánicos o inorgánicos, como fuente de energía o carbono durante sus procesos metabólicos, utilizándolos como nutrientes o pudiendo ser degradados enzimáticamente[11].

Esta técnica se puede dividir en dos categorías: in situ (en un sitio contaminado) y ex situ (en otro lugar que no sea el área contaminada)[12,13]. La ficorremediación, es un tipo de biorremediación que se refiere a la utilización de micro o macroalgas para la remoción de contaminantes de aguas residuales, suelos contaminados y CO_2 del aire contaminado[14], lo que aporta una mejora a los métodos convencionales, demostrando ser una solución sostenible y ayudando a reducir la carga de contaminantes en el medio ambiente[15].

El cultivo de microalgas proporciona un biotratamiento que ha han captado la atención de los investigadores debido a su versatilidad y eficiencia metabólica[16]. Son numerosas las investigaciones y proyectos que han utilizado las microalgas para metabolizar una amplia gama de contaminantes orgánicos, y que a su vez han utilizado la biomasa obtenida de estos ambientes contaminados para la producción de biocombustibles como biodiesel, biogás y bioetanol, así como otros productos industriales[17,18].

Se ha demostrado que varias especies de microalgas de diferentes géneros, como *Botryococcus, Chlamydomonas, Chlorella y Phormidium*, tienen diferentes fines de ficorremediación. Sin embargo, seleccionar las especies de algas más adecuadas para la eliminación de ciertos contaminantes requiere más investigación en áreas clave. El uso de microalgas en la biorremediación del petróleo crudo sigue siendo un área de investigación interesante en discusión. Algunas especies de algas pueden oxidar y degradar muchos tipos de hidrocarburos en componentes menos dañinos, lo que sugiere su potencial para remediar el petróleo crudo, así como hidrocarburos aromáticos específicos[19]. Varios estudios demuestran la capacidad de diferentes especies de microalgas para biodegradar compuestos orgánicos en otras condiciones o regímenes metabólicos utilizando carbono orgánico como fuente de energía o carbono[20].

Entre las diversas especies de microalgas, *Chlorella sp*. destaca por su robustez, alta tasa de crecimiento y capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que la convierte en una candidata ideal para aplicaciones de bioremediación[21].

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento y purificación de *Chlorella sp.*

Se obtuvo un cultivo mixto de microalgas proporcionadas por el Laboratorio de Biología acuática de la Escuela de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín. Se empleó el método de diluciones seriadas con medio BBM (Basal Bold Medium). Después de 5

días de incubación, se validó el aislamiento de una sola especie de microalga mediante observación en microscopio.
Para la purificación del cultivo de la cepa ya aislada de *Chlorella sp.*, se emplearon los métodos de Lavado por centrifugación y Ultrasonido, para la eliminación de bacterias. Se depositaron 6 mL de cultivo en fase de crecimiento exponencial en un tubo Falcon y se sometió a ultrasonido de baja frecuencia introduciendo el tubo en un baño de agua durante 15 segundos a 90 kHz. Luego, se centrifugó por 90 segundos a 2000 RPM. Se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet. Se adicionaron 6 mL de medio Basal Bold estéril, se volvió a suspender el pellet y se repitió el proceso de centrifugación cinco veces.

Caracterización microscópica de *Chlorella sp.*

Se observó en fresco en microscopio a 40X y 100X y se midió el diámetro a través de la captura de microfotografías. Posteriormente, se analizaron las principales características estructurales de los cloroplastos.

Caracterización macroscópica de *Chlorella sp.*

En una cámara de flujo laminar en presencia de mechero, se cultivó la microalga en placas Petri con medio Agar BBM con la técnica de rayado en estría. Para la elaboración del medio Agar BBM, se empleó la composición descrita reportada con anterioridad[22] *y* 2% de agar. Se depositó en placas Petri y se esterilizó en autoclave a 120°C y 1,1 kg/cm^3 de presión durante 15 minutos. Seguidamente, se dejó enfriar al ambiente para su solidificación. Se sembró el medio con un asa de Kolle. Se colocaron las placas invertidas en un ambiente de luz controlada y se incubó durante 6 días[23]. Se determinó la morfología y pigmentación de las colonias, así como el tiempo de crecimiento.

Determinación de la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

Se monitoreó el crecimiento de la microalga mediante lecturas de su densidad poblacional por conteo en cámara de Neubauer, así como por espectrofotometría, previa elaboración de una curva patrón.

Recuento celular en cámara de Neubauer

Se agitó el cultivo hasta obtener una distribución homogénea y se succionó muestra del cultivo con una pipeta Pasteur. Se llenó la cámara de Neubauer con el cubreobjeto puesto, asegurando que los canales laterales se encuentren llenos. Se enfocó la cámara en el objetivo 10X del microscopio y se contaron todas las células presentes en el cuadrante central subdivididos en 25 cuadrados pequeños. Se diluyó la muestra, 1:10, cuando el cultivo estaba muy concentrado. Se ejecutaron los conteos con intervalos de 24 horas. La concentración celular fue calculada de acuerdo con la fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil$$

En donde: *C* corresponde a la concentración (cel/ml); *N,* al promedio de células presentes en 1 mm3 (0.1 µL) y *dil*, al Factor de dilución[24].

Cuantificación de densidad poblacional por espectrofotometría

Se determinó la concentración celular indirectamente a través de la densidad óptica del cultivo empleando un espectrofotómetro. Se calibró el equipo con medio BBM estéril. Se agitó el cultivo recién inoculado hasta su distribución homogénea. Se llenó la celda óptica con la muestra. En caso de altas concentraciones de cultivo, se realizó una dilución 1:10. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro, usando las longitudes de onda 435 nm, 440 nm, 680 nm.
Para la selección de las longitudes de onda, se empleó el método de Determinación de la longitud de onda máxima por barrido espectral del *Thermo Scientific INSIGHT 2 Software*[25]. Asimismo, se consideraron las longitudes 440 nm y 680 nm, reportadas por Cho, C., Nam, K., Seo, Y.H. et al y Zuliani L, Frison N, Jelic A, et al[26,27].
Se elaboró una curva de crecimiento con los datos de la densidad óptica, considerando:

$$DO = 100 - T$$

En donde: DO = Densidad óptica; T = Transmitancia, % de luz incidente recibida por el fotodetector[24].

Asimismo, se calcularon los parámetros cinéticos de densidad óptica considerando:

$$Ln\ N - LnN_0 = \mu(t - t_0)\ ;\ g = 0{,}693/\mu$$

En donde: N = Densidad óptica; μ = constante específica de velocidad de crecimiento; g= tiempo de generación

Caracterización molecular la microalga *Chlorella sp.*

Se extrajo el DNA de la microalga mediante el método fenol-cloroformo alcohol isoamílico. Se depositaron 1,5 mL de cultivo de microalga en un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos. Se decantó el sobrenadante y se conservó el pellet de biomasa. Se adicionó 1 mL de Buffer de Lisis a pH 7,5, como fue reportado[28]. Se sometió la mezcla a vortex, a 30 RPS por 1 minuto. Se adicionaron micro perlas y se mantuvo a -20°C por 5 minutos. Seguidamente, se sometió a Vortex por 5 minutos. Nuevamente se mantuvo a -20°C por 5 minutos y a vortex por otros 5 minutos. Se rescató el sobrenadante y se adicionó 500 µL de fenol cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1. Se sometió la mezcla a vortex por 1 minuto. Se centrifugó la suspensión a 12000 rpm por 10 minutos. Se transfirió 650 µL del sobrenadante a un nuevo Eppendorf y se adicionó 1000 µL de alcohol isopropílico. Se invirtió el Eppendorf 5 veces y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se mantuvo a 4 °C por 12 horas. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70%. Se removió el etanol. Se dejaron evaporar las trazas restantes de etanol[28].
Se volvió a suspender el DNA con 40 µL de agua ultrapura. Se validó la extracción de DNA por electroforesis en gel de agarosa 1,5% por 15 minutos, a 100 mV y 400 mA[28].

Amplificación del 18S rRNA y 28S rRNA

Se tomó 1 µL de muestra y se mezcló con 19 µL de Máster Mix. Para la elaboración del Máster Mix, se midieron con micropipetas los componentes mostrados en la Tabla 1[28].

El ADN genómico de la región 18S rRNA fue amplificada en PCR usando los primers: Forward 5′-GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC-3′ y Reverse 5′-GACCATACTCCCCCCGGAACC-3′ [29,30]. Por otro lado, para la amplificación de la zona 28S rRNA, se usaron los primers: Forward 5′-AGCGGAGGAAAAGAAACTA-′3 y Reverse 5′-TACTAGAAGGTTCGATTAGTC-′3 [31,32].
El programa usado para PCR se muestra en la Tabla 1. Detalle del programa de PCR usado para este estudio. Los programas se utilizaron para amplificar la secuencia ribosómica para la identificación de la cepa de microalgas.[33]

Tabla 1. Detalle del programa de PCR usado para este estudio**.** Los programas se utilizaron para amplificar la secuencia ribosómica para la identificación de la cepa de microalgas.

FASE	18S rRNA			28S rRNA		
	Temperatura °C	Tiempo (s)	Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	300	1	95	240	1
Desnaturalización	95	30		95	30	
Hibridación	56	60	35	52.5	20	30
Elongación	68	60		68	90	
Extensión final	68	300	1	68	480	1
Almacenamiento	4	∞	1	4	∞	1

Tomado de Medina C.[33]

Secuenciación molecular

Se realizaron dos secuenciaciones habiéndose empleado primers forward y reverse para ambos amplicones, 18S rRNA y 28S rRNA.
Se ingresó la secuencia de nucleótidos en la base de datos NUCLEOTIDE BLAST de la NCBI para la identificación taxonómica de la microalga[34].

Cuantificación de hidrocarburos aromáticos BTEX por cromatografía de gases FID

Para la evaluación de la depuración de hidrocarburos por medio de *Chlorella sp*. se preparó soluciones de hidrocarburos aromáticos (Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos). La concentración remanente, después de 120 horas, fue evaluada usando un cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra usando una columna Zebron ZB-35. Para el análisis cuantitativo se usó BTEX, material certificado conteniendo 2000 µg/mL en metanol, de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos obtenido de Merck Peruana S.A. así como los otros reactivos.
Tanto las soluciones estándar de concentración conocida, como los concentrados obtenidos de los tratamientos fueron filtrados con jeringas de 5 ml y membranas *Nylon* de 0,22 um marca *RephiQuik* en viales de vidrio ámbar. Posteriormente se sellaron e insertaron en el inyector automático *AOC-20I* acoplado al cromatógrafo de gases. Las soluciones estándar fueron leídas repetidas veces variando las condiciones

cromatográficas hasta lograr establecerlas y poder resolver los tiempos de retención y picos en los cromatogramas obtenidos. Las condiciones experimentales elegidas se basaron en el trabajo de Sidisky L.[35]

Evaluación la capacidad de *Chlorella sp.* para biodepurar hidrocarburos BTEX a distintas concentraciones

Con el fin de estimar la capacidad biodepuradora de *Chlorella sp*, se dividió el proceso en las siguientes etapas: Biorreacción, extracción, concentración y cuantificación. Para la etapa de biorreacción, se optó por simular muestras de aguas contaminadas con hidrocarburos mediante la elaboración de soluciones de hidrocarburos BTEX de concentraciones conocidas, con el objetivo de estimar en primera instancia concentraciones máximas remediables de BTEX por la microalga. Asimismo, considerando que la fuente de carbono es el reactivo limitante de la biorreacción, su cantidad podría influir en la eficiencia de esta, por ende se optó por evaluar la relación g de BTEX/ UFC de *Chlorella sp.*, a través de la manipulación del volumen de contaminante BTEX disponible para biorremediar versus una concentración estándar de densidad poblacional de *Chlorella sp*., con el objetivo de definir el valor de dosis de inoculación requerida para una eficiencia óptima para casos de aplicación donde desee emplearse este método de biodepuración de BTEX. Al tratarse de un sistema bifásico compuesto de una fase orgánica contenedora de los contaminantes y otra acuosa portadora de los entes biorremediadores, se realizaron procesos de selección de solventes orgánicos y surfactantes, por lo que se tomaron como referencias antecedentes reportados en repositorios científicos y para su selección fueron sometidos a pruebas experimentales. Finalmente, para la neutralización de la biodepuración se seleccionó el método de microfiltración.

Asimismo, para la etapa de Extracción, se seleccionó el método líquido-líquido. El sistema de alimentación estuvo conformado por el contenido del biorreactor de tratamiento de BTEX por *Chlorella sp.* y como solvente extractor se seleccionó diclorometano de grado HPLC. El extracto del proceso resultante fueron los Hidrocarburos aromáticos BTEX recuperados en el solvente, y el refinado del proceso, por el resto de la alimentación. Se estableció la repetición del proceso de extracción para el refinado obtenido, con la finalidad de obtener una eficiencia del 99,9% de extracción. Luego se procedió a la concentración de la muestra usando un evaporador rotatorio. Finalmente, el extracto concentrado se cuantificó por GC con detector FID usando una columna Zebron ZB-35.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *Chlorella sp.*

Se obtuvo un cultivo monoespecífico de microalgas mediante el método de diluciones seriadas. Posteriormente, las bacterias presentes en el cultivo fueron eliminadas utilizando técnicas de lavado por centrifugación y ultrasonido[23]. La Figura 1a muestra el cultivo de *Chlorella sp.* aislado y purificado.

Caracterización microscópica de *Chlorella sp.*

Se determinó que el diámetro promedio de *Chlorella sp.* era de 1,34 µm, lo que correspondía a un área de 1,41 µm² (Figura 1b). Este tamaño es menor al rango típico reportado para microalgas del género *Chlorella*, que varía entre 2 y 10 µm[36-38].

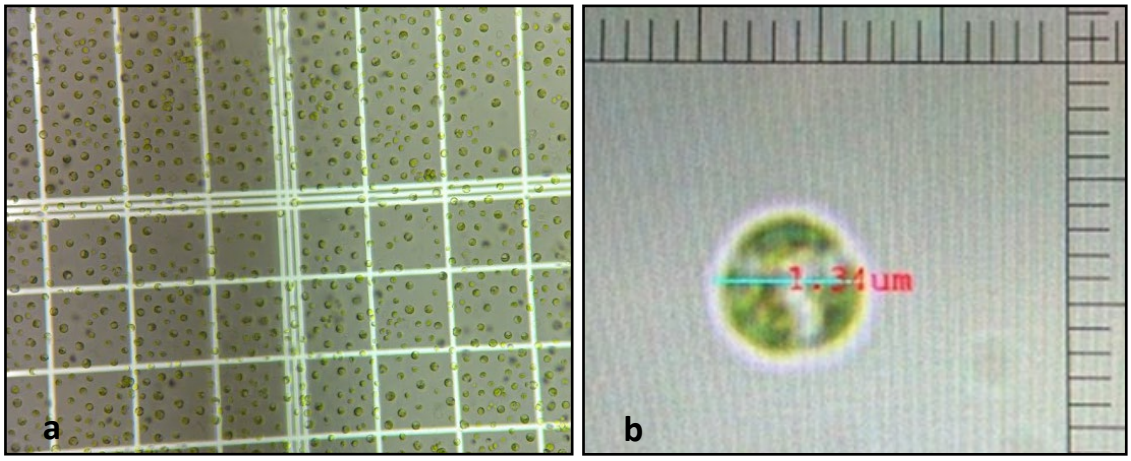


Figura 1. **a.** Cultivo de *Chlorella sp.* aislado y purificado. **b.** Determinación del diámetro de *Chlorella sp*.

Además, se identificaron las principales características estructurales de los cloroplastos, propias de la División *Chlorophyta*. Se observó un cloroplasto en forma de copa, un pirenoide de forma ampliamente elipsoidal a esférica y una superficie celular lisa sin flagelo (Figura 2a y 2b). Asimismo, se determinó que estas microalgas se reproducían mediante la formación de 2 a 4 autoesporas[39].

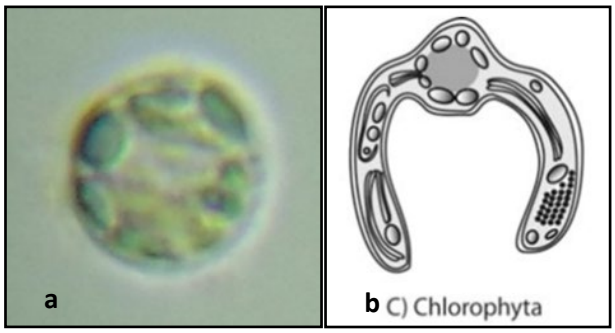


Figura 2. a. Se observan los organelos *de Chlorella sp.,* **b.** Se aprecian las principales características estructurales de los cloroplastos de *Chlorophyta*. *(Tomado de Solymosi K)*[39]

Determinación de la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

Se determinó la curva de crecimiento de la microalga (Figura 3), identificándose una fase lag o de adaptación que duró 24 horas, seguida de una fase exponencial que inició al día 1 y se prolongó por 120 horas, y finalmente una fase estacionaria que comenzó en el día 6. Los parámetros cinéticos obtenidos incluyeron una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0{,}0230\ h^{-1}$ y un tiempo de generación de G = 30,1519 h. Cabe destacar que, según algunos estudios, especies de *Chlorella sp.* pueden no alcanzar la fase de muerte incluso después de 25 a 28 días de cultivo[40, 41].

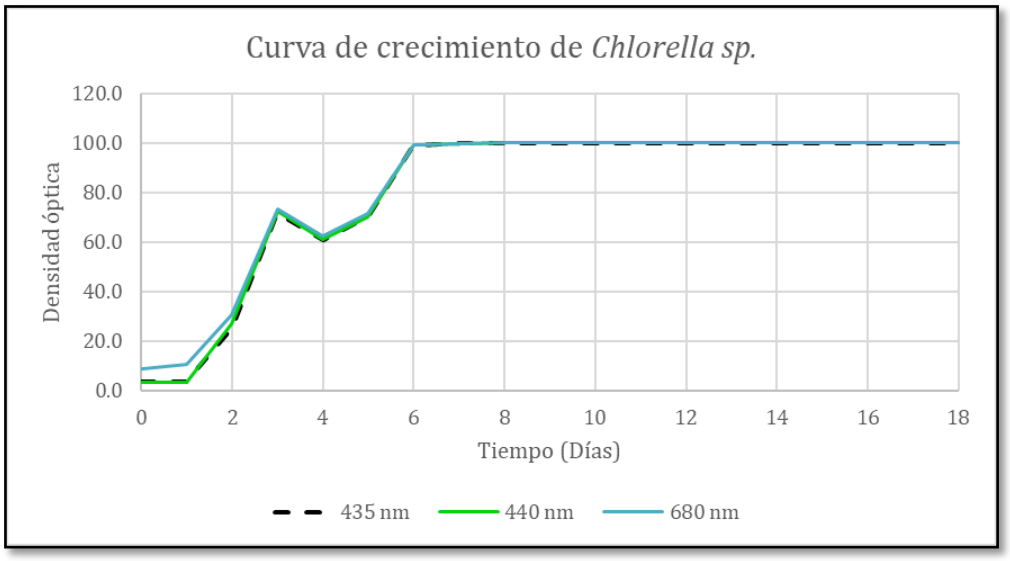


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

Caracterización macroscópica de *Chlorella sp.*

Se observó el crecimiento de colonias de *Chlorella sp.* en medio Agar BBM, visibles entre los días 3 y 6. Las colonias presentaron una forma esférica bien definida, tamaño uniforme, coloración verde claro y carecían de motilidad.

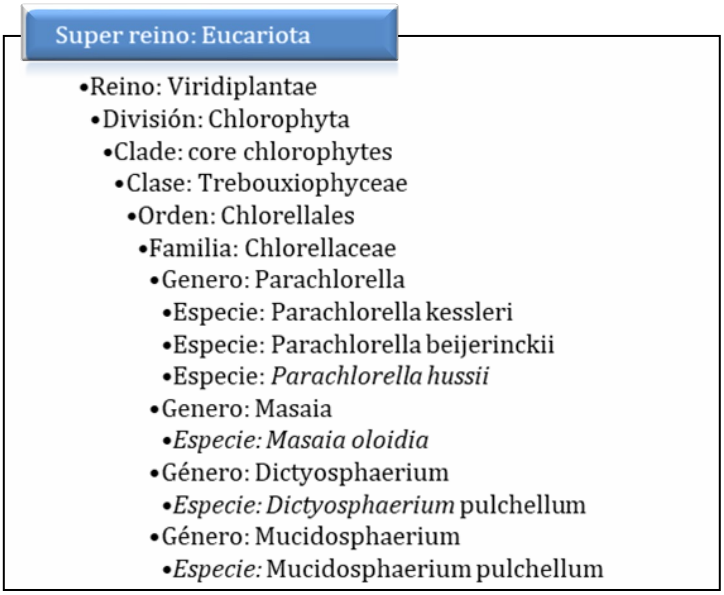


Figura 4. Especies homólogas con lineamientos significativos obtenidos en BLAST para la secuencia de genes 18S rRNA. *Nota: Tomado de NCBI*[34].

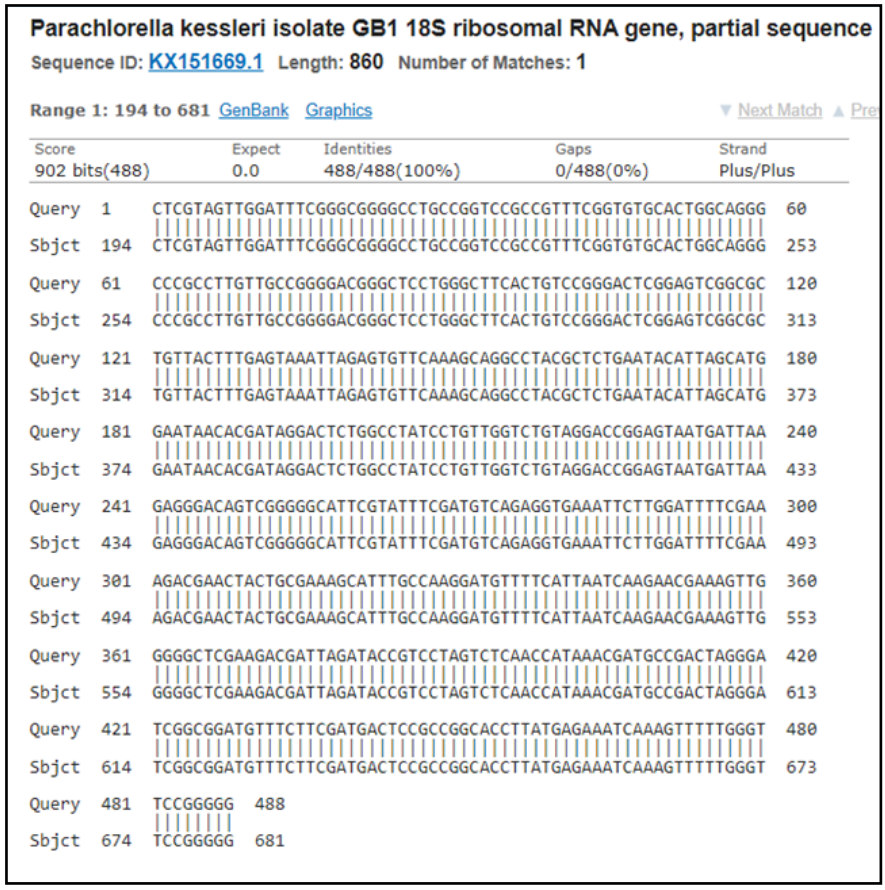


Figura 5. Alineamiento molecular de la secuencia 18S rRNA analizada y *Parachlorella kessleri*. Nota: Tomado de *NCBI*[34].

Identificación molecular la microalga *Chlorella sp.*

Se secuenciaron los genes 18S rRNA y 28S rRNA, cuyos análisis en BLAST revelaron relaciones cercanas con microalgas de la familia *Chlorellaceae* (Figura 4). En el caso del gen 18S rRNA, se obtuvo un porcentaje de identidad del 100% para una longitud de 496-860 nucleótidos, con una cobertura de consulta del 61-98%, un e-value de 0,0 y un bit score máximo de 902, sin errores de alineamiento. La especie más estrechamente relacionada fue *Parachlorella kessleri*, con un e-value de 0,0 y un bit score de 902 (Figura 5).

Por otro lado, el análisis del gen 28S rRNA, caracterizado por un amplicón más largo, mostró una identidad del 90,69-100% para una longitud de 883 nucleótidos, una cobertura de consulta del 97%, un e-value de 0,0 y un bit score máximo de 1051-1458, con un error de alineamiento del 0-1% (Figura 6). La especie más cercana fue *Micractinium reisseri*, con un bit score máximo de 1458, destacándose como la más similar a la secuencia analizada (Figura 7).

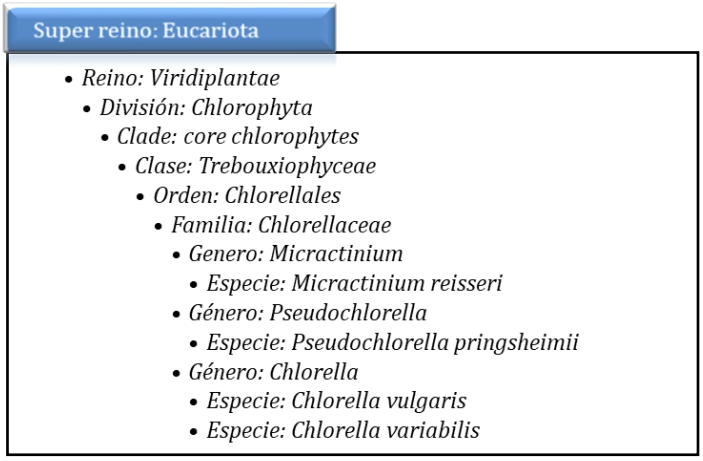
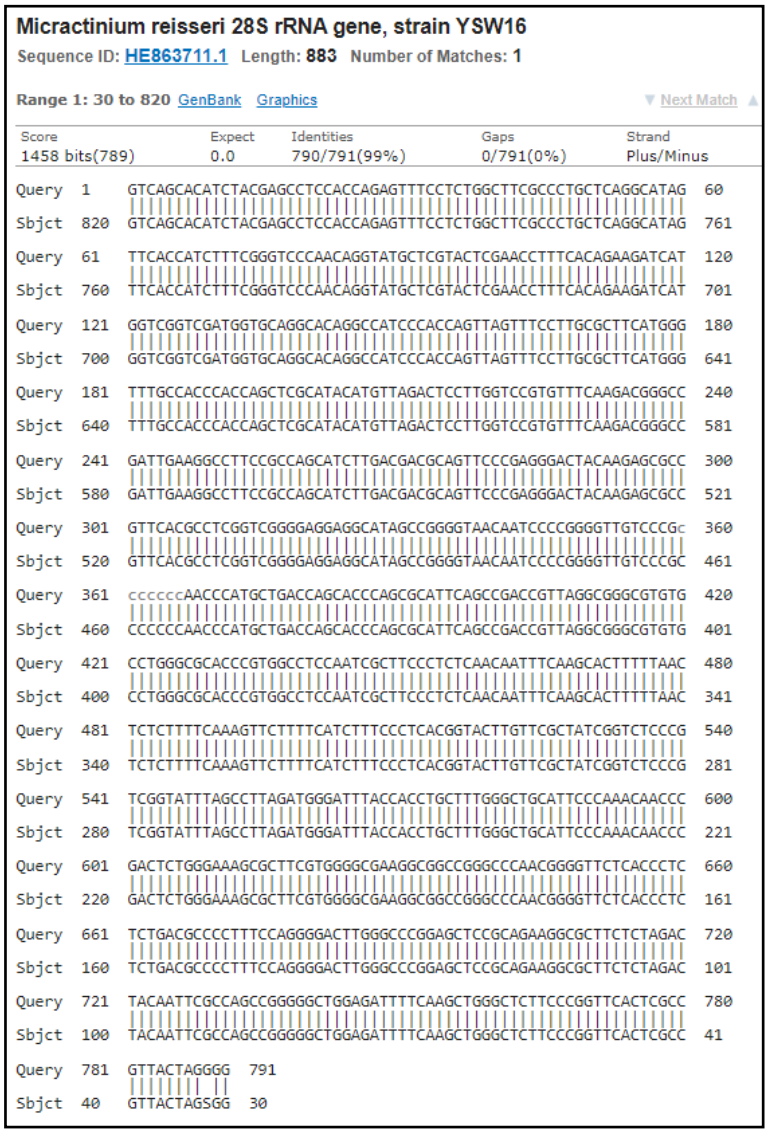


Figura 6. Especies homólogas con lineamientos significativos obtenidos en BLAST para la secuencia de genes 28S rRNA. *Nota: Tomado de NCBI*[34].



Micractinium reisseri 28S rRNA gene, strain YSW16

Sequence ID: HE863711.1 Length: 883 Number of Matches: 1

Range 1: 30 to 820 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1458 bits(789)	0.0	790/791(99%)	0/791(0%)	Plus/Minus

```
Query  1    GTCAGCACATCTACGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTGCTCAGGCATAG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  820  GTCAGCACATCTACGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTGCTCAGGCATAG  761

Query  61   TTCACCATCTTTCGGGTCCCAACAGGTATGCTCGTACTCGAACCTTTCACAGAAGATCAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  760  TTCACCATCTTTCGGGTCCCAACAGGTATGCTCGTACTCGAACCTTTCACAGAAGATCAT  701

Query  121  GGTCGGTCGATGGTGCAGGCACAGGCCATCCCACCAGTTAGTTTCCTTGCGCTTCATGGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  700  GGTCGGTCGATGGTGCAGGCACAGGCCATCCCACCAGTTAGTTTCCTTGCGCTTCATGGG  641

Query  181  TTTGCCACCCACCAGCTCGCATACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  640  TTTGCCACCCACCAGCTCGCATACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCC  581

Query  241  GATTGAAGGCCTTCCGCCAGCATCTTGACGACGCAGTTCCCGAGGGACTACAAGAGCGCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  580  GATTGAAGGCCTTCCGCCAGCATCTTGACGACGCAGTTCCCGAGGGACTACAAGAGCGCC  521

Query  301  GTTCACGCCTCGGTCGGGGAGGAGGCATAGCCGGGGTAACAATCCCCGGGGTTGTCCCGc  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  520  GTTCACGCCTCGGTCGGGGAGGAGGCATAGCCGGGGTAACAATCCCCGGGGTTGTCCCGC  461

Query  361  ccccccAACCCATGCTGACCAGCACCCAGCGCATTCAGCCGACCGTTAGGCGGGCGTGTG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  460  CCCCCCAACCCATGCTGACCAGCACCCAGCGCATTCAGCCGACCGTTAGGCGGGCGTGTG  401

Query  421  CCTGGGCGCACCCGTGGCCTCCAATCGCTTCCCTCTCAACAATTTCAAGCACTTTTTAAC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  400  CCTGGGCGCACCCGTGGCCTCCAATCGCTTCCCTCTCAACAATTTCAAGCACTTTTTAAC  341

Query  481  TCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  340  TCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCG  281

Query  541  TCGGTATTTAGCCTTAGATGGGATTTACCACCTGCTTTGGGCTGCATTCCCAAACAACCC  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  280  TCGGTATTTAGCCTTAGATGGGATTTACCACCTGCTTTGGGCTGCATTCCCAAACAACCC  221

Query  601  GACTCTGGGAAAGCGCTTCGTGGGGCGAAGGCGGCCGGGCCCAACGGGGTTCTCACCCTC  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  220  GACTCTGGGAAAGCGCTTCGTGGGGCGAAGGCGGCCGGGCCCAACGGGGTTCTCACCCTC  161

Query  661  TCTGACGCCCCTTTCCAGGGGACTTGGGCCCGGAGCTCCGCAGAAGGCGCTTCTCTAGAC  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  160  TCTGACGCCCCTTTCCAGGGGACTTGGGCCCGGAGCTCCGCAGAAGGCGCTTCTCTAGAC  101

Query  721  TACAATTCGCCAGCCGGGGGCTGGAGATTTTCAAGCTGGGCTCTTCCCGGTTCACTCGCC  780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  100  TACAATTCGCCAGCCGGGGGCTGGAGATTTTCAAGCTGGGCTCTTCCCGGTTCACTCGCC  41

Query  781  GTTACTAGGGG  791
            ||||||| ||
Sbjct  40   GTTACTAGSGG  30
```

Figura 7. Alineamiento molecular de la secuencia 28S rRNA analizada y *Micractinium reisseri. Nota: Tomado de NCBI*[34].

Estandarización y validación del método de cuantificación de hidrocarburos aromáticos BTEX por cromatografía de gases FID

Para determinar las condiciones óptimas para el análisis de hidrocarburos BTEX mediante GC-FID, se probaron diversas configuraciones cromatográficas basadas en estudios previos que empleaban el estándar BTEX. Finalmente, se seleccionó la configuración propuesta por Sidisky L.35, incorporando algunas modificaciones, las cuales se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones cromatográficas para la evaluación de hidrocarburos aromáticos.

Parámetro	**Valor**	**Unidad**
Tiempo	25	min
Vol. Inyección	1	uL
Modo Inyección	-	Split
Presión	190	kPa
T° inyección	250	°C
T° detector	250	°C
T° columna	40	°C
Flujo de Aire	40	ml/min
Flujo de Hidrógeno	40	ml/min
Gas carreador	Helio	
Flujo Gas carreador	30	ml/min

Se realizó una corrida cromatográfica utilizando la solución certificada de BTEX de Merck Peruana S.A. y, posteriormente, se analizaron los mismos hidrocarburos aromáticos de forma individual. Se observó que los tiempos de retención de los compuestos individuales fueron similares a los obtenidos con la solución BTEX certificada, como se detalla en la Tabla 3.

Los resultados presentados en la Tabla 3 muestran una comparación de los tiempos de retención obtenidos en los cromatogramas de la solución certificada BTEX y la solución BTEX preparada en el laboratorio. La identificación de cada compuesto asociado a los picos observados en los cromatogramas se realizó tras múltiples análisis de cada componente, empleando soluciones preparadas con compuestos puros de grado GC. Estos compuestos serán utilizados en las pruebas de biodepuración.
Se observó que, de los 7 picos registrados, 5 correspondieron a tiempos de retención similares a los obtenidos con la solución certificada BTEX, por lo que se consideraron válidos. Los dos tiempos de retención restantes, que no coincidieron, se atribuyeron al solvente utilizado: metanol en la solución estándar y diclorometano en la solución preparada en el laboratorio.

Tabla 3. Comparación de los tiempos de retención (minutos) de los hidrocarburos en el cromatograma del material certificado BTEX y la solución BTEX preparada en el laboratorio.

SOLUCIÓN CERTIFICADA BTEX	SOLUCION BTEX 1000 PPM	COMPUESTO*
-	0,709	
0,985	0,985	Benceno
1,606	1,608	Tolueno
3,007	3,012	
3,091	3,098	Xilenos
3,850	3,858	
6,765	-	
6,954	-	
-	9,436	Etilbenceno

Validación del método de análisis de hidrocarburos aromáticos BTEX

Para validar el método de GC-FID para la detección de compuestos BTEX, se evaluaron varios parámetros basados en investigaciones previas[42-45] utilizando el método de estándar externo (46). Las soluciones de concentración conocida fueron preparadas en el laboratorio, y se analizaron los siguientes criterios: linealidad, selectividad, precisión y concentración mínima detectable (CMD), cuyos resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Evaluación de la linealidad para hidrocarburos aromáticos y su CMD

COMPUESTO	Ecuación de la recta	R^2	CMD en ppm
Benceno	y = 227,02x + 50,444	0,9956	0,40
Tolueno	y = 247,23x - 12,275	0,9956	1,73
Etilbenceno	y = 163,56x - 61,055	0,9976	4,72
Xileno 1	y = 29,154x - 29,069	0,9838	7,28
Xileno 2	y = 132,53x + 6,7029	0,9970	2,51
Xileno 3	y = 37,187x + 14,609	0,9955	1,43

Evaluación de la capacidad de biodepuración de hidrocarburos aromáticos (BTEX) por *Parachlorella kessleri* a diferentes concentraciones y proporciones de BTEX (g) por UFC de P. kessleri

Se prepararon muestras de los hidrocarburos BTEX a tres diferentes concentraciones (10, 20 y 30 ppm) en CH_2Cl_2 y se trabajó al 5 y 10% de volumen de fase orgánica respecto a la fase acuosa (60 mL). La fase acuosa constó de un cultivo de *P. kessleri* y medio BBM. Los resultados de la biodepuración se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Porcentaje de biodepuración de *P. Kessleri* a tres diferentes concentraciones de HC BTEX y 2 niveles de volumen (%) de fase orgánica/volumen de fase acuosa

Concentración en ppm de HC BTEX en CH_2Cl_2	***10***				***20***				***30***			
% (vol, fase orgánica/ vol, fase acuosa	***5***		***10***		***5***		***10***		***5***		***10***	
	Prom	***s***	***Prom***	***s***	***Prom***	***s***	***Prom***	***s***	***Prom***	***s***	***Prom***	***s***
Benceno	77,2	4,3	40,8	51,5	46,1	7,6	95,6	4,2	75,0	5,0	93,6	7,3
Tolueno	58,2	5,0	31,6	37,6	34,6	4,3	41,8	3,4	73,4	11,8	78,1	3,6
Etilbenceno	35,1	20,3	27,7	10,5	19,1	12,2	78,4	6,2	23,2	1,9	66,0	6,7
Xileno 1	21,9	5,2	13,6	11,8	12,7	1,2	30,7	1,4	32,1	4,2	51,3	2,6
Xileno 2	64,2	3,4	33,8	43,0	38,4	6,5	73,3	7,7	66,1	10,8	73,7	4,3
Xileno 3	24,3	3,2	13,8	14,9	14,3	0,8	20,4	11,4	15,7	3,4	46,6	1,3

Prom: promedio de dos mediciones y *s* indica la desviación estándar de estas mediciones.

CONCLUSIONES

Las características microscópicas, estructurales y macroscópicas del organismo estudiado confirman su pertenencia a la división Chlorophyta. La caracterización molecular validó que la microalga pertenece específicamente a la familia *Chlorellaceae*. El análisis del perfil genético de la región 18S rRNA, comúnmente utilizada para la identificación de microalgas, mostró homología con las especies *Parachlorella kessleri*, *Masaia oloidia* y *Dictyosphaerium sp.*. Por su parte, el análisis de la región 28S rRNA, una secuencia más extensa utilizada principalmente para eucariotas, reveló homología con *Micractinium reisseri*. Estas similitudes genéticas respaldan que cualquiera de las especies mencionadas podría ser una denominación taxonómica válida.

La cinética de crecimiento de *Parachlorella kessleri* evidenció su rápido desarrollo, con una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0{,}0230\ h^{-1}$ y un tiempo de generación de G = 30,15 h, características que la hacen particularmente adecuada para su cultivo y aplicación como agente biorremediador en aguas dulces.

Además, se determinó que *Parachlorella kessleri* es altamente eficiente en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos BTEX. En un periodo de 5 días, bajo condiciones ambientales y sin aireación, logró remover el 95,6 % de benceno, 78,1 % de tolueno, 78,4 % de etilbenceno, y 51,3 %, 73,7 % y 46,6 % de los isómeros de xileno.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo con el financiamiento del Vice-Rectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, Resolución 25260-R-2018.

REFERENCIAS

1. Tezcan Demirel Y, Yati I, Donmez R, Bulbul Sonmez H. Clean-up of oily liquids, fuels and organic solvents from the contaminated water fields using poly(propylene glycol) based organogels. Chemical Engineering Journal 2017;312:126–35. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.124.
2. Principles and practices for petroleum contaminated soils / edited by Edward J. Calabrese, Paul T. Kostecki. Lewis Publishers; 1993.
3. Jung D, Kim J-A, Park M-S, Yim UH, Choi K. Human health and ecological assessment programs for Hebei Spirit oil spill accident of 2007: Status, lessons, and future challenges. Chemosphere 2017;173:180–9. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.153.
4. Moreira ITA, Oliveira OMC, Triguis JA, dos Santos AMP, Queiroz AFS, Martins CMS, et al. Phytoremediation using Rizophora mangle L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). Microchemical Journal 2011;99:376–82. https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.06.011.
5. Prince RC. Crude Oil Releases to the Environment: Natural Fate and Remediation Options. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier; 2014. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09112-0.
6. Borowitzka, M.A. High-value products from microalgae — their development and commercialisation. Journal of Applied Phycology 2013,25:743-756. https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9
7. Mata TM, Martins AA, Caetano NidiaS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2010;14:217–32. https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020.
8. Milic J, Beskoski V, Ilic M, Ali S, Gojgic-Cvijovic G, Vrvic M. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium. Journal of the Serbian Chemical Society 2009;74:455–60. https://doi.org/10.2298/JSC0904455M.
9. Premnath N, Mohanrasu K, Guru Raj Rao R, Dinesh GH, Prakash GS, Ananthi V, et al. A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. Chemosphere 2021;280:130608. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608.
10. Fuentes S, Méndez V, Aguila P, Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. Applied Microbiology and Biotechnology 2014;98:4781–94. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9.
11. Salgot M, Folch M. Wastewater treatment and water reuse. Current Opinion in Environmental Science & Health 2018;2:64–74. http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005.

12. Yu XZ, Wu SC, Wu FY, Wong MH. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. Journal of Hazardous Materials 2011;186:1206–17. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.116.
13. Xu Y, Lu M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. Journal of Hazardous Materials 2010;183:395–401. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038.
14. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Applied Energy 2011;88:3411–24. http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025.
15. Dubey S, Chen C-W, Haldar D, Tambat VS, Kumar P, Tiwari A, et al. Advancement in algal bioremediation for organic, inorganic, and emerging pollutants. Environmental Pollution 2023;317:120840. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120840.
16. Choudhary P, Prajapati SK, Malik A. Screening native microalgal consortia for biomass production and nutrient removal from rural wastewaters for bioenergy applications. Ecological Engineering 2016;91:221–30. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.056.
17. Prajapati SK, Choudhary P, Malik A, Vijay VK. Algae mediated treatment and bioenergy generation process for handling liquid and solid waste from dairy cattle farm. Bioresource Technology 2014;167:260–8. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.038.
18. Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology 2011;102:35–42. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158.
19. El-Sheekh MM, Hamouda RA, Nizam AA. Biodegradation of crude oil by Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris growing under heterotrophic conditions. International Biodeterioration & Biodegradation 2013;82:67–72. http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.015.
20. Gondi R, Kavitha S, Yukesh Kannah R, Parthiba Karthikeyan O, Kumar G, Kumar Tyagi V, et al. Algal-based system for removal of emerging pollutants from wastewater: A review. Bioresource Technology 2022;344:126245. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126245.
21. Ñañez KB, Rios Ramirez KD, Cordeiro de Oliveira OM, Reyes CY, Andrade Moreira ÍT. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from produced water using the microalgae Chlorella vulgaris cultivated in mixotrophic and heterotrophic conditions. Chemosphere 2024;356:141931. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141931.
22. Bischoff HW, Bold HC. Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas, 1963.
23. Band Schmidt CJ. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. In: Arredondo Vega BO, Voltolina D (eds). Departamento de Plancton y Ecología Marina., 2017, pp. 3–4.
24. Arredondo BO, Voltolina D. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. In: Arredondo Vega BO, Voltolina D (eds). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas., 2017, pp. 21–29.
25. Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Fisher. [En línea]; 2024 [accesado en Octubre 2024]. Disponible en:

https://www.thermofisher.com/pe/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/software.html
26. Cho C, Nam K, Seo YH, et al. Study of Optical Configurations for Multiple Enhancement of Microalgal Biomass Production. Scientific Reports; (9). https://doi.org/10.1038/s41598-018-38118-w.
27. Zuliani L, Frison N, Jelic A, et al. Microalgae Cultivation on Anaerobic Digestate of Municipal Wastewater, Sewage Sludge and Agro-Waste. International Journal of Molecular Sciences. 2016; (17): 1692. https://doi.org/10.3390/ijms17101692.
28. Tear CJY, Lim C, Wu J, et al. Accumulated lipids rather than the rigid cell walls impede the extraction of genetic materials for effective colony PCRs in Chlorella vulgaris. Microbial Cell Factories; (12). https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-106.
29. Duong VT, Ahmed F, Thomas-Hall SR, et al. High Protein- and High Lipid-Producing Microalgae from Northern Australia as Potential Feedstock for Animal Feed and Biodiesel. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology; (3). https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00053.
30. Lim DKY, Garg S, Timmins M, et al. Isolation and Evaluation of Oil-Producing Microalgae from Subtropical Coastal and Brackish Waters. PLoS ONE. 2012; (7): e40751. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040751.
31. Sonnenberg R, Nolte AW, Tautz D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. Frontiers in Zoology; (4). https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-6.
32. Abou-Shanab RAI, Matter IA, Kim S-N, et al. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. Biomass and Bioenergy. 2011; (35): 3079–3085. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.021.
33. Medina-Cabrera EV. Investigation and Optimization of Exopolysaccharide (EPS) Production by Microalgae. Phdthesis, Technische Universität München.
34. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics. 2009; (10). https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421.
35. Leonard M. Sidisky, Buchana MD. Mixing Water and Gas: The Quantitative Measurement of Water by Gas Chromatography Using Ionic Liquid Capillary Columns. Chromatography Today.
36. Pratt R. Influence of auxins on the growth of chlorella vulgaris. American Journal of Botany. 1938; (25): 498–501. https://doi.org/10.2307/2436677.
37. Beijerinck MW. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichen-Engonidien und Anderen Niederen Algen I-III. Botanische Zeitung 1890; (48): 726–740.
38. Kuhl A, Lorenzen H. Chapter 10 Hmdling and Culturing of Chlorella. In: Methods in Cell Biology Volume 1. Elsevier, 1964, pp. 159–187. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62092-0.
39. Solymosi K. Plastid Structure, Diversification and Interconversions I. Algae. Current Chemical Biology. 2013; (6): 167–186. http://dx.doi.org/10.2174/2212796811206030002.
40. Ilavarasi A, Mubarakali D, Praveenkum R, et al. Optimization of Various Growth Media to Freshwater Microalgae for Biomass Production. Biotechnology(Faisalabad). 2011; (10): 540–545. https://doi.org/10.3923/biotech.2011.540.545.
41. Burrell RobertE, Inniss WilliamE, Mayfield ColinI. Development of an optimal heterotrophic growth medium for Chlorella vulgaris. Applied Microbiology and Biotechnology; (20). https://doi.org/10.1007/BF00250641.

42. Dórea HS, Bispo JRL, Aragão KAS, et al. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. Microchemical Journal. 2007; (85): 234–238. https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.06.002.
43. Parra I, Chávez G, Luciani Y, et al. Optimización de un sistema purga y trampa/cromatografía de gases para la determinación de hidrocarburos aromáticos volátiles (BTEX) en agua. Ciencia (Maracaibo). 2004; (12): 205–214.
44. Assadi Y, Ahmadi F, Hossieni MRM. Determination of BTEX Compounds by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction with GC–FID. Chromatographia. 2010; (71): 1137–1141. https://doi.org/10.1365/s10337-010-1616-8.
45. Sarafraz-Yazdi A, Amiri AH, Es'haghi Z. Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector. Talanta. 2009; (78): 936–941. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.069.
46. Natangelo M, Tavazzi S, Benfenati E. Evaluation of solid phase microextraction–gas chromatography in the analysis of some pesticides with different mass spectrometric techniques: Application to environmental waters and food samples. Analytical Letters. 2002; (35): 327–338. https://doi.org/10.1081/AL-120002533.

DOI: 10.37761/rsqp.v90i2.470
Recibido : 13.12.24
Aceptado: 17.12.24

INFLUENCIA DE LA COBERTURA VEGETAL EN LA CALIDAD DEL AGUA DE LA CUENCA MANTARO, PERÚ

Katheryne Priscilla Zambrano Delgadillo[a*], Manuel Alfredo Ñique Alvarez[b], Elvis Anthony Medina Dionicio[c]

RESUMEN

En esta investigación se determinó la influencia de la cobertura vegetal, a través del NDVI, sobre la calidad del agua en la cuenca Mantaro, utilizando 27 puntos de monitoreo de categoría 3, establecidos por la ANA. Se consideraron 13 parámetros: DBO_5, DQO, OD, CT, pH, Ar, Al, Mn, Fe, Cd, Pb, B y Cu. Los datos del NDVI se descargaron del producto MOD13Q1 V6.1 disponible en Google Earth Engine. El análisis reveló que el comportamiento temporal de los parámetros de calidad del agua varía según la estación del año, siendo en verano donde se registran los máximos valores y en invierno los menores para todos los parámetros fisicoquímicos y orgánicos en las cuencas Alta y Baja del Mantaro. En la cuenca Media, para los CT, DBO_5 y DQO, los máximos se registraron en invierno y primavera. Se obtuvieron correlaciones muy fuertes positivas y negativas significativas (p-valor <0.05) entre el NDVI y los parámetros de calidad del agua, principalmente en invierno. Los resultados sugieren que el NDVI es un indicador potencial para analizar la calidad del agua, útil para la implementación de modelos predictivos.

Palabras clave: Calidad del agua, NDVI, Sensoramiento Remoto

INFLUENCE OF VEGETATION COVER ON THE WATER QUALITY OF THE MANTARO BASIN, PERÚ

ABSTRACT

This research determined the influence of vegetation cover, through the NDVI, on water quality in the Mantaro basin, using 27 monitoring points of category 3, established by the ANA. Thirteen parameters were considered: BOD_5, COD, DO, TC, pH, As, Al, Mn, Fe, Cd, Pb, B, and Cu. The NDVI data were downloaded from the MOD13Q1 V6.1 product available in Google Earth Engine. The analysis revealed that the temporal behavior of the water quality parameters varies by season, with maximum values recorded in summer and minimum values in winter for all physicochemical and organic parameters in the Upper and Lower Mantaro basins. In the Middle basin, the maximum values for TC, BOD_5, and COD were recorded in winter and spring. Strong positive and negative correlations (p-value <0.05) were obtained between the NDVI and the water quality parameters,

[a] Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-11, Perú, 11-0058, E-mail: kprizambrano@gmail.com
[b] Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cañete, Lima, Surco, Perú 15056.
[c] Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI), Lima, Jesús María, Perú 15072

primarily in winter. The results suggest that NDVI is a potential indicator for analyzing water quality, useful for the implementation of predictive models

Key words: Water quality, NDVI, Remote sensing

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua es uno de los principales problemas ambientales en el mundo, es así que, al año 1.4 millones de personas mueren por falta de agua potable, saneamiento e higiene adecuado[1]. La contaminación de los cuerpos de agua en las cuencas hidrográficas, están originados por el crecimiento demográfico y las actividades económicas, tales como las malas prácticas de disposición de residuos sólidos, vertimientos de aguas residuales municipales e industriales, entre otros[2,3].

Para el año 2023 en la cuenca Mantaro se identificaron un total de 512 fuentes contaminantes, de los cuales 23 son de origen natural y 488 son de origen antropogénico. Asimismo, del total de fuentes contaminantes de origen antropogénico identificadas, 374 corresponden a aguas residuales, 86 residuos sólidos y 28 sustancias dispuestas "in situ"[4]. Por otro lado, según el registro datos abiertos del Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental, en el año 2022 se registraron 95 denuncias ambientales relacionadas al componente agua en la Cuenca del Mantaro[5].

La calidad del agua en las cuencas es influenciada por la geología, el uso del suelo y las características de la cobertura del suelo[6]. Se ha demostrado a través de investigaciones relaciones fuertes entre la cobertura del uso del suelo, uso de suelos, composición del suelo, el cambio climático, índices espectrales como el Índice de Diferencia Normalizada de Vegetación (NDVI) y la calidad del agua[7,8,9].

En ese sentido, actualmente se han implementado en la cuenca Mantaro 191 puntos de monitoreo por la Autoridad Nacional del Agua (ANA) de los cuales 131 son de categoría 3, 56 de categoría 4, 1 de categoría 1 A1 y 3 de categoría 1 A2[4]. Sin embargo, la frecuencia de monitoreo no es continua o permanente en todos los puntos. Ahora bien, el monitoreo continuo de calidad del agua representa una limitación significativa, debido a los costos que implican. A pesar de ello, es información importante para la toma de decisión y la gestión de los recursos hídricos. Por ello es imperativo utilizar otras herramientas y fuentes de información, como es la generada por satélites, para complementar los monitoreos realizados en campo. En ese sentido, en la presente investigación se utilizará información satelital con la finalidad de determinar la influencia de la cobertura vegetal en la calidad del agua de la cuenca Mantaro.

PARTE EXPERIMENTAL

Base de datos de monitoreo de calidad del agua y NDVI

La base de datos de los monitoreos de calidad de agua, del periodo 2015-2022, se descargaron del Sistema de la plataforma Observatorio Nacional de Recursos Hídricos (ONRH) de la ANA, para lo cual se consideraron sólo 27 de los 131 puntos de muestreo de categoría 3, esto debido a que estos presentaron como mínimo 16 monitoreos.

Los datos del NDVI fueron obtenidos del producto MOD13Q1 V6.1, el cual es calculado a partir de la información del Instrumento Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) del Satélite Terra disponible en el catálogo de Google Earth Engine. Es así que, a través de un código implementado en el Lenguaje Programación JAVA se descargaron los datos de NDVI en la ubicación de cada punto de muestreo establecido por la ANA.

Índice de Calidad Ambiental de los Recursos Hídricos (ICARHS)

Se realizó la determinación del Índice de Calidad Ambiental de los Recursos Hídricos (ICARHS), para ello se utilizó la metodología establecida por la Autoridad Nacional del Agua aprobada mediante la Resolución Jefatural 084-2020-ANA, considerando los siguientes periodos: 2015-10-27 al 2017-10-11 (Periodo 1), 2018-05-02 al 2019-02-27 (Periodo 2), 2019-02-28 al 2020-10-09 (Periodo 3) y 2021-05-31 al 2022-11-02 (Periodo 4).

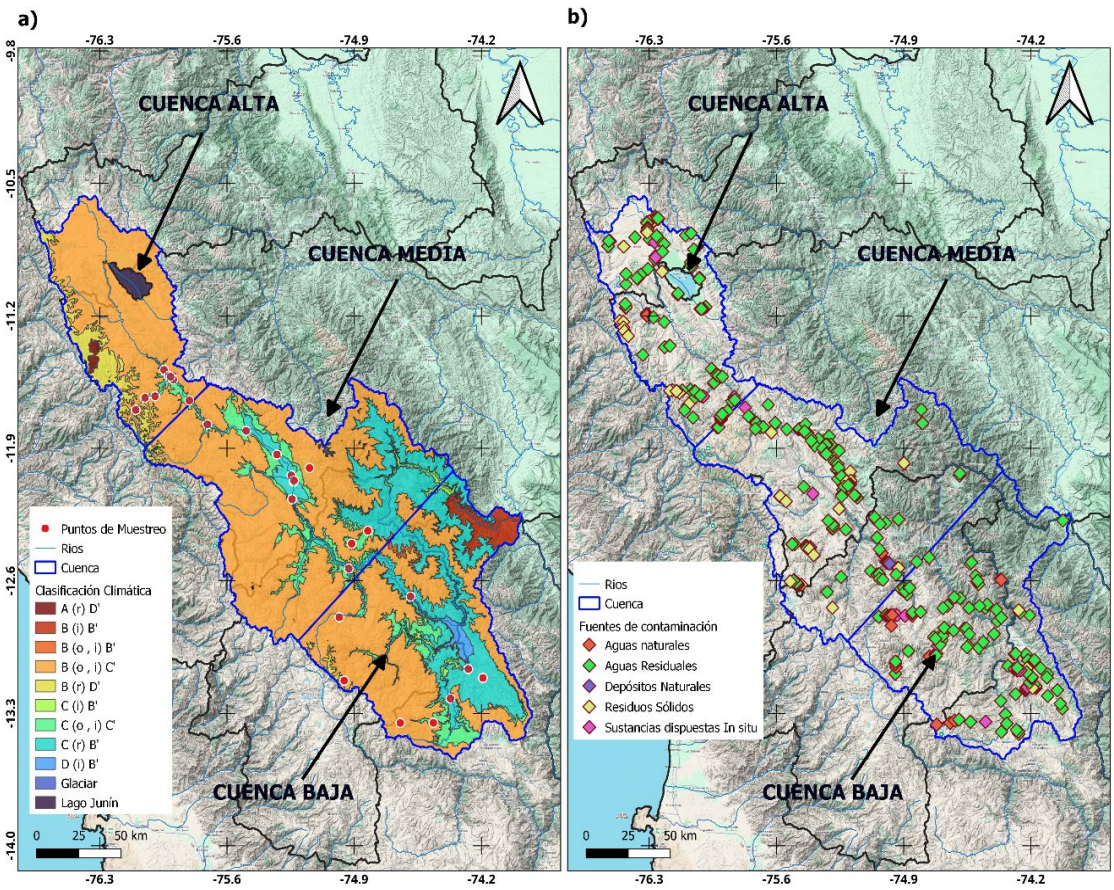


Figura 1. a) Sectores, Clasificación Climática y Puntos de Muestreo; b) Fuentes de contaminación

Análisis espacial

La cuenca Mantaro, tiene una extensión de 34 546,51 km^2 y posee 9 tipos de clima, siendo el clima de tipo lluvioso, frío y con otoño e invierno seco (B (o, i) C'), el cual ocupa la mayor área de la cuenca[10, 11](ver figura 1). Ahora bien, con la finalidad analizar la relación existente entre la cobertura vegetal y la calidad del agua de la cuenca Mantaro, se realizó la sectorización de la cuenca, en 3 tramos[12].

- El primer tramo (cuenca Alta) contenía, los siguientes puntos de monitoreo: RMant3, RMant4, RMant7, RMant9, RYaul1, RYaul4, RYaul6, RYaul7.
- El segundo tramo (cuenca Media) contenía, los siguientes puntos de monitoreo: RMant11, RMant12, RMant13, RMant14, RMant18, RMant19, RPam1, RPam2, RShul1, RShul2, RIchu2.
- El tercer tramo (cuenca Baja) contenía, los siguientes puntos de monitoreo: RMant22, RApac1, RApac2, RCach1, RDisp1, RPall2, RYuca1, RVinc1.

Tabla 1. Fuentes de contaminación en la cuenca Mantaro

Naturaleza/Tipo de fuente de contaminación	Tramo			Total
	Cuenca Alta	Cuenta Media	Cuenca Baja	
Aguas naturales	**4**	**2**	**17**	
Agua Minero-Medicinal (Mineral)			7	
Agua Minero-Medicinal (Termal)	3		2	
Agua Minero-Medicinal (Termo-Mineral)	1	2	8	
Aguas Residuales	**94**	**127**	**153**	
Agroindustriales		2	3	
Agropecuarias	12	2		
Domésticas	20	10	5	
Energéticas		1	1	
Industriales	2		2	
Minero Metalúrgicas	5	12	9	
Municipales	55	100	133	
Depósitos Naturales			**1**	
Depósitos no metálicos			1	
Residuos Sólidos	**33**	**35**	**18**	
Gestión Municipal	17	21	6	
Gestión no municipal - no peligrosos	2	4	10	
Gestión no municipal - peligrosos	14	10	2	
Sustancias dispuestas In situ	**13**	**6**	**9**	
Lavado de material no metálico	11	2	1	
Lavado de ropa	2	4	6	
Material de Acarreo			2	
Sub total	**144**	**170**	**198**	**512**

Fuente: Elaboración propia

Adicionalmente, se realizó la identificación de las fuentes de contaminación por tramo en la cuenca Mantaro, encontrando 512 fuentes, tal como se puede observar en la tabla 1 de los cuales se identificaron fuentes de aguas naturales, 17 en la cuenca baja, 4 en la cuenca alta y 2 en la cuenca media; respecto a la fuentes de aguas residuales, se identificó un mayor número en la cuenca baja de 153, en la cuenca media 127 y en la cuenca baja 94

fuentes; asimismo se identificó fuentes de residuos sólidos, de los cuales 35 se identificaron en la cuenca media, 33 en la cuenca alta y 18 en la cuenca baja; fuentes de sustancia dispuestas in situ que en su mayoría se identificaron en la cuenca alta y una fuente de depósitos naturales en la cuenca baja.

Normalización de datos

Con el propósito de facilitar el análisis de las variables, se realizó la normalización de los rangos de los datos, para lo cual se realizó el proceso de estandarización mediante la siguiente ecuación:

$$x_s = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Donde: X_S es el valor estandarizado de la variable; X es el valor original de la variable; μ es la media (o promedio) de la variable; y σ es la desviación estándar de la variable.

Análisis estadístico

Con la información del NDVI y de los parámetros de calidad del agua, se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov, con finalidad de determinar la distribución de los datos. Posteriormente se utilizó la prueba de correlación Spearman para determinar la relación entre las variables de la presente investigación.
Para lo cual se utilizó la siguiente ecuación:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

Donde: d_i^2 es la diferencia entre los rangos de cada par de datos del NDVI y de los parámetros de calidad del agua elevado al cuadrado; n es el número de datos.
En la tabla 2 se indican los rangos y el tipo de relación del coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla 2. Grado de relación según coeficiente Spearman

Rango de Spearman *rho*	Relación
1 a 0.81	Correlación muy fuerte positiva
0.8 a 0.61	Correlación fuerte positiva
0.6 a 0.41	Correlación moderada positiva
0.40 a 0.21	Correlación débil positiva
0.20 a 0	Correlación negligible positiva
0	No existe correlación
0 a -0.2	Correlación negligible negativa
-0.21 a -0.4	Correlación débil negativa
-0.41 a -0.6	Correlación moderada negativa
-0.61 a -0.8	Correlación fuerte negativa
-0.81 a -1	Correlación muy fuerte negativa

Fuente: Elaboración propia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el periodo del 2015 al 2022, la Autoridad Nacional del Agua realizó monitoreos en la cuenca Mantaro. En la presente investigación se sistematizaron y seleccionaron 27 puntos de monitoreo de categoría 3, los cuales contaban con la misma cantidad de muestreos. Los estadísticos descriptivos de estos puntos de monitoreo se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de las variables

Parámetro	Unidad	Media	Máximo	Mínimo
Fisicoquímicos y Orgánicos				
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5)	mg/L	7.307	321	2
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	20.19	548	0.01
Coliformes Termo tolerantes (CT)	mg/L	1781374	490000000	2
Oxígeno Disuelto (OD)	NMP/100ml	6.043	11.4	1.15
Inorgánicos				
Potencial de hidrógeno (pH)	Unidad de pH	8.098	9.8	3.3
Arsénico (Ar)	mg/L	0.034	0.299	0.0013
Aluminio (Al)	mg/L	1.35	43.07	0.002
Manganeso (Mn)	mg/L	9.04	823.25	0.0015
Hierro (Fe)	mg/L	6.00	364.8	0.0121
Cadmio (Cd)	mg/L	0.0005174	0.0168500	0.0000100
Plomo (Pb)	mg/L	0.015861	0.856900	0.000200
Boro 5 (B5)	mg/L	0.45351	19.9000	0.00200
Cobre (Cu)	mg/L	0.017808	0.647000	0.000030
NDVI		3142	7843	23

En la cuenca Mantaro el comportamiento temporal del NDVI, es marcado según la estación del año, siendo en verano donde se registran los máximos valores y en invierno los menores valores de NDVI (ver figura 2 y 3).

Respecto a los parámetros de calidad del agua fisicoquímicos y orgánicos, también presentan un comportamiento temporal marcado según la estación del año y según el sector de la cuenca, para todos los parámetros en la cuenca Alta y Baja. Con respecto a la cuenca Media, para los CT, DBO_5 y DQO, se registraron los máximos valores en la estación de invierno y primavera.

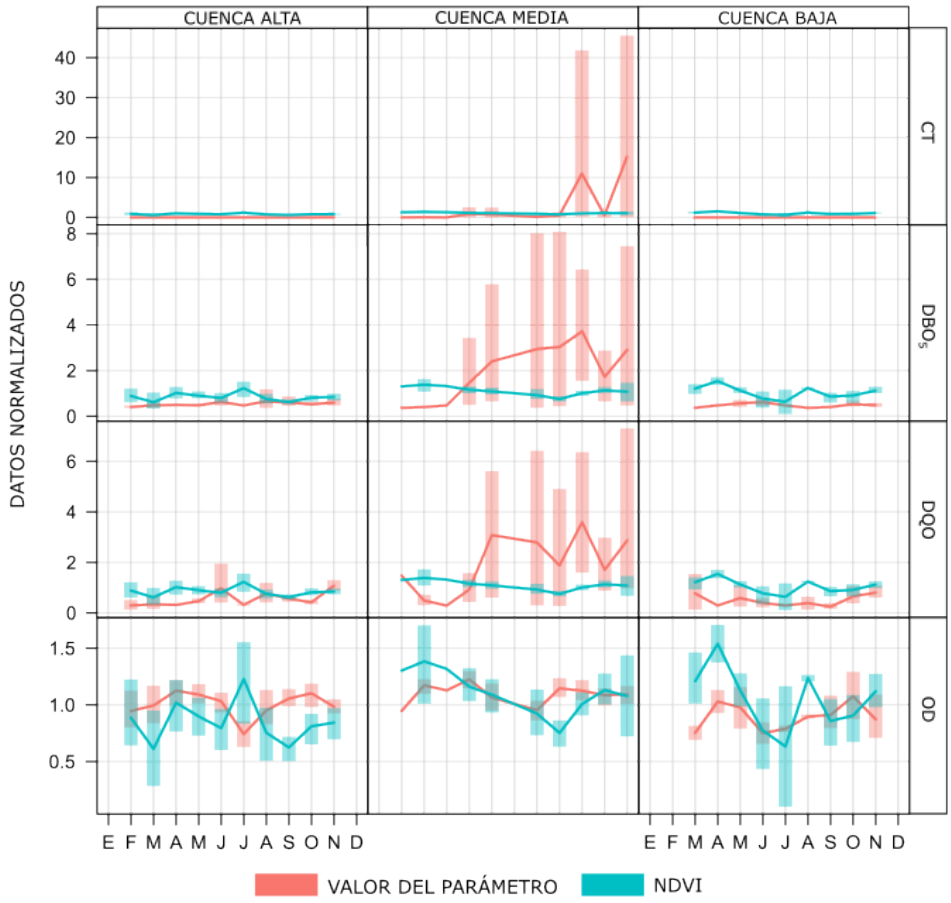


Figura 2. Comportamiento temporal normalizado – parámetros fisicoquímicos y orgánicos

Respecto a los parámetros de calidad del agua inorgánicos, también presentan un comportamiento temporal marcado según la estación del año y según el sector de la cuenca. Cabe destacar que, para estos parámetros, los máximos valores se registraron en la cuenca Alta y Baja (solo para Ar), tal como se puede observar en la figura 3.

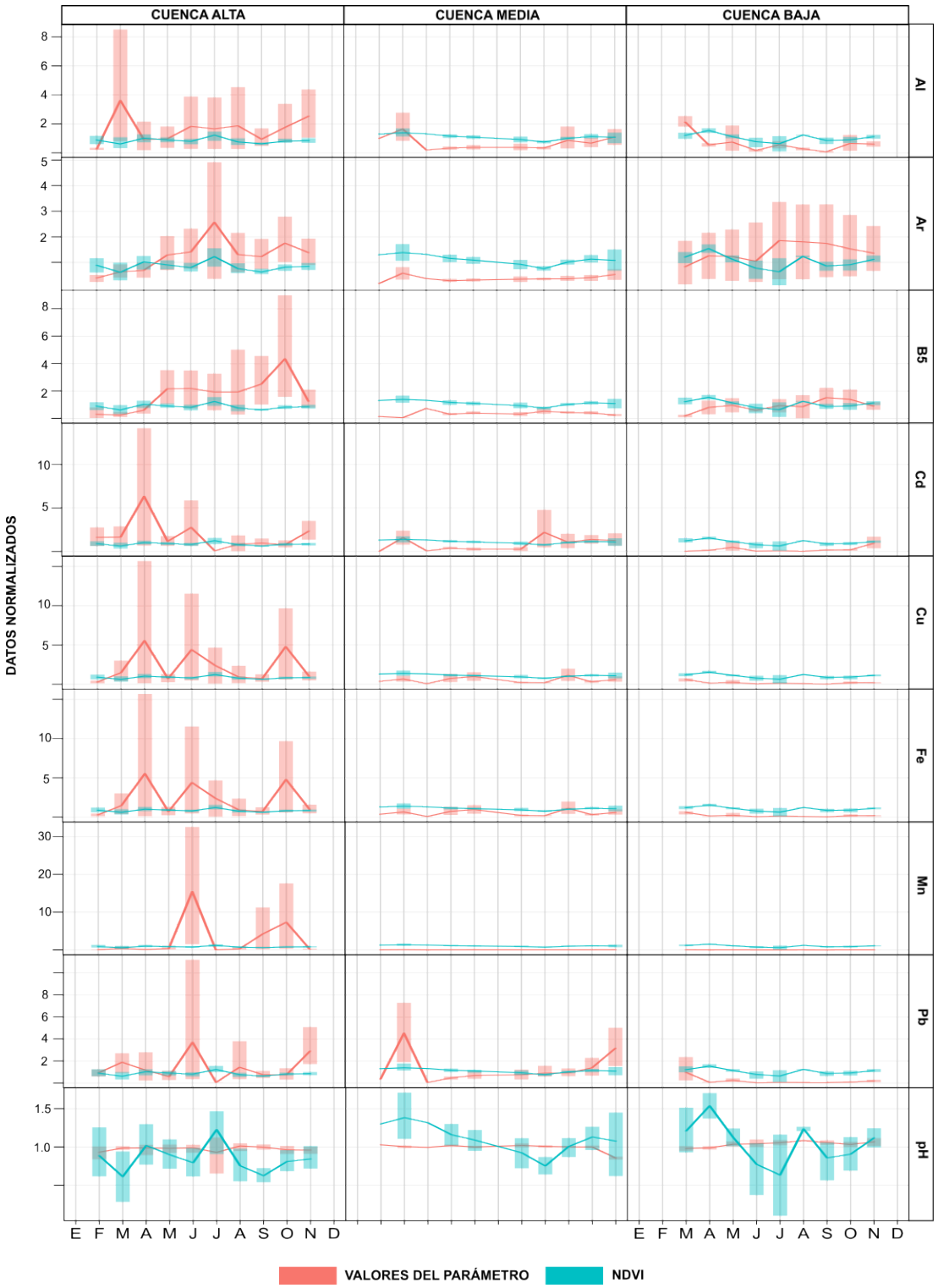


Figura 3. Comportamiento temporal normalizado – parámetros inorgánicos

Durante el periodo en estudio, los parámetros fisicoquímicos y orgánicos frecuentemente superaron sus Estándares de Calidad Ambiental para Agua (ECA-agua), siendo en el sector de la cuenca Media donde se registraron estos, tal como se puede observar en la Figura 4. En particular, los Coliformes Termotolerantes (CT) excedieron su ECA-agua de 20,000 NMP/100 mL, alcanzando valores de hasta 490,000,000 NMP/100 mL; la

Demanda Química de Oxígeno (DQO) superó su valor de ECA-agua de 30 mg/L, con un máximo de 548 mg/L; la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) superó su valor de ECA-agua de 10 mg/L, alcanzando 321 mg/L; y el Oxígeno Disuelto (OD) no cumplió con su ECA-agua de ≥ 4 mg/L, registrando un mínimo de 1.15 mg/l para los parámetros inorgánicos

Ahora bien, para determinar la calidad del agua de la cuenca Mantaro, se utilizó la metodología del ICARHS del ANA, considerando un mínimo de cuatro monitoreos. En los puntos de monitoreo RManta14, RMant18, RMant19, RShul2, RYaul1, RYaul4, RYaul6 y RYaul7, se alcanzó un ICARHS máximo de "Pésimo". Estos puntos fueron afectados principalmente por los componentes orgánicos, los cuales frecuentemente superaron sus ECA-agua.

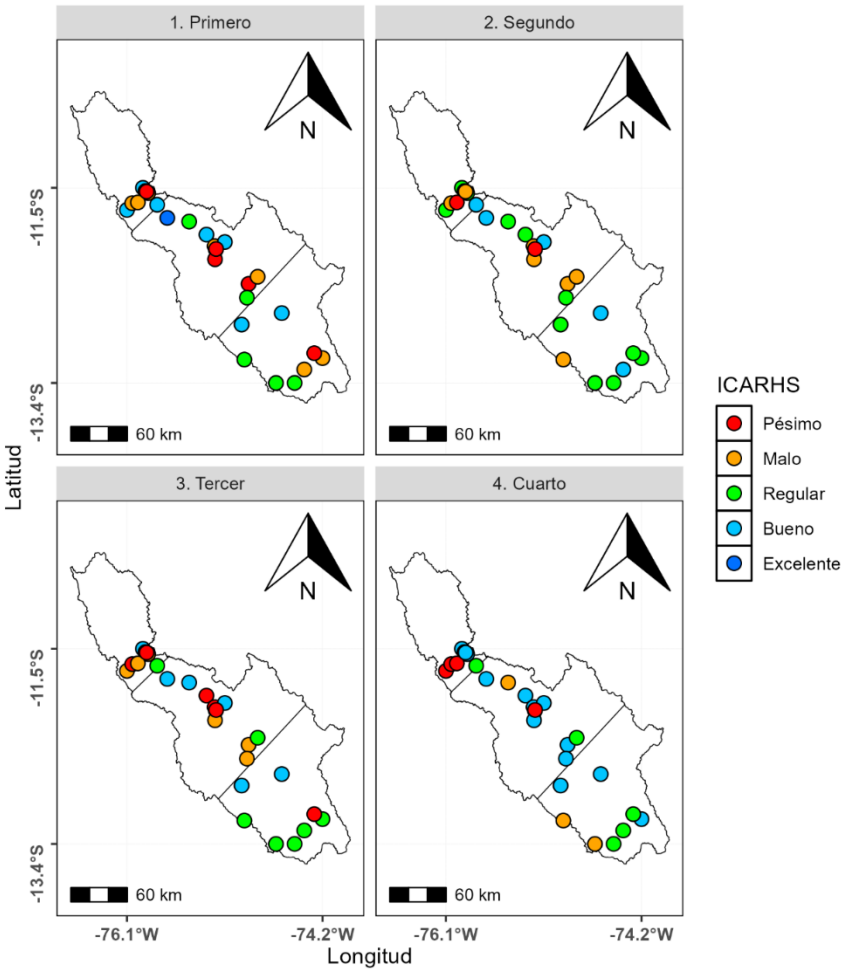


Figura 4. Determinación de ICARHS de los cuatro periodos

Dado que se quería determinar la influencia de la cobertura vegetal a través del NDVI en la calidad del agua, tanto temporal como espacial, inicialmente se realizó pruebas de normalidad para cada uno de los parámetros de calidad del agua y el NDVI utilizando la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Al respecto, se obtuvo que ninguna de las variables presenta una distribución normal (ver tabla 4), por lo cual se optó por utilizar la prueba de Correlación de Spearman, la cual es una prueba no paramétrica.

Tabla 4. Prueba de normalidad

Parámetro	Kolmogórov-Smirnov	
	D	p-value
DBO_5	0.17504	2.20E-16
DQO	0.2601	2.20E-16
OD	0.97178	5.52E-07
CT	0.044406	2.20E-16
pH	0.67751	2.20E-16
Ar	0.56033	2.20E-16
Al	0.35864	2.20E-16
Mn	0.10781	2.20E-16
Fe	0.17229	2.20E-16
Cd	0.30395	2.20E-16
Pb	0.26847	2.20E-16
B5	0.26845	2.20E-16
Cu	0.29514	2.20E-16
NDVI	0.049108	3.67E-12

Al respecto, luego de determinar el tipo de distribución de los datos se aplicó la prueba de correlación de Spearman y se encontraron altas correlaciones estadísticamente significativas (p-valor <0.05), indicando una relación relevante entre la cobertura vegetal y algunos de los parámetros de calidad del agua en la cuenca Mantaro.

En la figura N°5 se observa la variabilidad estacional del coeficiente de correlación de Spearman, destacándose que en invierno se registran los valores máximos de este coeficiente para todas las variables en relación con el NDVI, alcanzando una correlación muy alta positiva (r=1).

En términos de variabilidad espacial, para los Coliformes Termotolerantes (CT), los valores de correlación más altos se encontraron en la cuenca Alta (Tramo 1) y la cuenca Baja (Tramo 3), oscilando entre 0.48 (Correlación moderada positiva) y 1 (Correlación muy fuerte positiva). Para la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5), la cuenca Alta (Tramo 1) presentó el valor de 0.97, la cual se clasifica como Correlación muy fuerte positiva, la cuenca media y baja presentaron valores de 0.01, las que se clasifican como Correlación negligible positiva.

En el caso de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la cuenca Alta (Tramo 1) y la cuenca Baja (Tramo 3), se obtuvieron coeficientes de correlación de 0.97 y 1 respectivamente, las que se encuentran en el rango de Correlación muy fuerte positiva.

Por último, respecto al Oxígeno Disuelto (OD), también fueron la cuenca Alta (Tramo 1) y la cuenca Baja (Tramo 3), donde se obtuvieron los mayores coeficientes de correlación de 0.97 y 1 respectivamente, las que se encuentran en el rango de Correlación muy fuerte positiva.

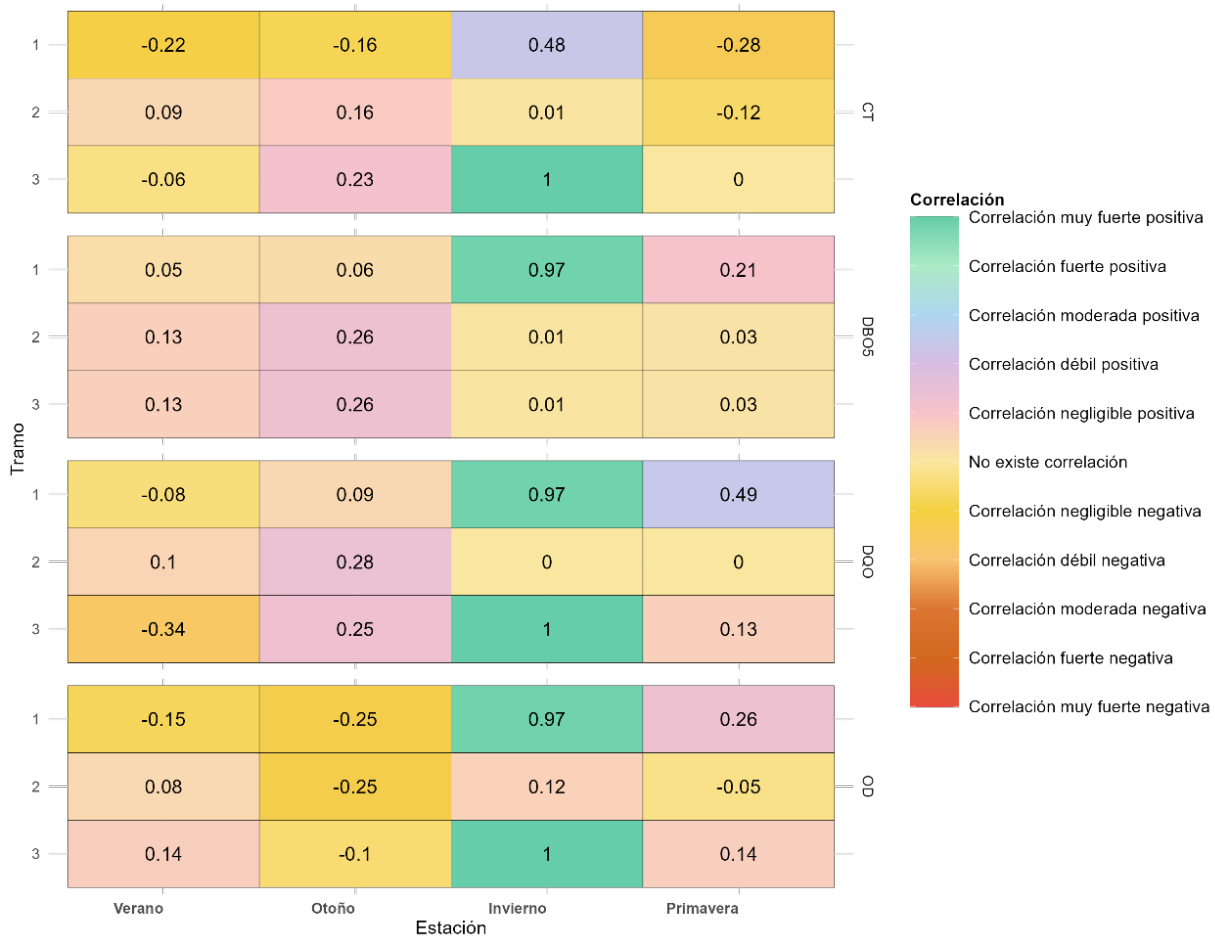


Figura 5. Parámetros Fisicoquímicos y Orgánicos – Coeficiente de correlación de Spearman.

En la figura N°6 se observa la variabilidad estacional del coeficiente de correlación de Spearman. Durante el invierno, se alcanzaron los valores máximos de correlación de Spearman, comprendidos entre -1 y 1, para todos los parámetros evaluados. Para el Aluminio (Al), el análisis espacial muestra una correlación fuerte negativa de -0.69 en la cuenca Alta (tramo 1) y una correlación muy fuerte negativa de -1 en la cuenca Baja (tramo 3). En el caso del Arsénico (Ar), se obtuvo una correlación máxima de 1 en la cuenca Alta (tramo 1) y de -1 en la cuenca Baja (tramo 3) durante el invierno. En verano, la cuenca Media (tramo 2) presentó una correlación fuerte negativa de -0.61. El Boro (B) mostró una correlación muy fuerte negativa de -1 en la cuenca Baja (tramo 3) durante el invierno. Para el Cadmio (Cd), se registraron correlaciones fuertes negativas en la cuenca Baja (tramo 3) y en la cuenca Alta (tramo 1), con valores entre -1 y -0.65, respectivamente. El Cobre (Cu) presentó correlaciones fuertes negativas en la cuenca Baja (tramo 3) y en la cuenca Alta (tramo 1), con valores de entre -1 y -0.7, respectivamente. El Fierro (Fe) también presentó correlaciones fuertes negativas en la cuenca Baja (tramo 3) y en la cuenca Alta (tramo 1), con valores entre -1 y -0.7. El Manganeso (Mn) mostró correlaciones fuertes negativas similares, con valores entre -1 y -0.7, tanto en la cuenca Baja (tramo 3) como en la cuenca Alta (tramo 1). El Plomo (Pb) alcanzó una correlación muy fuerte negativa de -1 durante el invierno en la cuenca Baja (tramo 3). Finalmente, para el pH, en la cuenca Media (tramo 2) se observó una correlación moderada negativa de -0.54 en verano, mientras que en invierno se alcanzaron

correlaciones muy fuertes negativas de -1 en la cuenca Alta (tramo 1) y en la cuenca Baja (tramo 3).

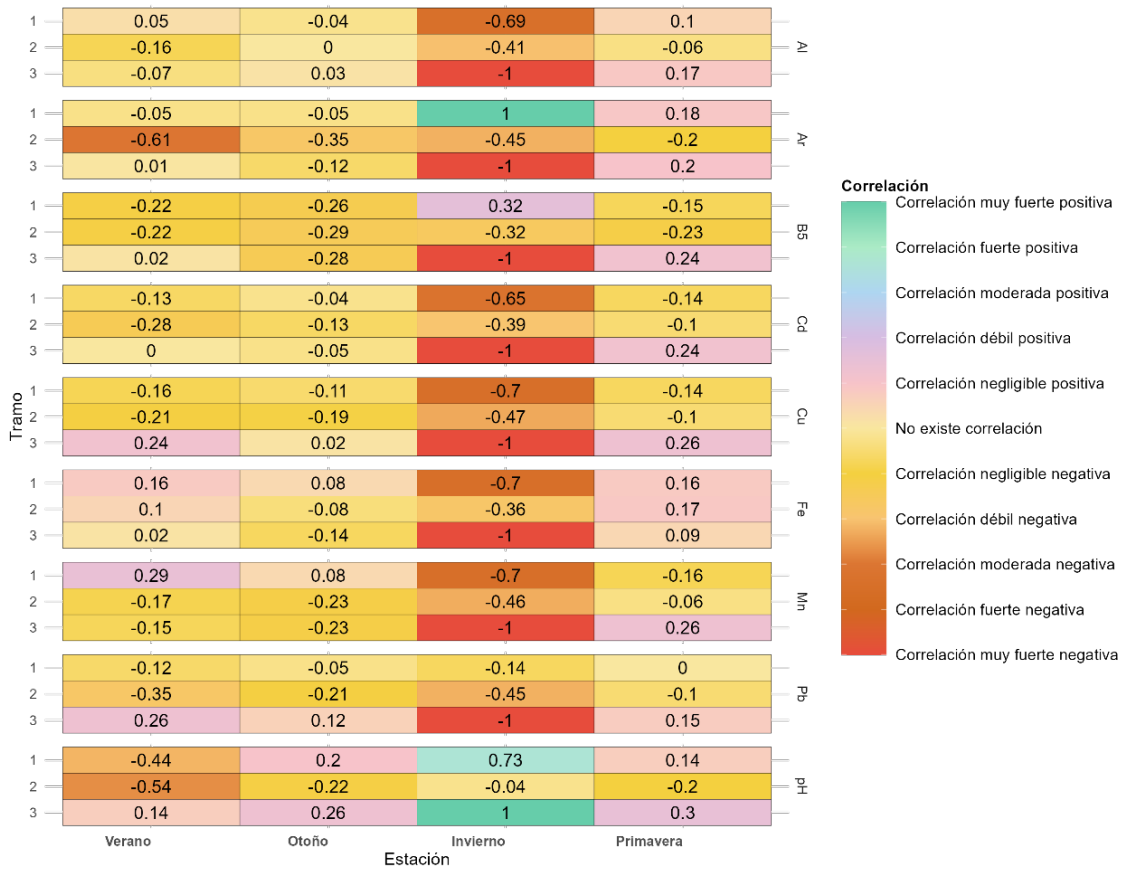


Figura 6. Parámetros Inorgánicos- Coeficiente de correlación de Spearman

Los resultados obtenidos indican que el NDVI, tiene un comportamiento temporal, que es marcado según la estación del año, es así que en verano se alcanzan los máximos valores y en invierno los mínimos valores. Al respecto, los parámetros fisicoquímicos y orgánicos de calidad del agua en la cuenca alta y baja, también presentan un comportamiento marcado por la estación del año, sin embargo, para el caso particular del OD en los tres tramos de la cuenca se cumple este comportamiento estacional. Por otro lado en el caso específico de los CT, DBO_5 y DQO se registraron los máximos valores en la estación de invierno y primavera ubicados en la cuenca Media, lo cual estaría ocasionado, por las fuentes de emisión que están localizadas en este tramo de la cuenca (ver Tabla 1), que por su naturaleza (principalmente aguas residuales) favorecen el incremento en los valores de los CT, DBO_5 y DQO[13] y también por el descenso del caudal, lo que ocasiona poca dilución y dispersión de los efluentes[14,15,16]. Por otro lado, respecto a los parámetros inorgánicos, estos alcanzaron sus máximos valores en la cuenca Alta, lo que estaría originado por las 5 fuentes de emisión de efluentes de aguas residuales Minero Metalúrgica[17].

Existe correlación muy fuerte positiva y negativa entre la cobertura vegetal representada por el NDVI y los parámetros de calidad del agua en la cuenca Mantaro, tal como se observa en la figura 5 y figura 6. Al respecto, Vierira y Christófano[18] encontraron una relación positiva entre seis de catorce parámetros de calidad del agua y el NDVI en una cuenca de clima de invierno seco y verano lluvioso, siendo estos los nitratos, color,

sólidos disueltos, sólidos suspendidos, turbidez y sólidos totales. En la presente investigación, al trabajar con puntos de monitoreo de categoría 3, se evaluaron 13 parámetros (DBO_5, DQO, OD, CT, pH, Ar, Al, Mn, Fe, Cd, Pb, B_5, Cu), todos los cuales mostraron correlaciones muy fuertes, tanto positivas como negativas, principalmente durante la estación de invierno. Este comportamiento podría deberse a que en invierno se registran los caudales mínimos y las precipitaciones más bajas en la cuenca del Mantaro, que presenta un clima lluvioso con otoño e invierno secos[11], por lo cual al haber menos caudales generan menos dispersión y dilución[14,15,16]. Estas condiciones climatológicas son similares a las descritas en el estudio de Vierira y Christófano[18], lo que explica por qué se obtuvieron las mejores correlaciones en invierno en la cuenca Mantaro. Además, el NDVI proporciona información sobre la distribución espacial y la dinámica temporal de la vegetación, factores clave que influyen en la calidad del agua[18,19].

Ahora bien, en la presente investigación, los parámetros fisicoquímicos, orgánicos e inorgánicos, para todos se obtuvieron correlaciones muy altas positivas y negativas en la estación de invierno, a diferencia por lo obtenido por Vierira y Christófano[18] y Sanchez[6], que solo obtuvieron mejores relaciones entre los parámetros fisicoquímicos. Al respecto, se debe indicar que en las mencionadas investigaciones no se incluyeron parámetros orgánicos de calidad del agua, por lo que no se tiene la certeza que en esos estudios hubieran obtenido similares o diferentes resultados que en la presente investigación.

Finalmente, es importante precisar, que el NDVI es un indicador potencial para analizar la calidad del agua, que podría utilizarse para la implementación de modelos para la predicción de la calidad del agua de un cuerpo de agua [6,18,19,21].

CONCLUSIONES

La cobertura vegetal, representada por el NDVI, influye significativamente en la calidad del agua de la cuenca del Mantaro. Se observó una correlación fuerte (positiva y negativa) entre el NDVI y los parámetros de calidad del agua (fisicoquímicos, orgánicos e inorgánicos), lo cual varía según la estación del año, particularmente en invierno.

Los resultados muestran que la calidad del agua en la cuenca del Mantaro varía estacionalmente, alcanzando máximos en verano y mínimos en invierno. Este comportamiento está influenciado por el NDVI, que refleja la dinámica estacional de la vegetación.

La calidad del agua presenta diferencias significativas en las distintas secciones de la cuenca Mantaro. Los parámetros fisicoquímicos y orgánicos alcanzaron sus valores más altos en la cuenca media, donde hay mayor impacto de fuentes de emisión de aguas residuales, mientras que los parámetros inorgánicos se concentraron en la cuenca alta debido a fuentes de efluentes minero-metalúrgicos. Estas variaciones espaciales demuestran cómo las condiciones de vegetación y fuentes de emisión influyen de manera diferenciada en la calidad del agua a lo largo de la cuenca del Mantaro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Saneamiento. [Internet]. OMS; 22 de marzo 2024 [citado 18 jun 2024]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sanitation.
2. Anh NT, Can LD, Nhan NT, Schmalz B, Luu TL. Influences of key factors on river water quality in urban and rural areas: A review. Case Stud Chem Environ Eng. 2023;8:100424. doi:10.1016/j.cscee.2023.100424.
3. Strokal M, Bai Z, Franssen W, Hofstra N, Koelmans AA, Ludwig F, et al. Urbanization: an increasing source of multiple pollutants to rivers in the 21st century. npj Urban Sustain. 2021;1(1):1-13.
4. Visor por Cuencas - ANA. [Internet]. (s. f.). Autoridad Nacional del Agua [citado 22 jul 2024]. Disponible en: https://snirh.ana.gob.pe/VisorPorCuenca/
5. Denuncias SINADA · OEFA - Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental del Perú. [Internet]. (s. f.). OEFA - Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental del Perú. [citado 10 jul 2024]. Disponible en: https://datosabiertos.oefa.gob.pe/dataviews/250325/denuncias-sinada/
6. Ferrer-Sánchez Y, Castillo AJR, Plasencia-Vázquez AH, Abasolo-Pacheco F. Impacto del uso de suelo y la fragmentación del paisaje sobre la calidad del agua del río Teaone en Ecuador. Rev Int Contam Ambient. 2024; 40:15-36.
7. Haidary A, Amiri BJ, Adamowski J, Fohrer N, Nakane K. Assessing the Impacts of Four Land Use Types on the Water Quality of Wetlands in Japan. Water Resour Manage. 2013;27(7):2217-29.
8. Hosseini N, Johnston J, Lindenschmidt KE. Impacts of Climate Change on the Water Quality of a Regulated Prairie River. Water. 2017;9(3):199. doi:10.3390/w9030199.
9. Torres-Bejarano F, Torregroza-Espinosa AC, Martínez-Mera E, González-Márquez LC. Impact of land cover changes on water quality: an application to the Guájaro reservoir, Colombia. Int J Environ Sci Technol. 2023;20(4):3577-90.
10. Autoridad Nacional del Agua. Evaluación de recursos hídricos en la cuenca de Mantaro. [Internet]. ANA; noviembre 2015. [Citado 23 set 2024]. Disponible en: https://repositorio.ana.gob.pe/handle/20.500.12543/36
11. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Mapa climático del Perú. [Internet]. SENAMHI; 2020. [Citado 10 set 2024]. Disponible en: https://www.senamhi.gob.pe/mapas/mapa-climatico-v2/
12. EcuRed. Río Mantaro [Internet]. ECURED; 2022. [Citado 10 oct 2024]. Disponible en: https://www.ecured.cu/R%C3%ADo_Mantaro
13. Gqomfa B, Maphanga T, Shale K. The impact of informal settlement on water quality of Diep River in Dunoon. Sustain Water Resour Manag. 2022;8(1):27. doi:10.1007/s40899-022-00629-w
14. Hashemi Monfared SA, Dehghani Darmian M, Snyder SA, Azizyan G, Pirzadeh B, Azhdary Moghaddam M. Water Quality Planning in Rivers: Assimilative Capacity and Dilution Flow. Bull Environ Contam Toxicol. 2017;99(5):531-41.
15. Tilahun AB, Dürr HH, Schweden K, Flörke M. Perspectives on total phosphorus response in rivers: Examining the influence of rainfall extremes and post-dry rainfall. Sci Total Environ. 2024 Aug 25;940:173677. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173677.
16. Bae HK. Changes of River's Water Quality Responded to Rainfall Events. Environ Ecol Res. 2013;1(1):21-5.

17. Qasem NAA, Mohammed RH, Lawal DU. Removal of heavy metal ions from wastewater: a comprehensive and critical review. npj Clean Water. 2021;4(1):1-15.
18. Resende Vieira F, Christofaro C. Contributions of the vegetation index (NDVI) in water quality prediction models in a semi-arid tropical watershed. J Arid Environ. 2024;220:105122. doi:10.1016/j.jaridenv.2024.105122.
19. Griffith JA, Martinko EA, Whistler JL, Price KP. Interrelationships Among Landscapes, Ndvi, and Stream Water Quality in the U.s. Central Plains. Ecol Appl. 2002;12(6):1702-18.
20. Alberti M, Booth D, Hill K, Coburn B, Avolio C, Coe S, et al. The impact of urban patterns on aquatic ecosystems: An empirical analysis in Puget lowland sub-basins. Lands Urban Plan. 2007;80(4):345-61.

DOI: 10.37761/rsqp.v90i2.472

Recibido : 15.10.24
Aceptado : 13.12.24

PREDICCIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE SIDERÓFOROS USANDO REDES NEURONALES ARTIFICIALES

Jesús Alvarado-Huayhuaz[a], Miquéias Amorim Santos Silva[b], Karina dos Santos Machado[b], Ana Cecilia Valderrama Negrón*[a]

RESUMEN

El coeficiente de partición octanol-agua (logP) es un indicador importante en el estudio de lipofilia y permeabilidad celular, por ello, es un descriptor molecular recurrente en las reglas empíricas que evalúan la farmacocinética de una molécula. Los sideróforos son moléculas de interés farmacológico, debido a su potencial efecto caballo de Troya, sin embargo, encontramos dos problemáticas principales, su peso molecular mayor a 500 Dalton y la falta de bases de datos con información de las coordenadas atómicas de la estructura tridimensional y descriptores moleculares. En este trabajo, hemos creado una base de datos con el código SMILES de los sideróforos, nombre, microorganismo asociado, descriptores moleculares, entre otros, que se encuentra disponible en nuestro repositorio https://github.com/inefable12/siderophores_database. También creamos una página web para visualizar las estructuras 2D y 3D (https://sideroforos.streamlit.app). Además, demostramos una manera rápida y eficiente de estimar el logP para los sideróforos, usando redes neuronales artificiales en R. La información que proveemos en este artículo permitirá facilitar el estudio estructural de los sideróforos, el diseño de potenciales metalofármacos, la generación de sus estructuras tridimensionales para simulaciones con docking y dinámica molecular, así como también, el desarrollo de nuevos modelos predictivos de propiedades empleando inteligencia artificial.

Palabras clave: Coeficiente de partición, logP, sideróforo, redes neuronales artificiales.

PREDICTION OF SIDEROPHORES PARTITION COEFFICIENT USING ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS

ABSTRACT

The octanol-water partition coefficient (logP) is a crucial indicator in the study of lipophilicity and cell permeability, making it a recurring molecular descriptor in empirical rules for evaluating a molecule's pharmacokinetics. Siderophores are pharmacologically relevant molecules due to their potential Trojan horse effect; however, two major challenges arise: their molecular weight often exceeds 500 Daltons, and there is a lack of

[a] Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx
[b] COMBI-Lab, Grupo de Biologia Computacional, Centro de Ciências Computacionais, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

databases containing atomic coordinates of their three-dimensional structures and molecular descriptors. In this work, we have created a database containing the SMILES codes of siderophores, their names, associated microorganisms, molecular descriptors, among other information, which is available in our repository at https://github.com/inefable12/siderophores_database. We have also developed a web page to visualize the 2D and 3D structures (https://sideroforos.streamlit.app). Additionally, we demonstrate a quick and efficient way to estimate the logP for siderophores using artificial neural networks in R. The information provided in this article aims to facilitate the structural study of siderophores, the design of potential metallodrugs, the generation of their three-dimensional structures for docking and molecular dynamics simulations, as well as the development of new predictive models for properties using artificial intelligence.

Keywords: Partition coefficient, logP, siderophore, artificial neural networks.

INTRODUCCIÓN

Una molécula con potencial actividad farmacológica debe poseer ciertas características químicas que favorezcan su biodisponibilidad, permeabilidad celular, solubilidad, entre otros. Muchas propiedades químicas o descriptores se pueden estimar con modelos computacionales o *in silico* y pueden facilitar su selección en bases de datos moleculares, para luego ser estudiadas *in vitro*. Existen reglas empíricas para evaluar la capacidad de una molécula de convertirse en un fármaco, conocida como drogabilidad o druglikeness, y algunas de las reglas más populares son las de Lipinski (1), Ghose (2), Veber (3), Egan (4) y Muegge (5). Estas consideran un rango de valores para la masa molecular, el área de superficie polar topológica (TPSA), el número de átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno, entre otros, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Druglikeness de reglas empíricas clásicas.

Modelo	Druglikeness	Ref.
Lipinski	MW<500, logP<4.15, N ó O <10, NH ó OH <5	(1)
Ghose	160<MW<480, -0.4<logP<5.6, 40<MR<130, 20<átomos<70	(2)
Veber	Enlaces rotables <10, TPSA <140	(3)
Egan	logP<5.88, TPSA<131.6	(4)
Muegge	200<MW<600, -2<logP<5, TPSA<150, anillos<7, C>4, heteroátomos>1, enlaces rotables< 15, HBA<10, HBD<5	(5)

MW: masa molecular, logP: coeficiente de partición agua-octanol, MR: refractividad molar, TPSA: área superficial polar topológica, HBA: aceptor de enlace puente de hidrógeno, HBD: donador de enlace puente de hidrógeno.

Uno de los parámetros más recurrentes es el coeficiente de partición, que consiste en la relación de las concentraciones de la molécula en estudio entre dos disolventes inmiscibles en equilibrio. El coeficiente de partición octanol-agua (logP) se utiliza como una medida de lipofilia y un indicador general de la permeabilidad celular (6), con valores

óptimos reportados entre 1 y 3. Se han desarrollado varias herramientas para la predicción de logP (7), principalmente para ahorrar en reactivos químicos, esfuerzo y tiempo. De este modo, encontramos métodos basados en mecánica cuántica (ab initio, semiempíricos, DFT, etc.), que requieren el cálculo de la energía electrónica de la molécula en octanol, agua y vacío, para estimar el logP mediante la determinación del valor de la Energía Libre de Gibbs. Estos métodos son menos adecuados para su aplicación en grandes bases de datos debido a su alto costo computacional. Métodos menos costosos, y por lo tanto considerados estándar, se basan en la suma de las contribuciones al logP por átomo o grupo funcional (también llamado fragmento) (8–14). Aunque estos métodos presentan un buen grado de predicción, tienen diferentes limitaciones, como valores irreales, sesgo que subestima el logP, número limitado de átomos de metales de transición, entre otros. Con respecto al uso de metales de transición (15), es necesario generar bases de datos de compuestos bioinorgánicos (16) debido al significativo potencial farmacológico representado por complejos o compuestos de coordinación entre biometales y fármacos orgánicos. Estos posibles metalofármacos exhiben una alta versatilidad química en términos de farmacocinética y farmacodinámica.

R es uno de los lenguajes de programación más utilizados en quimioinformática, biología estructural e inteligencia artificial, entre otros (17,18). Algunas bibliotecas en R facilitan el preprocesamiento y la visualización de datos, el desarrollo de redes neuronales o el uso de computación paralela en los procesadores; las que usamos en este trabajo se mencionan específicamente a continuación. Tidyverse es un conjunto de paquetes en R diseñados para facilitar y mejorar el flujo de trabajo en análisis y manipulación de datos (19). Tidyverse proporciona un conjunto coherente y consistente de herramientas para realizar tareas comunes en análisis de datos, como tibble, ggplot2, entre otros. DoParallel es otro paquete en R que se utiliza para facilitar la ejecución paralela de tareas en múltiples núcleos de procesadores (20). La ejecución paralela implica realizar múltiples tareas simultáneamente, distribuyendo la carga de trabajo entre los diferentes núcleos de procesadores de una computadora. Esto puede conducir a mejoras significativas en la velocidad de ejecución y la eficiencia del programa, especialmente cuando se trata de operaciones intensivas computacionalmente. El paquete caret (Classification And REgression Training) en R es una herramienta versátil y poderosa que ayuda eficientemente en la creación, evaluación y ajuste de modelos de aprendizaje automático (21). Su objetivo es simplificar y estandarizar el proceso de desarrollo de modelos, desde la preparación de datos hasta la evaluación y selección del modelo. El paquete VIM (Visualization and Imputation of Missing Values) en R está diseñado específicamente para abordar el problema de los valores faltantes en los conjuntos de datos (22). Los valores faltantes son una ocurrencia común en el análisis de datos y pueden ser problemáticos, potencialmente introduciendo sesgos o afectando la calidad del análisis y los resultados del modelo. El paquete neuralnet en R es una herramienta utilizada para construir y entrenar redes neuronales artificiales (ANNs). Las ANNs son un tipo de modelo de aprendizaje automático inspirado en la estructura y funcionamiento del cerebro humano. Estas redes son capaces de aprender a partir de datos y realizar tareas como clasificación, regresión y reconocimiento de patrones. En este trabajo, proponemos la predicción de logP utilizando redes neuronales en el lenguaje de programación R, basada en una base de datos original compuesta por moléculas con una masa molecular superior a 500 Daltons. Estas moléculas son de interés en la química bioinorgánica medicinal debido a su alta afinidad por el hierro (sideróforos). La predicción del logP para sideróforos nos permitirá filtrar rápidamente moléculas con el potencial de llevar a cabo

la estrategia farmacológica del efecto Caballo de Troya, que involucra la internalización de metales abióticos en microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos.

PARTE EXPERIMENTAL

En este trabajo desarrollamos una base de datos de sideróforos y mostramos cómo a través de la generación de sus descriptores moleculares podemos predecir eficientemente su coeficiente de partición (LogP). Primero, hemos creado nuestra base de datos de 232 sideróforos mediante una búsqueda en la literatura científica en repositorios y páginas web. Se extrajeron los códigos SMILES (23) de las estructuras o se generaron si en caso no estaban disponibles. Para esta tarea nos apoyamos de Avogadro y además desarrollamos la página web https://quimicaorganica.streamlit.app. Esta web es de acceso libre y fue desarrollada usando recursos de código abierto. Usando el código SMILES generamos las coordenadas tridimensionales y pre-optimizamos las estructuras usando el algoritmo de descenso de gradiente y el campo de fuerza MMFF94 con Open Babel. Después de generar las 232 estructuras tridimensionales en formato MOL2, utilizamos el programa RFL-Score (24) para extraer 250 descriptores químicos utilizando los programas de quimioinformática Padel (25) y RDKit (26), donde nuestro atributo a predecir es el logP, indicado como MolLogP. Los paquetes de R: Tidyverse, doParallel, caret, VIM, neuralnet, y modelr, fueron empleados para realizar el preprocesamiento de datos, la eliminación recursiva de características (RFE), la separación de los datos (80% para el entrenamiento y 20% para la prueba), el desarrollo del modelo y el cálculo de métricas de evaluación, como ya hemos reportado previamente (27). Este procedimiento se resume en la Figura 1.

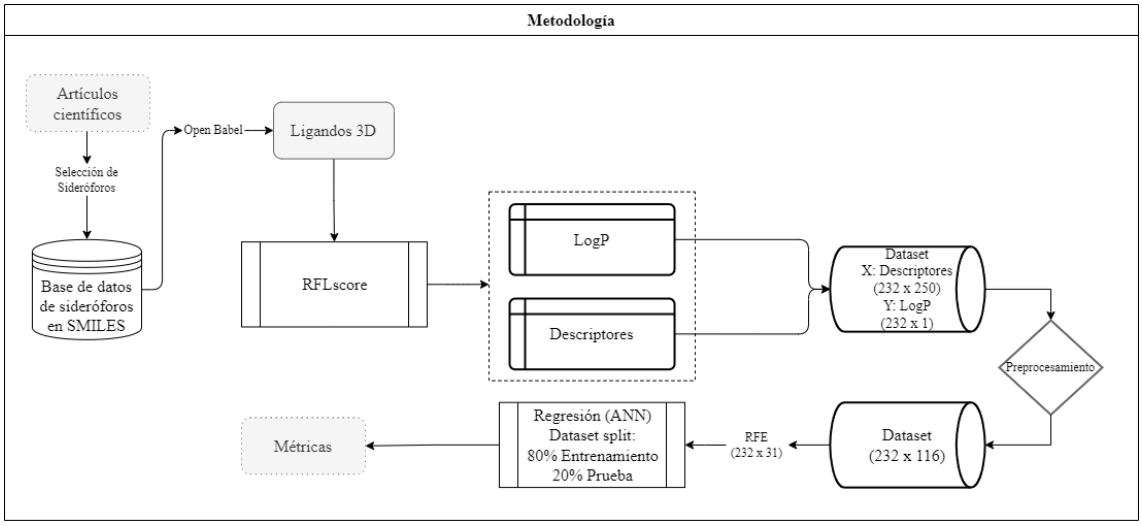


Figura 1. Resumen de la metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La base de datos moleculares en formato CSV (separado por comas), los descriptores generados, las estructuras tridimensionales, el modelo y los códigos implementados se encuentran disponibles en nuestro repositorio: https://github.com/inefable12/logP_ann. De los 250 descriptores obtenidos con Padel y RDKit (Figura 2), una gran cantidad estaba compuesta de ceros, por lo cual, desarrollamos un script para considerar las columnas con un mayor aporte de datos no nulos. De esta manera, conservamos únicamente 116 columnas de las 250 iniciales, que contenían al menos 150 datos diferentes de cero, lo cual significó una disminución del 46% del total de atributos. También se incorporó una columna con el tipo de sideróforo a la base de datos. Esta información es valiosa para posteriores investigaciones asociadas con el desarrollo de modelos de clasificación basado en descriptores moleculares.

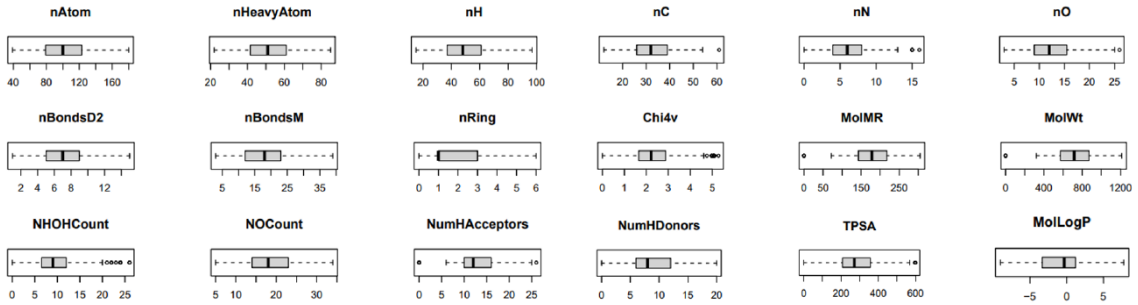


Figura 2. Boxplots de algunos atributos en nuestra base de datos.

Durante la selección de atributos con RFE aplicada a los 116 atributos, se identificó un menor error cuadrático medio (RMSE) en la validación cruzada repetida cuando se utilizaron 31 atributos, como se destaca con un punto azul en la Figura 3. Estos corresponden a los descriptores: TPSA, PEOE_VSAn (n: 1, 6, 7, 8, 9, 10, 12), nN, SlogP_VSA5, SlogP_VSAm (m: 1, 6, 7), SlogP_VSA2, SA_EState7, MQNs_polarity_counts_hba, Chi3v, SMR_VSA5, MQNs_atom_counts_ao, NumHeteroatoms, Kappa3, NOCount, NumHDonors, nC, FractionCSP3, Chi2v, MQNs_atom_counts_c, SMR_VSA3, BalabanJ, SMR_VSA7, NHOHCount. En seguida los datos fueron normalizados y particionados en conjuntos de entrenamiento (80%) y prueba (20%) para la siguiente etapa.

La arquitectura de la ANN consistió en 31 descriptores como entrada (input), 3 capas ocultas (3, 5 y 3 neuronas, respectivamente) y 1 salida, la predicción de LogP (Figura 4). Al representar gráficamente los datos de prueba, "LogP real" frente a los valores predichos o "LogP predicho" observamos la tendencia de estos valores (Figura 5). La regresión lineal nos da 0.99, 0.011, 0.00012, 0.0083 para las métricas R^2, RMSE, MSE y MAE, respectivamente, lo cual es un indicador de la alta precisión del modelo, como se observa en la Figura 5. Empleamos un script para distribuir la ejecución de cálculos en los procesadores en paralelo, lo cual permitió poder explorar diferentes combinaciones de capas ocultas, número de neuronas y tasa de aprendizaje, sin depender del uso de supercomputación que es habitual en estos casos.

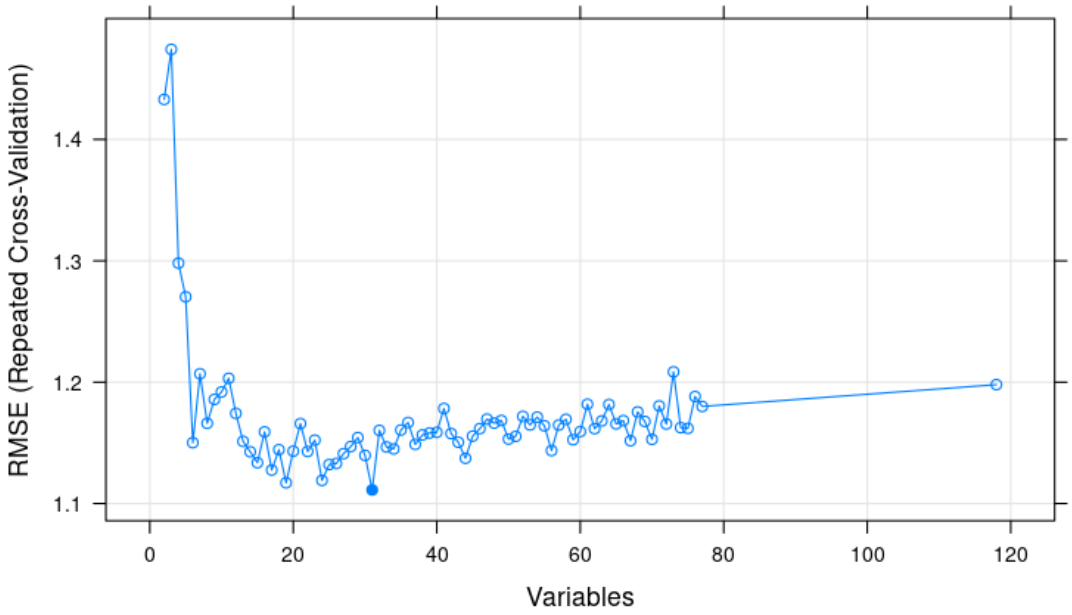


Figura 3. RMSE y validación cruzada respecto al número de variables.

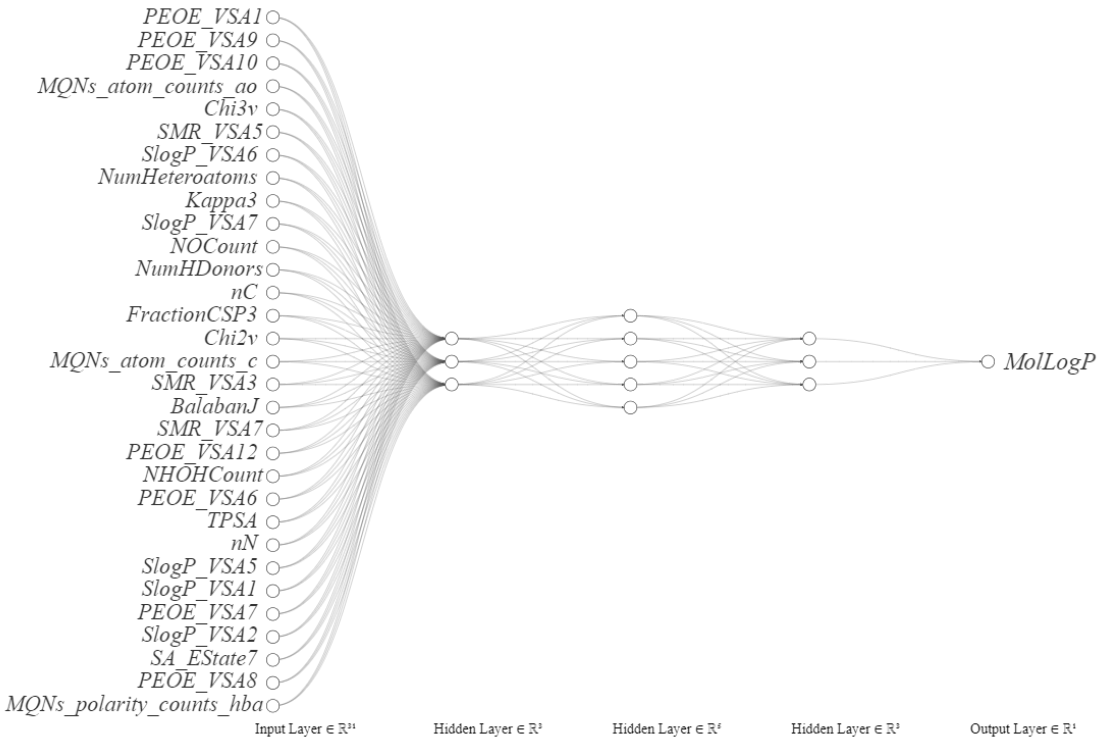


Figura 4. Red neuronal: 31 inputs, 3 capas ocultas (3, 5 y 3 neuronas) y 1 output.

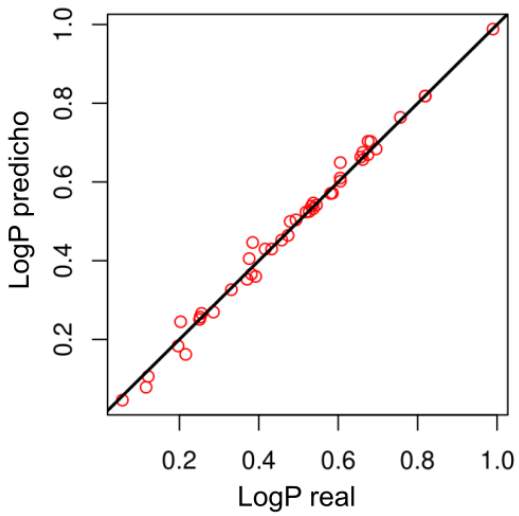


Figura 5. Valores de LogP normalizados del grupo de prueba.

Si bien estamos demostrando la obtención de un modelo con excelentes métricas para la predicción del target, en general es requerido realizar una optimización de hiperparámetros lo cual requiere de computación de alto rendimiento, como se han reportado en otros trabajos. Tetko y colaboradores trabajaron la predicción de logP basado en el método de distribución atómica reportando un R^2 de 0.918, utilizando un generador de descriptores comercial (MOE) y SMARTS, un codificador molecular más sofisticado que SMILES (18), mientras que otra publicación reciente basada en aprendizaje por transferencia predice el logP de pequeñas moléculas de un conjunto de datos de Reaxys y PhysProp con un R2 de 0.988 (13). Por lo tanto, destacamos nuestro procedimiento por tratarse de un modelo eficiente y constituido con herramientas de código abierto. Finalmente, la base de datos es también accesible desde https://sideroforos.streamlit.app, desde dispositivos móviles y computadoras en cualquier sistema operativo (Figura 6).

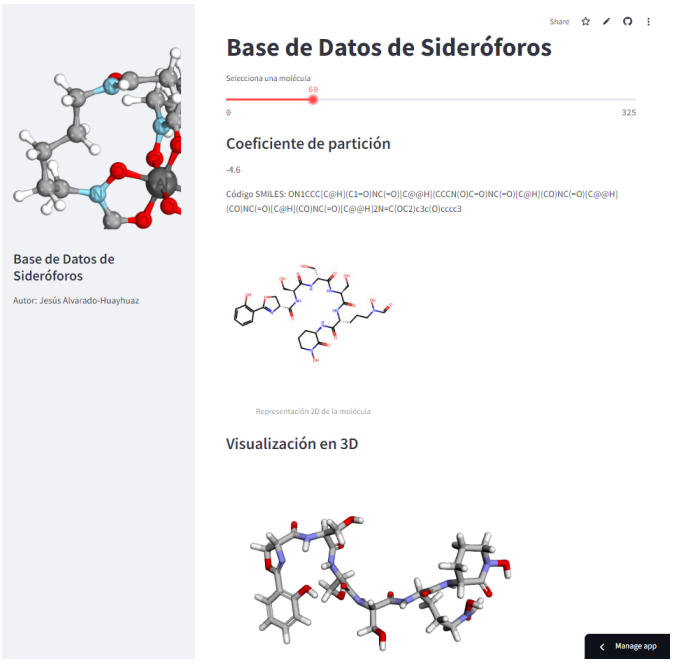


Figura 6. Página web para la visualización de la base de datos de sideñoforos.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha generado una base de datos única que incluye el código SMILES, las coordenadas atómicas tridimensionales y 250 descriptores moleculares de 232 sideróforos, lo que permitirá a otros investigadores trabajar más fácilmente en estudios de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de estas moléculas. Se ha demostrado que es posible predecir el coeficiente de partición octanol-agua (logP) de los sideróforos mediante redes neuronales artificiales con un alto grado de precisión ($R^2 = 0.99$). Este método es particularmente relevante, dado que el cálculo experimental del logP es costoso y la predicción computacional tradicional se ve limitada por la masa molecular y el tipo de átomos en las moléculas. A diferencia de otros estudios que dependen de herramientas computacionales costosas y bases de datos comerciales, este trabajo demuestra que es posible obtener modelos predictivos eficientes utilizando recursos computacionales domésticos y software de código abierto, lo que facilita su aplicación en una variedad de entornos de investigación. La base de datos y el modelo desarrollado proporcionan una herramienta valiosa para estudios de fármacos basados en el efecto Caballo de Troya, la simulación molecular y el desarrollo de nuevos modelos predictivos en química medicinal. Aunque se ha logrado una excelente precisión en la predicción del logP, destacamos también la necesidad de optimizar los hiperparámetros del modelo para obtener resultados aún más robustos, particularmente si se emplean técnicas de computación de alto rendimiento. Este estudio sienta las bases para investigaciones futuras en el campo de la quimioinformática y el diseño de fármacos basados en sideróforos, utilizando inteligencia artificial para abordar desafíos clave en la predicción de propiedades moleculares.

AGRADECIMIENTO

JAAH agradece a FONDECYT (Convenio 237- 2015-FONDECYT) por la concesión de la beca de doctorado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1. Adv Drug Deliv Rev. 2001;46(1):3–26.
2. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. J Comb Chem. 1999;1(1):55–68.
3. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J Med Chem. 2002 Jun 6;45(12):2615–23.
4. Egan WJ, Merz Kenneth M., Baldwin JJ. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. J Med Chem. 2000;43(21):3867–77.
5. Muegge I, Heald SL, Brittelli D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. J Med Chem. 2001;44(12):1841–6.

6. Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. Chem Rev. 1971;71(6):525–616.
7. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017;7(1):42717.
8. Fu L, Ye F, Feng Y, Yu F, Wang Q, Wu Y, et al. Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease. Nat Commun. 2020;11(1):4417. doi: 10.1038/s41467-020-18233-x. .
9. Cheng T, Zhao Y, Li X, Lin F, Xu Y, Zhang X, et al. Computation of Octanol−Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. J Chem Inf Model. 2007;47(6):2140–8.
10. Ghose AK, Crippen GM. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. J Chem Inf Comput Sci. 1987;27(1):21–35.
11. Plante J, Werner S. JPlogP: an improved logP predictor trained using predicted data. J Cheminform. 2018 Dec 14;10(1):61. doi: 10.1186/s13321-018-0316-5.
12. Tetko I V, Tanchuk VY. Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program. J Chem Inf Comput Sci. 2002;42(5):1136–45.
13. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. J Mol Graph Model. 2002;21(1):47–9.
14. Goss K-U. Predicting the equilibrium partitioning of organic compounds using just one linear solvation energy relationship (LSER). Fluid Phase Equilib. 2005;233(1):19–22.
15. Chen Y-K, Shave S, Auer M. MRlogP: Transfer Learning Enables Accurate logP Prediction Using Small Experimental Training Datasets. Processes. 2021;9(11):2029. doi: 10.3390/pr9112029.
16. Medina-Franco JL, López-López E, Andrade E, Ruiz-Azuara L, Frei A, Guan D, et al. Bridging informatics and medicinal inorganic chemistry: Toward a database of metallodrugs and metallodrug candidates. Drug Discov Today. 2022;27(5):1420–30.
17. Mente S, Kuhn M. The Use of the R Language for Medicinal Chemistry Applications. Curr Top Med Chem. 2012;12(18):1957–64.
18. Rodríguez-Pérez R, Miljković F, Bajorath J. Machine Learning in Chemoinformatics and Medicinal Chemistry. Annu Rev Biomed Data Sci. 2022;5(1):43–65.
19. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. J Open Source Softw. 2019;4(43):1686. doi: 10.21105/joss.01686.
20. Corporation M, Weston S. doParallel: Foreach Parallel Adaptor for the "parallel" Package. CRAN: Contributed Packages. 2011. [citado 11 jul 2024]. Disponible en: https://cran.r-project.org/package=doParallel
21. Kuhn M. Caret: classification and regression training. Astrophys Source Code Libr. [Internet]. 2015;ascl-1505. [citado 20 set 2024]. Disponible en: https://ascl.net/1505.003
22. Blomquist R, Lell RM, Gelbard EM. VIM: a continuous energy Monte Carlo code at ANL. United States; 1980 p. 31-46

.

23. Weininger D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. J Chem Inf Comput Sci. 1988;28(1):31–6.
24. Arrua OE, Aderhold A, Werhli A V., Dos Santos Machado K. RFL-Score: Random Forest with Lasso Scoring Function for Protein-Ligand Molecular Docking. In: 2024 IEEE Conference on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB) [Internet]. IEEE; 2024. p. 1–8. [citado 15 jul 2024]. Disponible en: https://ieeexplore.ieee.org/document/10702128/
25. Yap CW. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. J Comput Chem. 2011;32(7):1466–74.
26. Landrum G. RDKit: Open-source cheminformatics. [Internet]. [Citado 13 set 2024]. Disponible en: https://www.rdkit.org
27. Alvarado-Huayhuaz JA, Amorim Santos Silva M, Jimenez Peña EM, Claudio Rengifo Maraví J, Cordova-Muñoz AM, dos Santos Machado K. Artificial Neural Networks for the Rapid Prediction of Possible Ferroptosis Inducers Using the GPx4 Enzyme. In: 2024 IEEE Conference on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB). Natal, Brazil; 2024. pp. 1–6. doi: 10.119/CIBCB58642.2024.10702169.

DOI 10.37761/rsqp.v90i2.473

Recibido 04.11.24
Aprobado 03.01.25

SINTESIS Y CARACTERIZACION DE POLIMEROS TELEQUELICOS DE 2-OXAZOLINAS

Juan Carlos Rueda*[a], Hellyn Gudiel Honores[a]

RESUMEN

Se sintetizaron nuevos polímeros telequélicos funcionalizados conteniendo grupos etil xantato y vinilo en el final de cadena. La síntesis fue llevada a cabo mediante la polimerización catiónica por apertura de anillo de la 2-etil-2-oxazolina (Etoxa) y 2-metoxicarboniletil-2-oxazolina (Esteroxa) iniciada por el 1,4-*trans*-dibromobuteno en acetonitrilo a 78°C y terminada por el etil xantato de potasio o por la 4-vinilbencil-piperazina. Los polímeros telequélicos fueron caracterizados estructuralmente mediante resonancia magnética nuclear (^{1}H RMN y ^{13}C RMN) y espectrometría infrarroja. Se determinó por ^{1}H RMN que los grados de polimerización de los polímeros telequélicos con grupos etil xantato y vinilo variaron entre 24-29 y 22-23 unidades, respectivamente y estuvieron en concordancia con los valores teóricos. También, para ambos tipos de telequélicos, los porcentajes molares de Etoxa y Esteroxa concordaron con las razones molares iniciales de estos monómeros. El grado de funcionalidad de los grupos finales etil xantato en los polímeros telequélicos con xantato varió entre 64 a 82% y fue de 69 y 98% para los polímeros telequélicos terminados con grupos vinilo.

Palabras clave: 2-oxazolinas, polímero telequélico, polimerización catiónica “viva”.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF 2-OXAZOLINE TELECHELIC POLYMERS

ABSTRACT

New functionalized telechelic polymers containing ethyl xanthate and vinyl groups at the end of the chain were synthesized. The synthesis was carried out by the cationic ring-opening polymerization of 2-ethyl-2-oxazoline (Etoxa) and 2-methoxycarbonylethyl-2-oxazoline (Esteroxa) initiated by 1,4-trans-dibromobutene in acetonitrile at 78°C and finished by potassium ethyl xanthate or 4-vinylbenzyl-piperazine. The telechelic polymers were structurally characterized by nuclear magnetic resonance (1H NMR and 13C NMR) and infrared spectrometry. It was determined by ^{1}H NMR that the degrees of polymerization of the telechelic polymers with ethyl xanthate and vinyl groups varied between 24-29 and 22-23 units, respectively, and were in agreement with the theoretical values. Also, for both types of telechelics, the molar percentages of Etoxa and Esteroxa agreed with the initial molar ratios of these monomers. The degree of functionality of the ethyl xanthate end groups in the telechelic polymers with ethyl xanthate varied between 64 to 82% and was 69 and 98% for the telechelic polymers terminated with vinyl groups.

[a] Sección Física, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, Lima, Perú, *jrueda@pucp.edu.pe

Keywords: 2-oxazolines, telechelic polymer, “living” cationic polymerization.

INTRODUCCIÓN

Las 2-oxazolinas son monómeros que polimerizan vía polimerización catiónica por apertura de anillo y producen polímeros lineales[1,2]. Iniciadores de esta polimerización son, por ejemplo, el tosilato y triflato de metilo, entre otros[1]. La característica más importante de esta polimerización es que transcurre de forma “viva” o sea sin reacciones secundarias tales como reacciones de terminación o de transferencia de cadena y por esto se pueden obtener polímeros con grados de polimerización y funcionalización prefijados[3-5]. La polimerización de las 2-oxazolinas permite elaborar arquitecturas poliméricas tales como, por ejemplo, polímeros telequélicos, macromonómeros, copolímeros en bloque, copolímeros injertados, hidrogeles, etc[1-7].

Los polímeros telequélicos son polímeros que contienen funciones químicas en sus dos extremos de cadena. Estas funciones químicas pueden ser, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, grupos vinilo, etc.[3] Estos polímeros pueden ser sintetizados, por ejemplo, vía el método de terminación donde se introduce la función química mediante la reacción del agente terminador con la cadena propagante. Los polímeros telequélicos sirven para sintetizar diversos polímeros tales como, por ejemplo, hidrogeles, lipogeles, polímeros cíclicos, etc[1,3]. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos considera a la polimetiloxazolina y polietiloxazolina como polímeros biocompatibles y por esta razón existe un gran interés de los grupos de investigación en el mundo en este tipo de polímeros para aplicarlos al campo de la medicina[2].

En esta investigación se presenta la síntesis y caracterización de polímetros telequélicos de polioxazolinas funcionalizados con grupos etil xantato y vinilo en el final de la cadena polimérica.

PARTE EXPERIMENTAL

Las sustancias utilizadas en esta investigacíon fueron usadas como recibidas o fueron purificadas y secadas segun métodos estandar descritos en la literatura[6-10]. Cloruro de succinilo metilico (pureza: 97%, procedencia: Aldrich), hidrocloruro de 2-cloroetilamonio (97%, Merck), trietilamina (98%, Merck), 2-etil-2-oxazolina (97% Merck), fue destilada antes de su uso, 4-vinilbencilcloruro (97%, Aldrich) destilado, piperazina (97%, Aldrich). Los análisis espectrométricos de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría infrarroja (FTIR), espectrometría ultravioleta/visible (UV/Vis) y cromatografía de permeación en gel (GPC) de las sustancias usadas o generadas en esta investigación se realizaron mediante métodos estándar de la literatura.[6-8]

Cromatografo de permeación en gel (GPC), Water System, detector IR 410, UV 486, columna ultrastyrolgels 7 micrometros, porosidad 500, 10^3, 10^4 y 10^5 Angstrom. Espectrómetro de resonáncia magnética nuclear (RMN) Bruker Advance III 500 NMR, 500.13 MHz para ^{1}H y 125.75 MHz para ^{13}C, solvente cloroformo deuterado. Espectrómetro infrarrojo (FTIR) Perkin Elmer, Spectrum 100, método ATR. Espectrómetro Ultravioleta visible Thermoelectron Corporation, modelo Helios Gamma.

Purificación del iniciador 1,4-trans-Dibromobuteno (DBB)

Se agregó 4,11 g. de DBB a un vaso de 100 ml y luego se adicionó 10 mL de hexano y se calentó hasta 70°C hasta completa disolución. Se dejó de agitar, y se enfrió el líquido hasta temperatura ambiente. Se observó la formación de cristales blancos de DBB, los cuales se filtraron y se volvieron a disolver en hexano (10 mL) a 70°C, se volvió a enfriar la solución y se obtuvieron nuevamente los cristales de DBB. El DBB se secó y se guardó a baja temperatura (5°C) en un balón herméticamente cerrado y purgado con nitrógeno. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) δ: 3,95 (–CH_2–Br); 5,98 (H-C=C).

Purificación del etil xantato de potasio

El etil xantato de potasio se purificó mediante recristalizaciones en tolueno y heptano[11]. Se disolvió 9,3 g. de etil xantato de potasio en 200 mL de acetona a 40°C. La solución se filtró y se concentró mediante evaporación. A la solución se le agregó lentamente 800 mL de tolueno, destilado y seco. Se observó la precipitación del etil xantato de potasio. Se eliminó el solvente sobrenadante y se secó con un flujo de nitrógeno seco. Se repitió el procedimiento utilizando hexano como medio precipitante. Finalmente, el etil xantato de potasio, se guardó en oscuridad y a baja temperatura (5°C). El porcentaje de perdida en el proceso de purificación fue del 30%. Se confirmó su estructura por resonáncia magnética nuclear (Fig. 1). ^{1}H-RMN (D_2O) δ: 1,35 (CH_3), triplete); 4,45 (CH_2-O, cuadruplete), 4,75 (HDO).

Determinación de la pureza del etil xantato de potasio mediante espectrometría ultravioleta/visible11.

Se pesó 0,069 g. de etil xantato de potasio purificado en un vaso de 100 mL y se disolvió con 50 mL agua destilada. Se colocó en fiola de 100 mL, y se enrazó con agua pura. Se tomó una alícuota de 8,8 mL que se llevó a una fiola de 500 mL y se enrazó con agua destilada. Finalmente, mediante espectrometría UV/vis, se midió la absorbancia máxima de esta solución acuosa de etil xantato de potasio a 226 nm y 302 nm. La relación entre la absorbancia del pico a 226 nm y el de 302 nm fue de 0,50 estando en concordancia con la literatura[10]. Se utilizó la absorbancia del etil xantato de potasio a 302 nm para hallar el coeficiente de extinción (ε) de este compuesto, y se obtuvo un valor de 17350, que esta en concordancia con lo reportado en la literatura para el etil xantato de potasio puro (17500)[11]. Entonces, de los resultados de UV y RMN se estimó que el etil xantato de potasio tiene alta pureza.

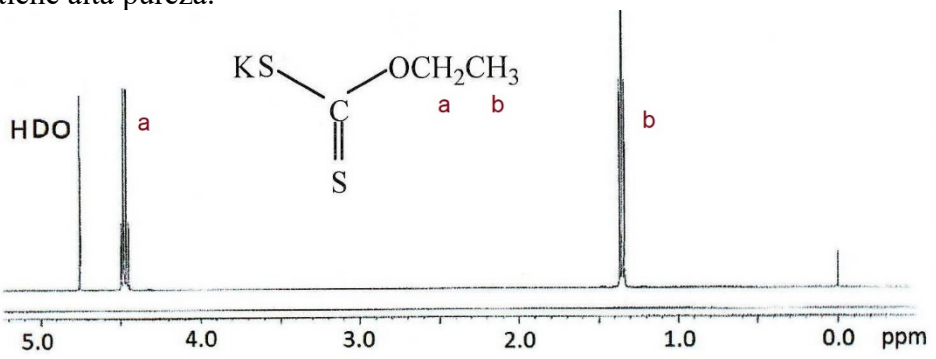


Figura 1. Espectro ^{1}H RMN del etilxantato de potasio en agua deuterada a 25°C.

Síntesis de 2-Metoxicarboniletil-2-oxazolina (EsterOxa),[6,9]

En primer lugar, se sintetizó el 7-cloro-4-oxo-5-azaheptanoato de metilo mediante la reacción, en 150 mL de diclorometano, de cloruro de succinilo metílico (20 g.) y el hidrocloruro de 2-cloroetilamonio (15.4 g.) en presencia de trietilamina (30 g.) a 0°C. Se obtuvo un rendimiento de 74%. Luego, en una segunda etapa, se obtuvo la 2-metoxicarboniletil-2-oxazolina (EsterOxa) a partir de la ciclación de 19 g. 7-cloro-4-oxo-5-azaheptanoato de metilo con 7.6 g. de carbonato de sodio anhidro, y la aplicación de vacío (0,5 mmHg) durante 60 minutos[5,6,8]. El rendimiento fue del 60%. La EsterOxa se caracterizó por RMN: ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) δ: 2,44 (-C$\underline{H_2}$CH_2CO-); 2,58 (CH_2-CO); 3,67 (CH_3OCO); 3,71 (CH_2-N=); 4,17 (CH_2-O). ^{13}C-RMN ($CDCl_3$) δ: 22,5 (-$\underline{C}H_2CH_2CO$-); 29,6 (-$CH_2\underline{C}H_2CO$); 51,4 ($\underline{C}H_3OCO$); 53,8 ($\underline{C}H_2$-N=C); 66,9 ($\underline{C}H_2$-O-C); 165,9 (N=$\underline{C}$-O); 172,3 (O-$\underline{C}$=O).

Síntesis de 4-Vinilbencilpiperazina (4-VBP)[12]

La síntesis de la 4-VBP esta descrita en la literatura por Nuyken y colaboradores.12 Esta síntesis consiste en hacer reaccionar a 0°C el cloruro de vinilbencilo con un gran exceso molar (15/1) de piperazina anhidra en cloroformo anhidro. Se obtuvo un líquido amarillo rojizo con 95% de rendimiento.
1H-RMN (en CDCl3) δ: 1,51 (NH); 2,40 (NCH2-); 2,83 (CH2-NH); 3,46 (Ar-CH2); 5,2; 5,7, 6,7 (CH2-CH-); 7,3 (Har).

Síntesis de polímeros telequélicos con grupos terminales etil xantato

En primer lugar, se realizó la polimerización de los monómeros 2-etil-2-oxazolina (Etoxa) y 2-metoxicarboniletil-2-oxazolina (Esteroxa) (en una proporción molar de Etoxa/Esteroxa= 80/20), vía una polimerización catiónica por apertura de anillo, iniciada por el 1,4-trans-dibromobuteno (DBB) en acetonitrilo a 78°C en un tiempo de reacción de 5,5 horas y se determinó que en este tiempo de reacción se alcanzó el 100% de conversión de los monómeros. En segundo lugar, se realizaron todos los demas experimentos usando este tiempo de reacción y bajo las mismas condiciones de reacción. Ejemplo típico: (Polímero P1): Se colocó en un reactor, bajo atmósfera de nitrógeno seco, 0,5 g. (2,33 mmoles) de DBB, 4,12 g. (41,6 mmoles) de EtOxa, 1,62 g. (10,3 mmoles) de EsterOxa y 12,5 mL de acetonitrilo. Se polimerizó a 78°C y luego de 5,5 horas se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se terminó la polimerización con 3,7 g. (23,3 mmol) de etil xantato de potasio disuelto en 50 mL de acetonitrilo. Se filtró la mezcla de reacción y se evaporó el solvente a presión artmósferica. Luego, se agregó 40 mL de diclorometano (para disminuir la viscosidad de la mezcla) y se lavó, tres veces con 25 mL de una solución saturada de cloruro de sodio (para eliminar la sal remanente de etil xantato de potasio). Finalmente, a la mezcla se le agregó 4 g. de MgSO4 para secar la solución. Posteriormente, se filtró la mezcla y se evaporó el solvente obteniéndose un polímero. Se disolvió el polímero en 20 mL de cloroformo y se precipitó en 200 mL de éter dietílico. Se repitió este proceso (disolución-precipitación) tres veces y finalmente el polímero seco se guardó en un vial herméticamente cerrado a 5°C, bajo atmósfera de nitrógeno seco. Este polímero se caracterizó mediante RMN y FTIR: 1H-RMN (CDCl3) δ: 1,12 (–CH3); 1,42 (CH3–CH2-OC=S); 2,39 (–CO-CH2–CH3); 2,65 (–CH2CH2–CO–O); 3,45 (N-CH2); 3,65 (O-CH3); 3,95 (=CHCH2); 4,65 (O-CH2-CH3); 5,53 (=CH-).
13C-RMN (CDCl3) δ: 174,5 (C=O); 127,5 (C=C); 70,6 (S-COCH2); 51,7 (OCH3); 50,0 (=CH-CH2); 45,3 (NCH2CH2); 33,6 (-CH2SC); 25,9 (COCH2CH3); 13,7(-CSO-

CH2CH3), 9.3 (COCH2CH3). FTIR (cm-1): 2,978 (C−H alifático), 1,734 (C=O, éster), 1,629 (N-C=O amida), 1,193 (C=S)13.
En el caso del telequélico terminado con grupos vinilo se procedió de forma similar solo que al momento de realizar la terminación se agregó 2,82 g. de 4-vinilbencilpiperazina (caso de polímeros PB) a la mezcla de reacción. Para desprotonar el final de cadena del polímero se agitó la mezcla con carbonato de potasio a 20°C durante 12 horas. Se filtró y se precipitó en éter dietílico, tres veces. Se caracterizó vía RMN:
1H-RMN (CDCl3) δ: 1,10 (–CH3); 2,30 (–CO-CH2–CH3); 2,65 (–CH2CH2–COO); 3,40 (N-CH2); 3,65 (O-CH3); 3,95 (=CHCH2); 5,3, 5,7 (CH2-CH); 5,5 (=CHCH2); 6,7 (=CH-), 7,2-7,6 (Har).

Ciclación del polímero telequélico conteniendo funciones etilxantato.

Procedimiento típico: en un frasco de vidrio, se disolvieron 2,0 g del polímero P1 y 0,7583 (10,4 mmoles) g. de n-butilamina en 500 mL de tetrahidrofurano (THF), el cual fue previamente secado con sódio metálico y destilado. En el frasco de vidrio se hizo burbujear aire con ayuda de una bombilla y una pipeta durante 24 horas. Después de este periodo se eliminó el tetrahidrofurano por evaporación hasta que se obtuvo el polímero seco. Se disolvió el polímero en cloroformo y se precipitó en éter dietílico. Se filtró y se secó el polímero obtenido. El polímero se guardó en un vial herméticamente cerrado y se le denominó P1-S-S. Este polímero se caracterizó por RMN.
^{1}H-RMN ($CDCl_3$) δ: 1,13 (–CH_3); 2,39 (–CO-C$\underline{H}_2$–CH_3); 2,6 (–CH_2–CO–O); 2,85 (-CH_2-S-S-CH_2-); 3,45 (N-CH_2-CH_2-N); 3,65 (O-CH_3); 3,95 (=CHC$\underline{H}_2$); 5,53 (=CH-).

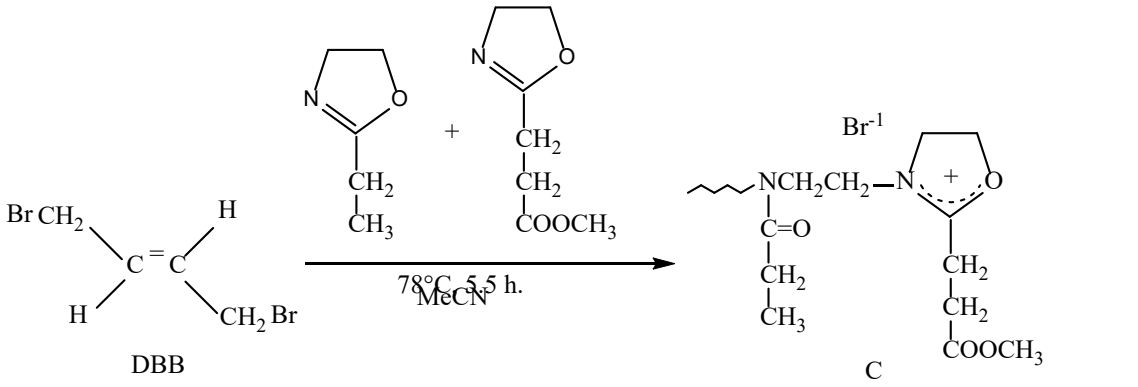
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los monómeros 2-etil-2-oxazolina (Etoxa) y 2-metoxicarboniletil-2-oxazolina (Esteroxa) fueron polimerizados vía una polimerización catiónica por apertura de anillo, iniciada por el 1,4-*trans*-dibromobuteno (DBB). En todos los experimentos siempre se uso un tiempo de reacción de 5,5 horas a 78°C porque en este tiempo de reacción, y bajo las mismas condiciones de reacción, se alcanzó el 100% de conversión de los monómeros. Se varió el porcentaje molar de EsterOxa entre 18 y 44% para que en una investigación posterior los grupos éster se pueda hidrolizar y obtener grupos ácido carboxílicos que pueden posibilitar introducir nuevas funcionalidades y propiedades a los polímeros telequélicos. El iniciador 1,4-*trans*-dibromo buteno (DBB) es un iniciador de doble funcionalidad y entonces se inician dos cadenas poliméricas por cada molécula de iniciador DBB.

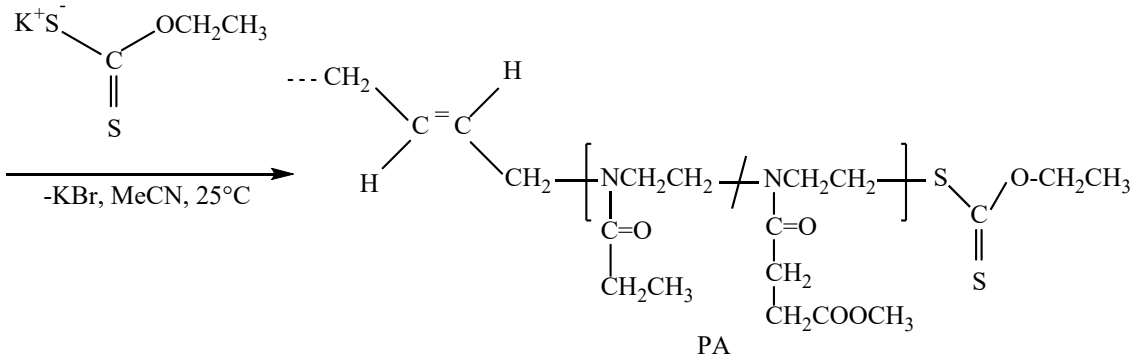
Síntesis y caracterización de los polímeros telequélicos con grupos terminales etil xantato

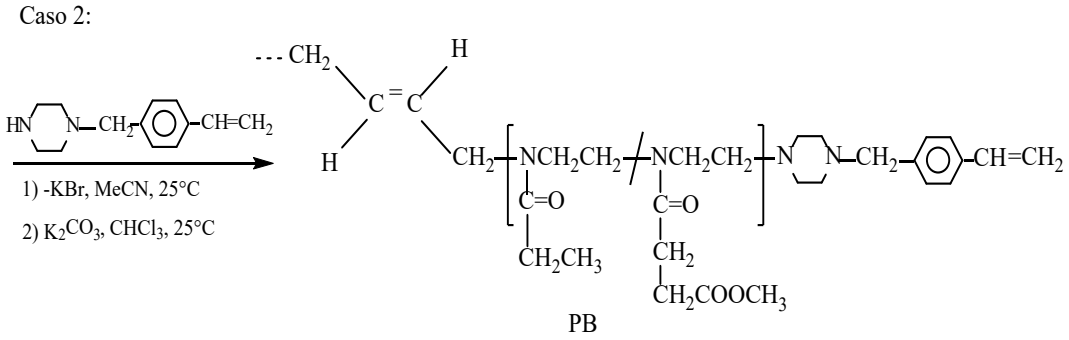
Los telequélicos de EtOxa y de EsterOxa con grupos etil xantato fueron obtenidos mediante la terminación de la polimerización con una solución de etilxantato de potasio en acetonitrilo (Esquema 1, caso 1). Al terminar la polimerización con el etil xantato de potasio se introdujo este grupo funcional en los dos finales de cadena del polímero formándose así un polímero telequélico. En la Tabla 1 (Polímeros PA) aparecen las condiciones de la polimerización y los resultados obtenidos en la misma. La estructura de los polímeros telequélicos fue confirmada mediante los espectros ^{1}H y ^{13}C RMN (Ejemplo, espectros ^{1}H RMN de PA2 y ^{13}C RMN de PA1 en Fig 2 y 3, respectivamente).

Los porcentajes molares de los monómeros Etoxa y Esteroxa en los copolímeros telequélicos se hallaron mediante el análisis cuantitativo del espectro ^{1}H RMN (Fig. 2), comparando las señales "f" (de Etoxa) versus "h+i" (de Esteroxa) y esta razón fue similar a la razon molar inicial de estos monómeros (Tabla 1). El grado de polimerización de los polímeros telequélicos fue hallado comparando la suma de las señales "f" y "h+i" versus la señal del iniciador "a" y fueron muy cercanos al valor de la relación molar inicial (Etoxa+Esteoxa)/Iniciador) (Tabla 1). Esto fue una evidencia de que la polimerización transcurrió en forma "viva" o sea solo ocurrieron las reacciones de iniciación y de propagación y no las reacciones secundarias tales como las reacciones de transferencia de cadena o de terminación. La funcionalización con grupos etil xantato fue determinada comparando las integrales de las señales „c" y „a". Sin embargo, los porcentajes de funcionalización con etil xantato no fueron mayores al 82% a pesar de que usó un gran exceso molar (de 10 a 1) de etil xantato de potasio en la reacción de terminación para forzar estadistícamente la inclusión de esta sustancia en el final de cadena. Este resultado significa que algunos extremos de las cadenas poliméricas de los polímeros telequélicos no contuvieron el grupo etil xantato. Es probable que la terminación habría ocurrido por reacción de las cadenas propagantes oxazolínicas con restos de humedad en algún componente del sistema de reacción o que, como se postula más adelante, una parte del grupo etil xantato incorporado al polímero se perdiera en el proceso de purificación por reacciones secundarias. Entonces, como resultado se obtuvo una mezcla de polímeros, algunos (porcentaje mayor) conteniendo dos grupos etil xantato en sus dos extremos (polímeros telequélicos) y un pequeño porcentaje de los polímeros con un solo grupo etil xantato en sus extremos de cadena.



Caso1:





Esquema 1. Mecanismo de reacción de la síntesis de los polímeros telequélicos con grupos terminales etil xantato y vinilo. DBB (iniciador) = 1,4-*trans*-Dibromobuteno, C= catión oxazolínico propagante. Caso 1 y Caso 2 : reacciones de terminación con el etil xantato de potasio, y con la 4-vinilbencil-piperazina, respectivamente.

Tabla 1. Síntesis de los polímeros telequélicos. Condiciones de reacción y resultados.

Polímero[a]	Mi/DBB[b]	Mf/DBB[c]	Mn(RMN)[d]	Esteroxa[e]	F[g]
PA1	22	25	3040	18	64
PA2	25	29	3380	19	69
PA3	22	25	2770	-[f]	80
PA4	24	24	3160	35	82
PB1	21	22	.....	22	69
PB2	22	23	.....	56	98

[a)]Denominación del polímero telequélico con grupos etil xantato (PA) y con grupos vinilo (PB), b) Relación molar inicial (Etoxa + Esteroxa)/Iniciador, c) Grado de polimerización = Relación molar experimental (Etoxa + Esteroxa)/Iniciador en el polímero telequélico obtenida vía análisis cuantitativo de 1H RMN d) Peso molecular obtenido a partir del grado de polimerización experimental del telequélico obtenido vía el espectro 1H RMN, e) Porcentaje molar de Esteroxa en el polímero telequélico (1H RMN), f) En el caso de PA3 solo se usó Etoxa, g) Funcionalización del polímero telequélico obtenida mediante 1H-RMN a traves de la comparación entre la señal "c"de los grupos etil xantato (o las señales "k y l" de los grupos vinilo) y las señales "a" y "b" del iniciador.

En todos los experimentos siempre se usó acetonitrilo como solvente, y una temperatura y tiempo de reacción de 78°C y 5.5 horas, respectivamente.

Los valores de peso molecular y dispersión de peso molecular fueron 2,600, y 1.35 y de 2,500 y 1.32 para PA1 y PA2, respectivamente. Estos valores fueron obtenidos mediante cromatografia de permeación en gel (GPC). Para todos los copolímeros se usó una relación molar inicial de 20% molar de EsterOxa y 80% molar de Etoxa, excepto para PA4 que se usó 40 % molar de Esteroxa y 60% molar de EtOxa. Para PB1 se usó 20 % molar de Esteroxa y 80% molar de EtOxa y para PB2 se usó 50% molar Etoxa y 50% molar Esteroxa, respectivamente.

Adicionalmente, se llevó a cabo una reacción de modificación de los polímeros telequélicos PA1 y PA2. Se realizó la reacción de ciclizacion del polímero telequélico

mediante la aminólisis del grupo etil xantato con un exceso de n-butilamina, obteniendose grupos tioles en los extremos de cadena y luego estos grupos se oxidaron con el oxígeno del aire, en tetrahidrofurano, para conseguir finalmente grupos disulfuro que cerraban la estructura del polímero obteniéndose así polímeros cíclicos (Esquema 2).
Cabe mencionar que la reacción anterior se llevó a cabo en forma muy diluida, según datos de la literatura[14], para evitar estadistícamente la reacción de dimerización de los polímeros (reacción intermolecular) y favorecer al máximo la ciclación o reacción intramolecular del polímero.

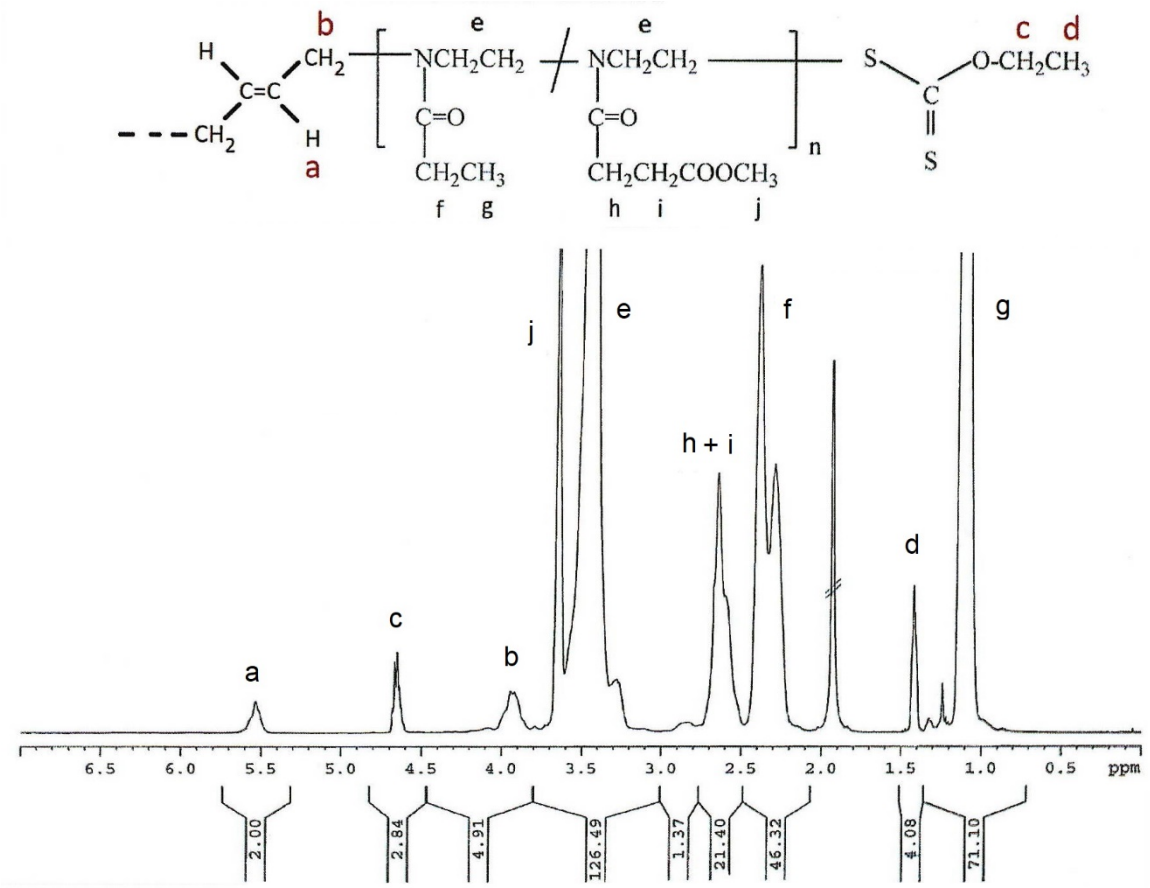


Figura 2. Espectro ^{1}H RMN del polímero telequélico PA2 (Etoxa (81% molar) y Esteroxa (19% molar), 2n=29) terminado con grupos etil xantato. Funcionalización con etil xantato = 69%.

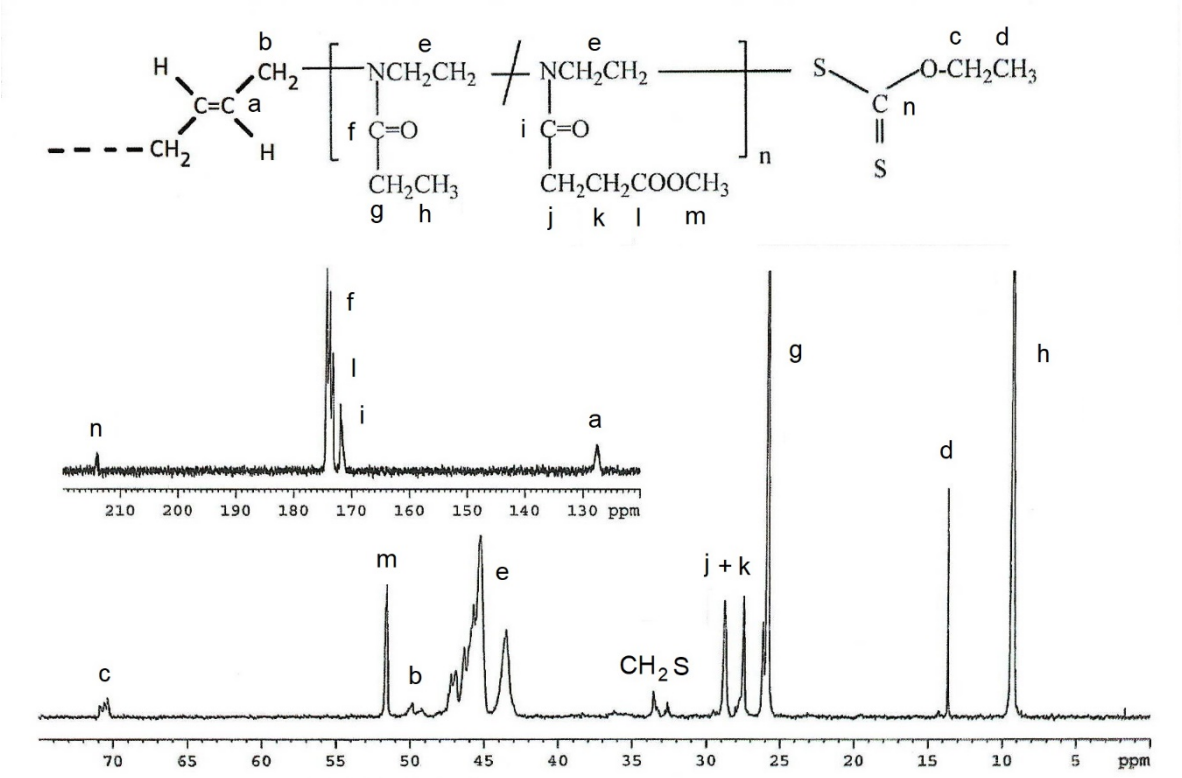
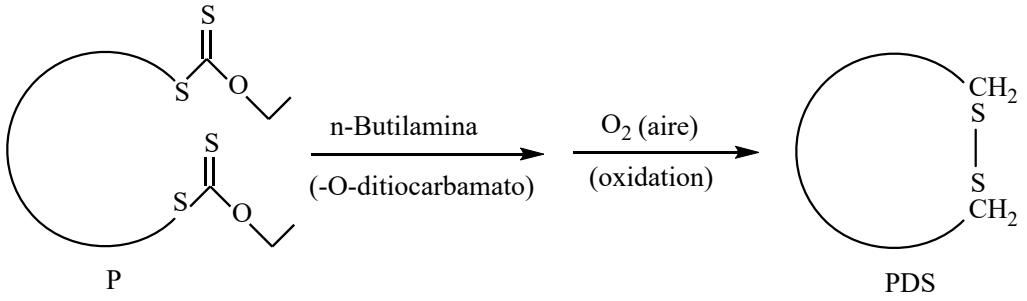


Figura 3. Espectro ^{13}C RMN del polímero telequélico PA1, 2n=25) terminado con grupos etil xantato. Funcionalización con etil xantato = 64%.

En el espectro ^{1}H RMN de los polímeros ciclados se observó la desaparición de la señal de los grupos metilo y metileno del etil xantato de potasio en 1,4 y 4,5 ppm, respectivamente y la aparición de la señal de los grupos metilenos ($-CH_2-S-S-CH_2$) del disulfuro en 2,8 ppm (Fig. 4). La reacción de ciclización de PA2 fue estudiada mediante la técnica de RMN y se obtuvo una secuencia de espectros de ^{1}H RMN donde se observó, conforme transcurría el tiempo, la desaparición paulatina de las señales de los grupos etil xantato y la aparición simultánea de las señales del grupo O-tiocarbamato (producto de la ciclización) y del grupo disulfuro en 2,8 ppm (Fig. 5 y 6).



Esquema 2. Reacción de ciclización de los polímeros PA1 y PA2. Donde P=PA1 o PA2

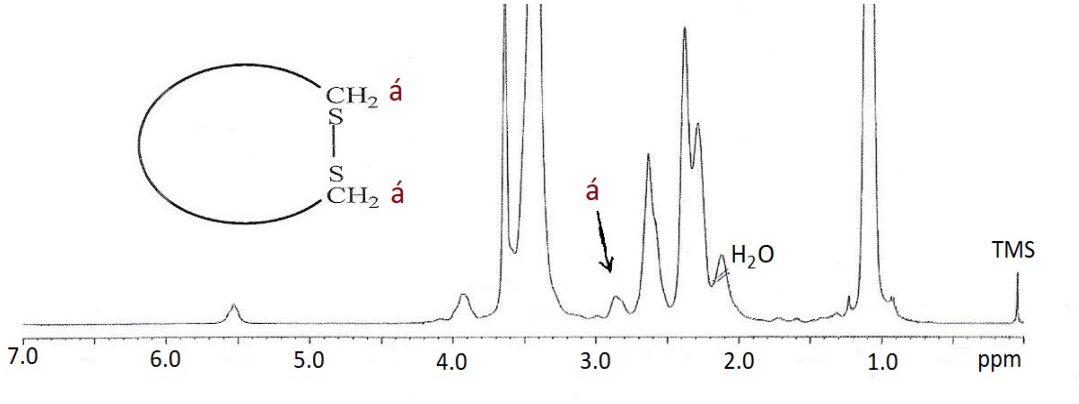


Figura 4. Espectros 1H RMN del polímero telequélico PA1, después de ser ciclado. Se observa la desaparición de las señales del grupo etil xantato en 1,4 y 4,65 ppm.

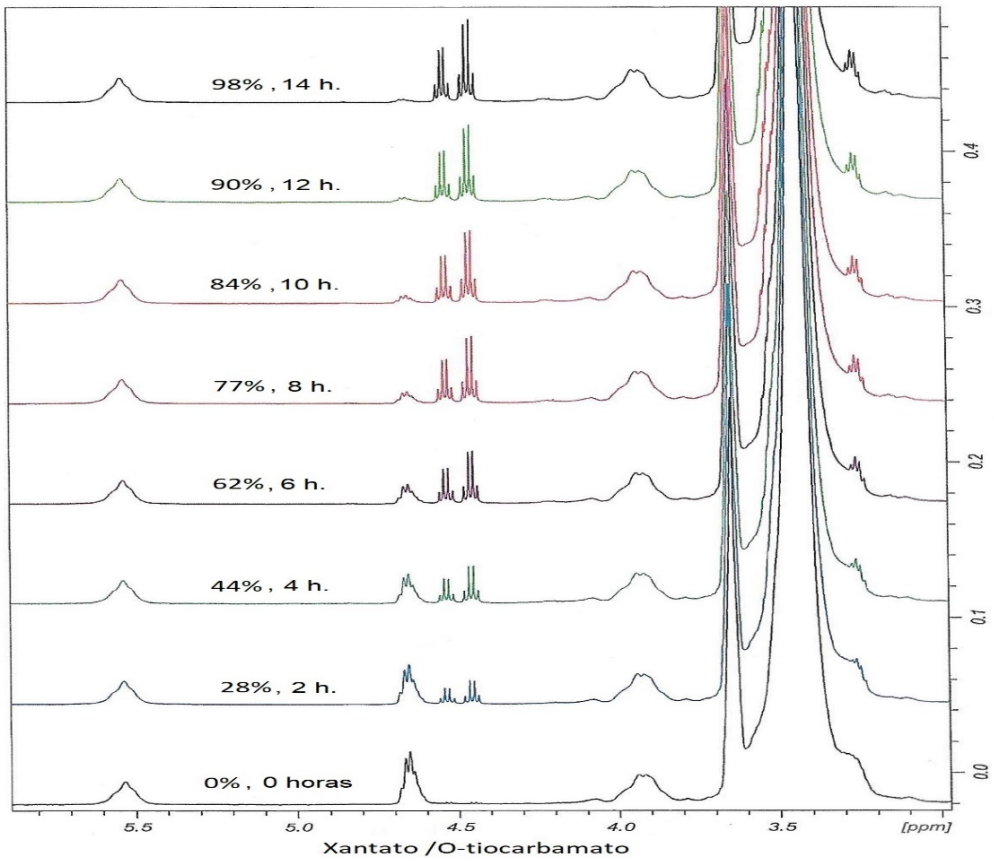


Figura 5. Secuencia de espectros ^{1}H RMN de PA2 en el proceso de ciclización. Se obtuvo un rendimiento del 98% al cabo de 14 horas de la reacción llevada a cabo en el tubo de RMN.

Cabe mencionar que en el espectro ^{1}H RMN de los polímeros telequélicos tambien se observa esta señal en modo mas débil (señal en 2,8 ppm Fig. 2). Por esto, es posible que en la síntesis del polímero telequélico si se obtuviera inicialmente una mayor funcionalización de los polímeros telequélicos con grupos xantato pero que esta

funcionalización disminuyera en el proceso de purificación de los polímeros debido posiblemente a una hidrólisis parcial del grupo etil xantato. Es conocido de la literatura que los compuestos que contienen atomos de azufre, tales como los xantatos, disufuros, tioles, etc, son químicamente muy inestables[15,16].
El interés en la obtención de polímeros cíclicos es que este tipo de polímeros pueden utilizarse, por ejemplo, para adsorberse sobre superficies de nanopartículas metálicas, por ejemplo, nanopartículas de hierro posibilitando una alta estabilidad de las mismas[14]

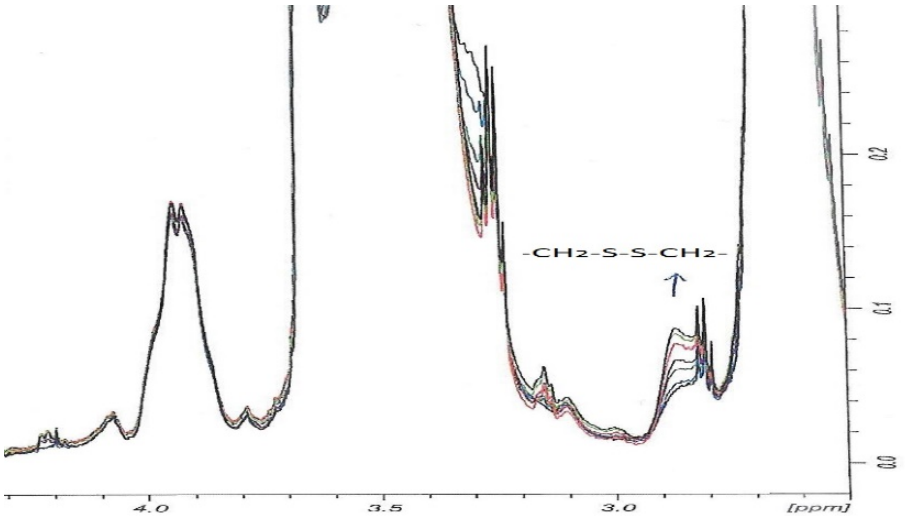


Figura. 6. Secuencia de espectros 1H RMN de PA2: Se observa el incremento de la cantidad de grupos disulfuro en el polímero telequélico conforme transcurre la reacción de ciclización.

Síntesis y caracterización de los copolímeros telequélicos con grupos terminales vinilo

Se sintetizaron también telequélicos de Etoxa y Esteroxa conteniendo grupos vinilo en los extremos de cadena. Esto se realizó mediante una polimerización catiónica por apertura de anillo de los mencionados monómeros, la cual fue iniciada por el dibromobuteno (DBB) en acetonitrilo y en este caso la terminación fue llevada a cabo con la 4-vinilbencilpiperazina (4-VBP) (Esquema 1, caso 2). Con este método se consiguió introducir en el final de cadena los grupos vinilo. Los polímeros telequélicos fueron denominados PB1 y PB2. Los resultados se consignan en la Tabla 1.

Se determinó, mediante los espectros RMN de estos polímeros, que PB1 y PB2 tuvieron un grado de polimerización de 22 y 23, un contenido de Esteroxa de 22 y 56% molar en concordancia con el valor teórico de 25 y 50 % molar y también que su funcionalización fue de 69 y 98%, respectivamente (Fig. 7). La funcionalización de 98% se consiguió cuando se usó en la etapa de terminación un exceso de agente terminador del 600% ya que de esta manera se forzó en términos estadísticos la reacción del terminador (4-VBP) con la cadena propagante en tanto que con una terminación equimolar solo se obtuvo 69% de funcionalización.

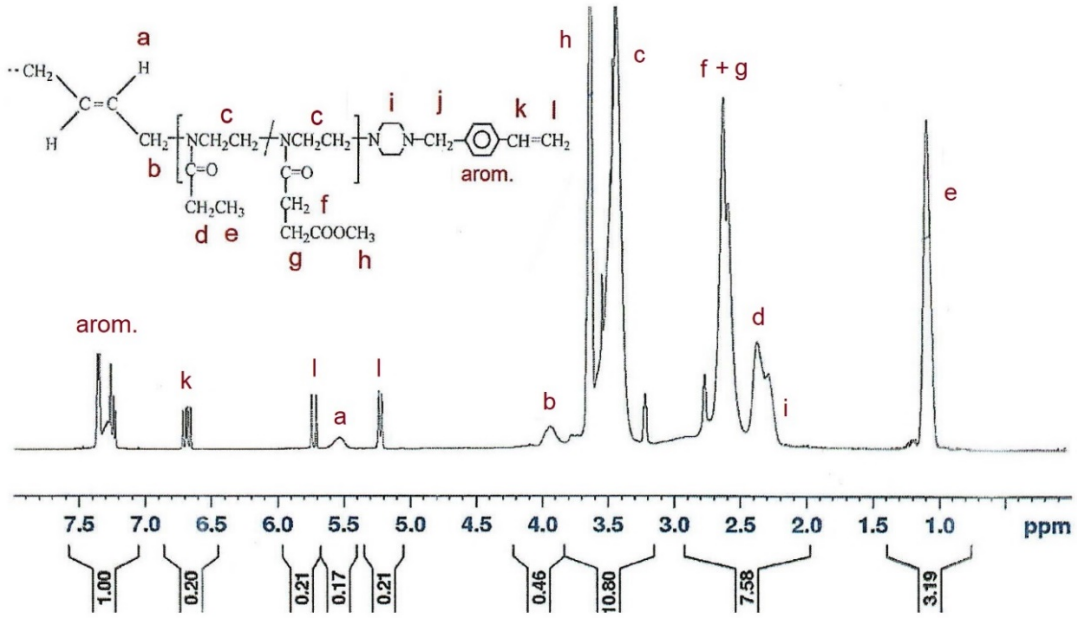


Figura 7. Espectro 1H RMN del polímero telequelico PB2 (Etoxa 44% molar y Esteroxa 56% molar, 2n=24) terminado con grupos vinilo. Funcionalización aproximada con grupos vinilo= 98%.

CONCLUSIONES

Se elaboraron nuevos polímeros telequélicos a partir de la polimerización por apertura de anillo de la 2-etil-2-oxazolina y 2-éster-2-oxazolina terminada por el etil xantato de potasio y la 4-vinilbencil-piperazina. Estos polímeros telequélicos contuvieron grupos etil xantato o vinilo en sus extremos de cadena. La funcionalización máxima obtenida con grupos etil xantato fue del 82% molar debido posiblemente a la inestabilidad de los grupos terminales etil xantato en el final de cadena. Los telequélicos con grupos xantato fueron ciclados mediante una reacción de aminólisis con n-butilamina y posterior oxidación, con oxígeno, de los tioles generados. Se formaron copolímeros cíclicos conteniendo grupos disulfuro. Por otro lado, con los polímeros telequélicos de polioxazolinas conteniendo grupos vinilo en sus finales de cadena se consiguió obtener 98% de funcionalización con estos grupos cuando se usó un gran exceso del agente terminador.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Perú por el financiamiento de esta investigación. A la Prof. Brigitte Voit, al Dr. Hartmut Komber, a la Srta. Química Petra Treppe, del Instituto Leibniz de Investigaciones en Polímeros de Dresden, Alemania, por la caracterización de los polímeros.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hoogenboom R. The future of poly (2-oxazoline)s. Eur Polym J. 2022; 179: 111521. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111521.
2. Nemiati S, Samaz M, Hossein A. Polyoxazoline: a review article from polymerization to smart behaviours and biomedical applications. Eur Polym J. 2022; 178: 111484. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111484.
3. Delaittre G. Telechelic poly(2-oxazolines)s. Eur Polym J. 2019; 121: 109281. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109281.
4. Jana S, Uchman M. Poly(2-oxazoline)-based stimulus-responsive (co)polymers: An overview of their design, solution properties, surface-chemistries and applications. Prog Polym Sci. 2020; 106: 101252. Doi: 10.1016/j.progpolymsci.2020.101252.
5. Pizzi D, Humphries J, Morrow JP, Fletcher NL, Bell CA, Kempe K. Poly(2-oxazoline) macromonomers as building blocks for functional and biocompatible polymer architectures. Eur Polym J. 2019; 121: 109258. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109258.
6. Rueda JC, Santillán F, Komber H, Voit B. Synthesis and characterization of stiff, self-crosslinked thermoresponsive DMAA hydrogels. Polymers. 2020; 12: 1401. doi: 10.3390/polym12061401
7. Rengifo J, Zschoche S, Voit B, Rueda JC. Synthesis and characterization of new interpenetrated hydrogels from N-isopropylacrylamide, 2-oxazoline macromonomer and acrylamide. Eur Polym J. 2022; 177: 111456. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111456.
8. Rueda JC, Suárez C, Komber H, Zschoche S, Voit B. Synthesis and characterization of pH- and thermo-responsive hydrogels based on poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline) macromonomer, sodium acrylate, and acrylamide. Polym Bull. 2020; 77: 5553-5565.
9. Zschoche S, Rueda JC, Binner M, Komber H, Janke A, Arndt KF, et al. Reversibly switchable pH- and thermoresponsive core-shell nanogels based on poly(NiPAAm)-graft-poly(2-carboxyethyl-2-oxazoline)s. Macromol Chem Phys. 2012; 213: 215-226.
10. Zarka MT, Nuyken O, Weberskirch R. Amphiphilic polymer supports for the asymmetric hydrogenation of amino acid precursors in water. Chemistry. 2003; 9: 3228-3234.
11. Pomianoswsky A, Leja J. Spectrophotometric study of Xanthate and dixanthogen solutions. Can J Chem. 1963; 41: 2219-2230.
12. Gross A, Maier G, Nuyken O. Synthesis and copolymerization of macromonomers based on 2-nonyl- and 2-phenyl-2-oxazoline. Macromol Chem Phys. 1996; 197: 2811-2826.
13. Pretsch E, Buelhmann P, Badertscher M. Spektroskopische Daten zur Strukturaufklaerung organischer Verbindungen. 5th Ed. Heilderberg: Springer; 2010.
14. Morgese G, Shaghasemi B, Causin V, Reimhult E, Benetti E. Next-Generation Polymer Shells for Inorganic Nanoparticles are Highly Compact, Ultra-Dense, and Long-Lasting Cyclic Brushes. Angew Chem Int Ed Engl. 2017; 56. 1-6.
15. March J. Advanced Organic Chemistry. 4th Ed. New York: John Wiley and Sons; 1992.
16. Beyer W. Lehrbuch der Organischen Chemie. 22 Ed. Stuttgart: S. Hirtzel Verlag; 1991.


SOCIEDAD QUÍMICA
DEL PERÚ
FUNDADA EN 1933