

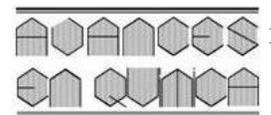
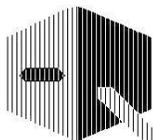
Avances en Química

Volumen 19

Número 1

Enero-abril 2024

Créditos de la imagen: generada con inteligencia artificial (Copiloto de Bing)



Comité editorial

Dra. Marcela Pascu de Burguera

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Mérida 5101, Venezuela.

pascu@ula.ve

Dr. Issa Katime Amashta

Universidad del País Vasco.
Grupo de Nuevos Materiales. Apartado Postal 644, Bilbao, España.

issa.katime@ehu.es

Dr. Wilmer Olivares

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Grupo de Química Teórica. Mérida 5101, Venezuela.

wilmer@ula.ve

Dr. Jairo Márquez.

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Laboratorio de Electroquímica. Mérida 5101, Venezuela.

jamar@ula.ve

Dr. Enrique Millán Barrios

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Laboratorio de Electroquímica. Mérida 5101, Venezuela.

ejmb@ula.ve

Editor Jefe

Dr. Cristóbal Lárez Velásquez

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química, Grupo de Polímeros.
Mérida 5101, Venezuela

Teléfono: 0058-274-2401381

Fax: 0058-274-2401286

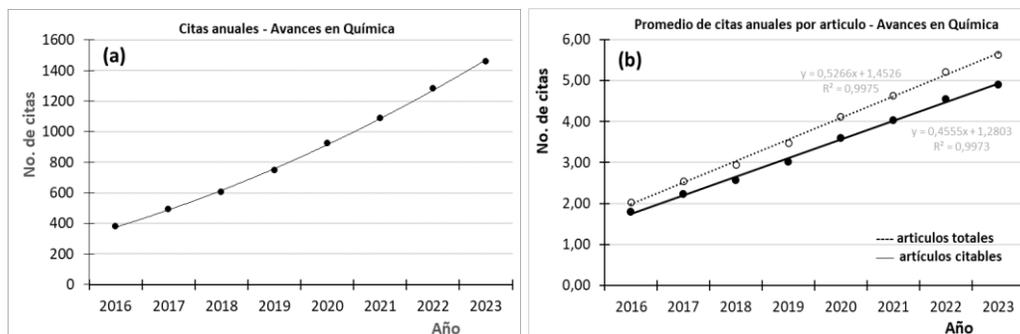
e-mail: clarez@ula.ve

Avances en Química: sosteniendo el paso

Cristóbal Lárez Velásquez
Editor Jefe, Avances en Química

Es realmente auspicioso que a pesar de las condiciones adversas que han marcado nuestro país durante los últimos años, especialmente en el sector académico, donde se pueden contar por decenas las instituciones que han quedado reducidas a su mínima expresión, **Avances en Química** haya logrado mantener un paso sostenido. Quizás no sea un paso indicativo de mucho crecimiento, pero los números que se detallan a continuación son claramente alentadores, por las condiciones en las cuales se han venido logrando y porque la revista se ha mantenido activa en la publicación de artículos (hasta la fecha 298 artículos, tabla 1), recibiendo citas al mismo ritmo de siempre (ver figura a y tabla 2), manteniéndose en los índices académicos de siempre (Revenicyt, Dialnet, DOAJ, Redalyc, Scopus, etc.) y aumentando el índice *Scimago* para revistas (SJR) de 0,100 en el año 2022 hasta 0,140 en 2023. Similarmen- te, ha continuado creciendo el número promedio de citas por artículos totales (4,53) y por artículos citables (5,22) (ver figura b). Igualmente, es importante señalar que más de la mitad (56%) de los artículos citables publicados en la revista a lo largo de estos años han recibido citas, lo que sin duda habla muy bien de la visibilidad de la revista, especialmente si se considera que buena parte de estos están publicados en idioma español y en sintonía con los objetivos pretendidos para la creación de la revista de llegar a usuarios iberoamericana.

Se puede decir que estos números lucen realmente interesantes y quizás, debido a ello, la revista ha recibido ofertas de compra por compañías editoriales foráneas hasta de 70.000 dólares estadounidenses. Son ofertas que llaman a la reflexión sobre el verdadero valor de los bienes que tenemos. Considerando este precio, el valor de mercado de cada artículo publicado en Avances en Química sería de 235 dólares, un valor claramente inferior a lo que cuesta en la actualidad publicar un artículo en revistas de acceso abierto de mediana valoración en el medio, que oscilarían entre 600 y 1500 dólares, mientras que publicar en las revistas más prestigiosas cuesta al menos 3000 dólares.



Por otra parte, y respondiendo por esta vía a una de las consultas más recibidas por email, concretamente sobre la posibilidad que cada artículo posea su número DOI, queremos informar que a pesar del esfuerzo que han hecho las autoridades universitarias relacionadas con el tema, los trámites son complicadas por el aislamiento del país, lo cual ha dificultado enormemente que la revista logre recibir financiamiento y también realizar el pago a los entes prestadores del servicio DOI a través de los mecanismos establecidos. En tal sentido, este año se ha iniciado una consulta para ver si los autores pueden aportar una módica colaboración exclusivamente para pagar los números DOI de sus artículos, sin que esta colaboración perjudique el carácter de acceso abierto en las dos vías que mantiene la revista, es decir sin cobrar a los usuarios para descargar los artículos y sin cobrar a los autores para publicarlos. El mecanismo para recibir la colaboración está por definirse debido a que probablemente sea más costoso el pago de la transferencia que la colaboración, además de que el pago al ente encargado de los DOI tiene su costo y dificultad en nuestro país. Sin embargo, este año esperamos tener buenas noticias al respecto, para que nuestros colaboradores sigan manteniendo la confianza que han depositado en **Avances en Química** a lo largo de estos ya casi veinte años.

Resulta también importante mencionar en este resumen anual del acontecer de la revista su principal debilidad, vale decir, la escasa disposición de muchos investigadores para colaborar con la evaluación de manuscritos, encontrándose sorpresivamente incluidos en este grupo algunos autores que han publicado en **Avances en Química**. La situación es realmente preocupante porque algunos trabajos han tenido que ser devueltos por falta de evaluadores.

Continúa en la página siguiente

Un último punto que merece la pena mencionar es la utilización de la inteligencia artificial “Copiloto”, de Microsoft Bing, para obtener la imagen que lucirá la portada de nuestra revista durante este año, basada en las palabras “puntos cuánticos”. Este resultó el tema de trabajo de los investigadores premiados con el Nobel en Química del año 2023.

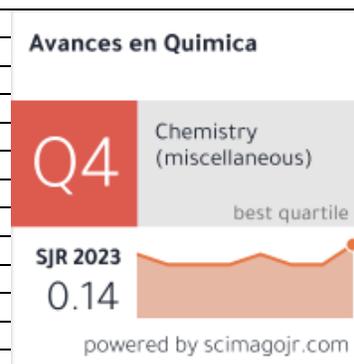
Tabla 1. Tipos de artículos publicados en **Avances en Química** hasta el año 2023, desglosados por año de publicación.

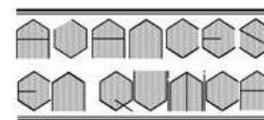
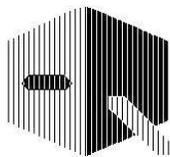
Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	Totales	%
Editorial	3	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	23	7,72
Semblanza	1	1	1	1			1			2	1	1	1	1		1			12	4,03
<i>In memoriam</i>		1									2							1	4	1,34
Actualidad química										1			1	1		1	1	1	6	2,01
Artículo divulgativo	2	2	1	1		1		2	1	1		1	2	1	1				15	5,03
Revisión bibliográfica		2		1		1	2	1	1	1	1	1	1		1	3		1	17	5,70
Nota					1						1								2	0,67
Nota técnica		1	1	3	3	1	2	5	1	3	0	1	2		2	1			25	8,39
Artículo científico	7	6	9	9	20	12	20	15	13	18	12	5	4	8	6	5	7	8	185	62,10
Comunicación corta				1										1				1	3	1,01
Avance de investigación	1		1															1	3	1,01
Artículo pedagógico																	1	2	3	1,01
Totales	14	16	15	16	25	16	26	24	16	28*	18	10	13	12	11	12	12	14	298	100
No citables	4	5	2	2	1	1	2	1	1	4	4	2	2	2	1	2	1	2	39	13,90

* Ese año se publicó adicionalmente un número especial con 8 artículos, con motivo de celebrarse el X aniversario de la revista.

Tabla 2: Número de citas de artículos publicados en **Avances en Química** recibidas al 28/04/2024. Consulta realizada con *Google Scholar*.

No.	Artículo	Citas
1	C Lárez. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. 1(2) , 1-15 (2006)	218
2	MC Nevárez-Martínez, PJ Espinoza-Montero, FJ Quiroz-Chávez, B Ohtani. Fotocatálisis: inicio, actualidad y perspectivas a través del TiO ₂ . 12(2-3) , 45-59 (2017).	69
3	AG Martínez-Lopez, W Padrón-Hernández, OF Rodríguez-Bernal, O Chiquito-Coyotl, MA Escarola-Rosas, JM Hernández-Lara <i>et al.</i> Alternativas actuales al manejo de lixiviados. 9(1) , 37-47 (2014).	56
4	DR Martínez, GG Carbajal. Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. 7(1) , 87-99 (2012).	52
5	V Tkach, V Nechyporuk, P Yagodynets. Descripción matemática de la síntesis electroquímica de polímeros conductores en la presencia de surfactantes. 8(1) , 9-15 (2013).	39
6	R Suarez, E Arévalo, LJ Linares, FJU Fajardo, G Hernández. Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. 4(2) , 53-62 (2009).	35
7	P Chacón-Morales, JM Amaro-Luis, A Bahsas. Isolation and characterization of (+)-mellein, the first isocoumarin reported in Stevia genus. 8(3) , 145-151 (2013).	34
8	C Cabello Alvarado, A Sáenz Galindo, L Barajas Bermúdez, CM Pérez Berúmen, CA Ávila Orta, D Valdés Garza JA Romero, E Rodríguez. Cera de candelilla y sus aplicaciones. 8(2) , 105-110 (2013)	29
9	F Vargas, C Rivas, A Nursamaa, T Zoltan. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. 2(2) , 3-15 (2007).	28
10	L Veliz <i>et al.</i> Estudio de la hidrólisis del ion Niquel (II) y de la formación de los complejos de Niquel (II) con los ácidos Picolínico y Dicolínico en NaCl 1,0 mol. dm ⁻³ a 25 °C. 6(1) , 3-8 (2011)	26
11	M Riera, R Palma. Obtención de bioplásticos a partir de desechos agrícolas. Una revisión de las potencialidades en Ecuador. 13(3) , 69-78.	22
12-13	2 artículos con 20 citas	40
14-15	2 artículos con 19 citas	38
16	1 artículo con 18 citas	18
17	1 artículo con 16 citas	16
18-19	2 artículos con 15 citas	30
20-23	4 artículos con 14 citas	56
24-25	2 artículos con 13 citas	26
26-28	3 artículos con 12 citas	36
29	1 artículo con 11 citas	11
30-33	4 artículos con 10 citas	40
34-38	5 artículos con 9 citas	45
39-43	5 artículos con 8 citas	40
44-56	13 artículos con 7 citas	91
57-64	8 artículos con 6 citas	48
65-80	16 artículos con 5 citas	80
81-93	13 artículos con 4 citas	52
94-122	29 artículos con 3 citas	87
123-156	34 artículos con 2 citas	68
157-184	28 artículos con 1 cita	28
185-298	114 artículos sin cita	--
Total	298 artículos (39 no citables)	1458





Estudio para el tratamiento de agua residual del camal de la ciudad de Portoviejo

Juan Carlos Ortiz Toala^{1*}, Raisa Annabel Solórzano Suárez¹,
Alexandra Córdova Mosquera², Mabel Laz Mero²

¹⁾ Universidad Técnica de Manabí, UTM. Portoviejo, Ecuador.

²⁾ Departamento de Procesos Químicos, Alimentos y Biotecnología.
Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.

(*) jortiz8110@utm.edu.ec

Recibido: 08/12/2023

Revisado: 26/02/2024

Aceptado: 15/03/2024

Resumen

Las aguas residuales de los camales o mataderos se generan en el proceso de sacrificio de los animales; mezclados con los residuos de limpieza y desinfección adquieren cargas contaminantes, de manera que exigen ser tratadas antes de ser vertidas a desagües. Por este motivo, el objetivo de esta investigación es caracterizar las propiedades fisicoquímicas del agua residual del camal de Portoviejo, analizar las diferentes operaciones unitarias y desarrollar un esquema basado en la implementación de una planta piloto de tratamiento, asegurando que el efluente tratado cumpla con los criterios de descargas al sistema de alcantarillado. Para realizar este trabajo se elaboraron dos sistemas de tratamientos A y B operando en simultáneo, el primero constó de coagulación-floculación y lodos activados; mientras que el segundo únicamente de lodos activados, evaluando los parámetros de calidad medidos al inicio y al final de los tratamientos. Las aguas residuales del matadero presentaron gran inestabilidad en sus características fisicoquímicas, reflejando altos valores de desviación estándar obtenidos en las muestras iniciales. Las remociones de los dos tratamientos aplicados al efluente del camal permitieron la reducción de nutrientes y materia orgánica en considerable proporción, demostraron que con los métodos propuestos se cumplen los límites establecidos por las normativas nacionales e internacionales.

Palabras claves: mataderos; agua residual; tratamiento; normativas; viabilidad.

Abstract

Study for the treatment of wastewater from the Portoviejo city slaughterhouse. Wastewater from slaughterhouses or abattoirs is generated in the process of slaughtering animals; mixed with cleaning and disinfection residues, it acquires pollutant loads, so it must be treated before being discharged into the sewage system. For this reason, the objective of this research is to characterize the physicochemical properties of the wastewater from the Portoviejo slaughterhouse, analyze the different unit operations and develop a scheme based on the implementation of a treatment-pilot plant, ensuring that the treated effluent meets the criteria for discharge into the sewage system. To carry out this work, two treatment systems A and B were developed, operating simultaneously, the first consisted of coagulation-flocculation and activated sludge, while the second consisted only of activated sludge, evaluating the quality parameters measured at the beginning and end of the treatments. The wastewater from the slaughterhouse presented great instability in its physicochemical characteristics, reflecting high values of standard deviation obtained in the initial samples. The removals of the two treatments applied to the slaughterhouse effluent allowed the reduction of nutrients and organic matter in considerable proportion, demonstrating that the proposed methods comply with the limits established by national and international regulations.

Keywords: slaughterhouses; wastewater; treatment; regulations; feasibility.

Introducción

El agua residual es el líquido que se genera como consecuencia del uso del agua en actividades antrópicas, donde se mezcla con otras sustancias y simultáneamente adquiere carga contaminante, misma que puede ser mineral u orgánica; las impurezas incorporadas pueden presentarse de manera disuelta, suspendida o coloidal¹. El agua se consume en hogares, instituciones, empresas e industrias y al convertirse en residual es enviada al sistema de alcantarillado, siendo transportada por una red de desagüe subterránea que terminan liberándose en ríos, lagos o mares sin ningún tipo de tratamiento previo².

Un camal o matadero es un establecimiento encargado de la producción de carne. De acuerdo con Philipp *et al.*³, es una industria muy grande debido a que la carne es una parte importante de la dieta en muchos países del mundo y su producción ha mostrado un crecimiento lineal a través de los años a nivel mundial, en consecuencia, se estima que su productividad siga en aumento. A pesar de ser una industria muy amplia en el país y a nivel mundial, el tratamiento de las aguas residuales de los mataderos sigue siendo un desafío, especialmente en países en desarrollo^{4,5}.

Uno de los problemas ambientales generales del Ecuador es

que la mayoría de los ríos y lagos de las regiones de la Costa, Sierra y Oriente, están contaminados por aguas residuales industriales, urbanas y domésticas, lo que conlleva a la degradación ambiental⁶. Parte de estas aguas contaminadas provienen de camales, teniendo en cuenta que la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) y Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP)⁷ identificaron más de 200 camales en el país y que éstos generan aguas residuales. El 45% están ubicados en zonas montañosas de la Sierra, el 38% en la Costa y el 17% ubicados en la Amazonía y Galápagos, en su mayoría manejadas por municipios.

El volumen de agua residual que produce un camal se genera durante las diversas etapas en el proceso de sacrificio de los animales, mezclado con los residuos de las operaciones de limpieza y desinfección que se llevan a cabo en el interior del establecimiento⁸. Las cargas de desechos en estas aguas constituyen altos niveles de contaminación que conducen a cambios constantes que influyen directamente en los ecosistemas terrestres y marinos⁹. La producción de carne en los camales trae consigo un volumen de agua residual que se genera, estimándose que el consumo de agua promedio por cabeza de ganado es: 0,26 m³ en porcinos, 0,67 m³ en bovinos y 0,17 m³ en ovinos¹⁰.

Las aguas residuales de los mataderos son complejas y no pueden descargarse en alcantarillas o cuerpos de agua naturales sin un tratamiento previo. Rinquest *et al.*¹¹ manifiestan que el efluente sin tratar puede aumentar significativamente las cargas de aguas residuales y contaminantes ambientales, causando eutrofización y desoxigenación de los sistemas de agua natural. Orssatto *et al.*¹² la composición de descarga en los camales generalmente se compone de: grasa, sal, proteína y fibra; algunas de estas aguas también contienen microorganismos patógenos y no patógenos, nutrientes, metales pesados, detergentes e incluso medicamentos veterinarios.

En el camal existen operaciones de pretratamiento como cribado y desengrasado para la descarga de sus aguas residuales, pero en el drenaje no se limpian completamente después de la operación, por lo que no existe un tratamiento completo óptimo que indique que el efluente cumpla la normativa del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) de descarga en el alcantarillado dentro del país. Abdouni *et al.*¹³ proponen que el tratamiento de aguas residuales en mataderos es una decisión fundamental para el crecimiento nacional, debe implementarse de acuerdo con las normativas nacionales y ser económicamente sostenible, ya que la descarga al medio ambiente del agua contaminada afecta el equilibrio de los ciclos biogeoquímicos y, por otra parte, aumenta la presencia de microorganismos infecciosos.

La implementación de una planta de agua residual para este tipo de descarga considera dos operaciones de tratamientos. El primario de coagulación-floculación consiste en un proceso físico-químico de separación sólido-líquido para la eliminación de materia orgánica coloidal y sólidos en suspensión presente en

las aguas residuales^{14,15}. Mientras que el secundario es un proceso biológico que tiene la capacidad de metabolizar y convertir la materia orgánica a través de oxidación biológica presente en suspensión o disuelta por intervención de microorganismos presentes, el tratamiento se lleva a cabo en sistema aerobio, debido a que su principal rol es que los microorganismos degraden y eliminen los compuestos orgánicos que contenga el agua residual¹⁶.

Según explica Silva *et al.*¹⁷, las empresas a menudo en sus aguas residuales destinan los lodos a sus alcantarillados, en donde se sedimenta, lo que produce la generación de otros desechos volátiles indeseables, como el caso de gases de metano, un contaminante ambiental. Desde el punto de vista de Metcalf¹⁸ las características físicas, químicas y microbiológicas de las aguas residuales industriales son tan variadas como la propia industria, pero toda esta agua debe ser adsorbida por el medio natural sin poner en peligro la salud y el bienestar de los seres vivos.

Por esa razón es importante asegurar la calidad de las aguas residuales, dado que el tratamiento es esencial para evitar tales problemas junto con una metodología de investigación de caracterización periódica del agua enfocadas en examinar los parámetros de calidad fisicoquímicos necesarios para el comportamiento de un flujo residual industrial¹⁹. Posiblemente, si se implementa un tratamiento para este tipo de agua residual se obtendrá un agua tratada con características físicas, químicas y microbiológicas que cumplan las normativas de descarga al sistema de alcantarillado público.

En Ecuador existen muy pocos estudios realizados sobre tratamientos de aguas residuales especializados en remediar la descarga de aguas negras al desagüe de un centro de faenamiento animal, pese a que este vertido de agua contaminada es una problemática a nivel nacional para los ecosistemas. Cabe mencionar que la mayoría de plantas de tratamiento municipales son incapaces de eliminar las elevadas densidades típicas de agua residual que generan estas industrias²⁰. Para una eficiencia y eficacia óptima de un tratamiento el diseño del proceso debe ser específico a la producción de los mataderos, a su vez, regirse a las necesidades de la planta de remediación de agua residual.

El objetivo de este estudio es caracterizar las propiedades fisicoquímicas del agua residual de un camal en la ciudad de Portoviejo, analizar las diferentes operaciones unitarias y desarrollar un esquema basado en la implementación de una planta piloto de tratamiento con sus respectivas valoraciones económicas sobre la factibilidad del proyecto a escala industrial, asegurando que las descargas tratadas cumplan con los criterios de calidad del agua de ser descargados al sistema de alcantarillado a nivel nacional e internacional.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló con la aplicación de metodología de estudio científico del tipo aplicada, explicativa y experimen-

tal, empleando diferentes etapas de tratamientos para la remediación de descarga actual de agua residual en el camal de la ciudad de Portoviejo. Los análisis de la experimentación se desarrollaron en el Laboratorio de Saneamiento de Portoaguas y en el Laboratorio de Saneamiento y Calidad del Agua de la Universidad Técnica de Manabí. Desde el punto de vista de Ramos²¹ el diseño experimental que se aplicó para el tratamiento de datos fue cuasi experimental manipulando la información con el programa estadístico de Microsoft Excel obteniendo estadística descriptiva e inferencial.

Preparación de la muestra

La experimentación inició con la toma de muestras en la jornada de faenamiento del camal de 14:00 p.m. a 22:00 p.m. de lunes a sábado con una duración total de monitoreo de seis meses. El muestreo aplicado fue de tipo compuesta, siguiendo las directrices de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2176: 2013²², debido a que su sistema de pretratamiento acumulaba toda la descarga de cada periodo discontinuo de faena por hora durante todo el día. La recolección se efectuó en el sitio de descarga de aguas residuales del camal posterior al desengrasado una vez cada dos semanas, considerando los días y jornadas más críticos de producción. Para los tratamientos aplicados, se recogió un volumen total de 20 litros por tratamiento; en cada toma de muestra el líquido se colocó en recipientes herméticos y fue transportado en condiciones de oscuridad para los respectivos análisis.

Análisis de caracterización del agua residual

Los parámetros analizados en el agua residual se seleccionaron con base en una búsqueda de documentaciones estrictamente relacionadas con el mismo tipo de efluente. Se evaluaron tanto en la muestra previa al tratamiento como en el agua tratada, donde se utilizaron distintos equipos con sus correspondientes técnicas.

Los análisis de calidad fisicoquímicos y microbiológicos se siguieron con las metodologías propuestas de acuerdo con manuales y protocolos especializados^{23,24}, que incluyen técnicas nefelométricas, volumétricas, colorimétricas, fotométricas y número más probable (NMP). Dentro de los parámetros físicos valorados está la conductividad, potencial de hidrógeno (pH), salinidad, temperatura y sólidos disueltos totales (TDS), realizados en un equipo multiparámetros, Marca YINMIK, modelo BLE-9909; también se efectuó el análisis de turbidez en un turbidímetro Apera TN500 TURBIDITY, los sólidos suspendidos totales (TSS) en espectrofotómetro HACH DR3900, y mediante volumetría parámetros químicos como: alcalinidad, cloruros y dureza total; hierro total en un colorímetro Checkers HC (ppm Iron) de HANNA y fósforo total en un colorímetro Checkers HC (ppm Phosphorus HR) de HANNA; cantidad de demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) donde se utilizó una incubadora DB600; cantidad de demanda química de oxígeno (DQO) en digestor HACH DRB 200 y leída en espectrofotómetro HACH DR3900; cantidad de nitritos y nitratos en las

muestras, se hizo la lectura de los valores en el espectrofotómetro GENESYS 180; y para la determinación de nitrógeno total de Kjeldahl (NTK) se manejaron los equipos de SpeedDigester K-436 y Buchi Destillation Unit K-355. Con respecto al parámetro microbiológico se estableció la estimación de la cantidad de coliformes fecales mediante la inoculación de la muestra en medio de cultivo con Lactose Broth y EC Broth.

El camal de Portoviejo dispone de un pretratamiento, que consta de un sistema de cribado para retener materia sólida de mayor tamaño, como coágulos de sangre, pedazos de huesos y contenido ruminal, las medidas de la rejilla son: un alto de 0,65 m, un largo de 0,8 m y un espacio entre barras de 0,01 m. Luego, sigue un desengrasador con el que pueden inmovilizar el excedente de grasa, las dimensiones son: un largo de 0,65 m, un ancho de 0,5 m y una altura de 1,2 m, junto con una canastilla móvil que retiene los aceites de 0,25 m de ancho, un largo de 0,25 m y una altura de 0,13 m. Por último, una captación que hace de presedimentador, cuya función es retener la mayor cantidad de sólidos sedimentables, posee un tiempo de retención hidráulico aproximado de 1,5 horas, una altura de 1,2 m, un largo de 2 m, un ancho de 0,5 m y un volumen de 1 m³.

Aplicación del tratamiento de agua residual

Para estudiar el comportamiento del tratamiento del agua residual fueron establecidos dos métodos semicontinuos operando en simultáneo. El primero, denominado A, constó de un tratamiento primario basado en el proceso de coagulación-floculación, seguido por un tratamiento secundario de lodos activados. Mientras que el segundo, designado B, constituye únicamente de la ejecución de un digestor aerobio de lodos activados.

Tratamiento primario: coagulación-floculación

La técnica de coagulación-floculación se llevó a cabo en un test de jarra cuyo objetivo fue experimentar las diferentes eficiencias del proceso por dosificación, tiempo y revoluciones de coagulante y polímero administrado²⁵. Mediante el test de jarra (Phipps & Bird 7790-960 Jar Tester) se evaluó la eficiencia preliminar de los coagulantes de sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$), policloruro de aluminio ($Al_2(OH)_3Cl$) y cloruro férrico ($FeCl_3$) preparados al 1% con diferentes dosis trabajando con 1 litro de muestra, pero con diferentes velocidades de agitación de revoluciones en cada etapa²⁶. Se definió una agitación rápida durante 1,5 minutos, una agitación lenta de 15 minutos y un tiempo de sedimentación de 10 minutos, tal como se muestra en la tabla 1. Además, para evaluar la eficiencia del agente químico, se realizó el análisis del comportamiento referente a la adición del coagulante en función de un parámetro de calidad.

Tabla 1. Configuraciones utilizadas en las mezclas de agentes coagulantes en cada ensayo.

Ensayo	$FeCl_3$	$Al_2(SO_4)_3$	$Al_2(OH)_3Cl$
Mezcla rápida (rpm)	300	200	200
Mezcla lenta (rpm)	75	63	63
Tiempo de sedimentación (min)	10	10	10

Fuente: Azabache *et al.*²⁶.

Para conseguir una mejor floculación de los flóculos formados y disminuir el tiempo de sedimentación, se planteó agregar un polímero catiónico (ISA-C8030) en la etapa de mezcla lenta con el coagulante que presentó mejor eficiencia. Fue preparado al 1% añadiendo lentamente al agua con agitación constante y con una pequeña elevación en la temperatura con el fin de disolver todo el polvo blanco granulado, una vez homogeneizado se dejó en reposo 30 minutos antes de usarlo en el tratamiento para lograr la mayor eficacia.

Tratamiento secundario: reactor discontinuo de lodos activados

El tratamiento de lodos activados consistió en el tratamiento de la muestra en un reactor de mezcla completa con la capacidad de tratar la muestra enlazado con un sedimentador secundario y eliminación de lodos²⁷. Para acondicionar los microorganismos presentes del agua residual con el fin de crear el lodo activado capaz de degradar la materia contaminante presente, se empleó el modelo de tratabilidad biológica a escala pre piloto, tal como se muestra en la tabla 2.

La formación de lodos climatizados de la tratabilidad biológica fue usada en proporciones iguales para el tratamiento de remediación para descarga al sistema de alcantarillado público, cuando se implementó el reactor aerobio de lodos activados en ambos tratamientos. En la figura 1 se observa la distribución de los reactores discontinuos de lodos activados similar al sistema propuesto por Rodríguez *et al.*²⁹, donde la alimentación del reactor se realizó por gravedad por diferencia de altura en donde el flujo fue controlado por válvulas de venocllisis, el sistema de goteo fue realizado en un recipiente plástico transparente de 29,5 cm de largo, 16 cm de ancho y 11,5 cm de alto con una salida de alimentación de 2 cm de altura.

El diseño de los reactores fue a partir de un recipiente plástico transparente de 0,3 cm de espesor, 40 cm de largo, 27 cm de ancho y 39 cm de alto. El volumen útil que trabajó el reactor fue de 15 L, el volumen que ocupó el lodo activado de la etapa de aclimatación fue de 1,5 L por reactor con una salida del licor de mezcla situada a 6 cm de altura. Para el sistema de aireación

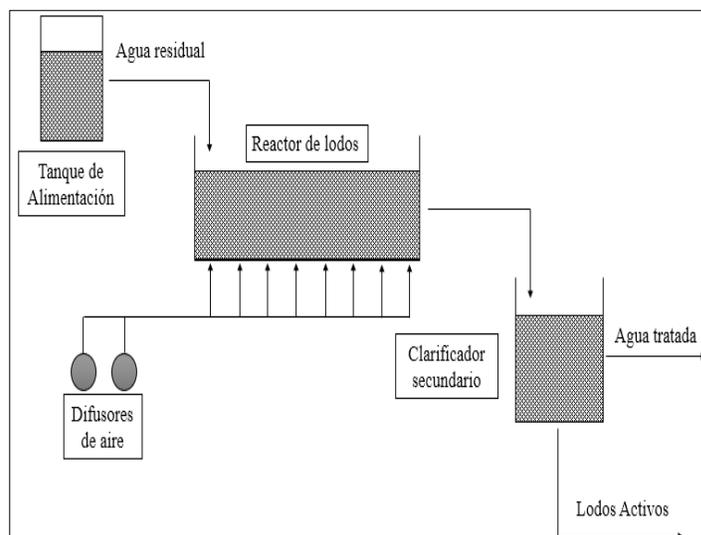


Fig. 1: Distribución escalonada del reactor discontinuo de lodos activados. Fuente propia.

de los reactores, se usaron dos aireadores Heto Model X-8 de doble salida adaptadas con 8 piedras difusoras de burbuja fina de 10 cm de longitud y 1,5 cm de ancho a un Flujo de 16 L/min de aire ubicados en la base del reactor, de tal manera que estén colocados en sitios estratégicos con la finalidad de tener todo homogeneizado y representar un estado de mezcla completa. En la fase de sedimentación se usó un recipiente cilíndrico plástico de 20,5 cm de diámetro y 25,5 cm de alto, con una salida lateral de 5,5 cm de altura del agua clarificada y una purga de lodos situada en la parte inferior del equipo.

Parámetros cinéticos

El método estándar para determinar los coeficientes cinéticos midiendo el cambio en la concentración del sustrato a lo largo del tiempo se usa en los modelos de reactor por lotes y puede calcularse con el balance de masa del sustrato para un reactor continuo de mezcla perfecta³⁰. Usando ecuaciones cinéticas discretas se puede determinar si hay suficiente tiempo de aireación en la etapa de reacción seleccionado para producir el grado deseado de descomposición mediante la acción de microorganismo en el proceso de lodos activados.

Tabla 2. Resumen del procedimiento para la tratabilidad biológica a escala pre-piloto.

Volumen de aireación	15 litros de agua de desecho		
Volumen de la porción alimentada	800 ml		
Procedimiento de alimentación	Extraer 1000 ml de la cámara de aireación. Asentar durante 30 min en un cilindro de 1000 ml. Decantar y descartar 800 ml. Rellenar el cilindro hasta 1000 ml con desecho fresco y regresar a la cámara de aireación.		
Fase	Frecuencia de alimentación	Velocidad promedio de alimentación, ml/hr	Tiempo de retención, h
Aclimatación	Una vez cada 8 horas	100	150
Formación de lodo	Una vez cada 4 horas	200	75
Estudios de velocidad	Una vez cada 2 horas	400	37,5
Estudios de velocidad	Una vez cada hora	800	18,75
Estudios de velocidad	Una vez cada 0,5 hora	1600	9,38

Fuente: Kemmer y McCallion²⁸.

El parámetro de la velocidad de consumo de sustrato se expresa comúnmente por unidad de masa de biomasa presente en el reactor, representada por la siguiente expresión³¹:

$$q_s = \frac{(S_a - S_e)}{\theta_H X} \quad (Ec. 1)$$

donde q_s = velocidad específica de consumo de sustrato, S_a = concentración de sustrato en la alimentación, S_e = concentración en la corriente de salida, θ_H = tiempo de residencia hidráulica y X = concentración de biomasa en el reactor. El modelo cinético de Michaelis-Menten expresa de la velocidad de consumo específico de sustrato para un caso general^{32,33}:

$$q_s = q_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (Ec. 2)$$

donde q_{max} = velocidad máxima de consumo específico de sustrato, S = concentración de sustrato y K_s = constante de saturación del sustrato. La velocidad de consumo específico de sustrato puede ser expresada en términos de la cinética de tipo Monod por:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{kXS}{K_s + S} \quad (Ec. 3)$$

donde $k = \mu_{max}$ = tasa máxima de utilización del sustrato por unidad de peso de microorganismos. Despejando la fórmula hasta obtener una función lineal obtenemos:

$$\frac{\bar{X} dt}{S_0 - S_f} = \frac{K_s}{k} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{k} \quad (Ec. 4)$$

donde \bar{X} = concentración promedio de biomasa en el reactor, S_0 = concentración de sustrato en la alimentación y S_f = concentración en la corriente de salida. La expresión gráfica queda expresada en $\bar{X} dt/dS$ vs $1/S$ dando una tendencia lineal, donde la pendiente e intercepción de la recta son K_s/k y $1/k$, respectivamente.

El balance de masa empleado para la tasa de producción de biomasa de una reacción puede ser expresado por la fórmula correspondiente a la velocidad neta de crecimiento específico³¹:

$$\frac{1}{\theta_H} = \frac{\mu_{max} S_e}{k_s + S_e} - k_d \quad (Ec. 5)$$

donde k_d = coeficiente de respiración endógena. Reordenando la fórmula para calcular el coeficiente de respiración endógena queda:

$$k_d = \frac{\mu_{max} S_e}{k_s + S_e} - \frac{1}{\theta_H} \quad (Ec. 6)$$

La concentración de microorganismo en forma de biomasa en el afluente se puede obtener de la siguiente a manera:

$$X = \frac{Y(S_a - S_e)}{(1 + \theta_H k_d)} \quad (Ec. 7)$$

donde Y = producción de biomasa por consumo de sustrato.

Despejando la fórmula para calcular la producción de biomasa

por consumo de sustrato:

$$Y = \frac{X(1 + \theta_H k_d)}{(S_a - S_e)} \quad (Ec. 8)$$

Calidad del lodo del reactor aerobio

Para evaluar la calidad del lodo creado en el reactor biológico aerobio del tratamiento fue determinada por el análisis del índice volumétrico (IVL), de acuerdo con la metodología propuesta por el Standard Methods²⁴. El parámetro de calidad del lodo se calcula a través de las fórmulas propuestas por Kemmer y McCallion²⁸.

$$IVL = \frac{C_v}{C_s} \times 1000 \quad (Ec. 9)$$

donde C_v = volumen asentado (prueba del cono de Imhoff), ml/L y C_s = sólidos suspendidos en el licor mixto, mg/L. Así mismo, fue determinada la edad del lodo en el funcionamiento del reactor biológico aerobio, mediante la siguiente fórmula:

$$Edad\ del\ lodo = \frac{C_s}{C_i} \times D \quad (Ec. 10)$$

donde C_s = sólidos en el recipiente de aireación, mg/L; C_i = sólidos que entran al recipiente, mg/L y D = retención en días.

Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica inicial del agua residual del camal

Los datos registrados de los parámetros de calidad del agua residual del camal, con un total de doce muestras durante un semestre de análisis y estudio, se presentan en la tabla 3. De acuerdo con las normativas seleccionadas de Ecuador (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente), Nicaragua (Decreto Ejecutivo N°. 21-2017) y Venezuela (Normas oficiales para la calidad del agua en Venezuela) los valores de conductividad, pH y ST están dentro de los límites de descarga al sistema de alcantarillado público. Sin embargo, se observó que los valores de fósforo total, NTK, DQO y DBO₅ se encuentran muy por encima de los que establecen las normativas; entre los límites permisibles de la normativa ecuatoriana los TSS en ocasiones se encontraban fuera de norma y, de igual manera, en la normativa nicaragüense la cantidad de hierro total incumplió ocasionalmente el límite establecido.

El pH promedio del efluente indica que el agua residual del camal es poco alcalina, valores cercanos a estos fueron reportados por Medina-Valderrama *et al.*³⁴ y Quille Calizaya y Donaires Flores³⁵, cabe señalar que el agua residual ácida influye en la corrosión y una básica en el aumento de precipitado de sales formando incrustaciones, ambas afectan el balance químico y ecológico del cuerpo receptor en los drenajes³⁶. Por consiguiente, el cálculo de la dureza total relaciona a un tipo de agua residual muy dura, infiriéndose la presencia de altas concentraciones de calcio y magnesio, aunque en la ciudad de Portoviejo utilizan el servicio de agua potable para la limpieza, en el

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica inicial del agua residual antes de los tratamientos ensayados.

Parámetro	Unidad	Valor promedio ± Desviación [12]	Norma Ecuador	Norma Nicaragua	Norma Venezuela
Turbiedad	NTU	64,66 ± 37,29	-	-	-
Conductividad	µS/cm	1210,44 ± 547,76	-	5000	-
pH		7,85 ± 0,65	6 - 9	6 - 9	6 - 9
Salinidad	%	0,57 ± 0,28	-	-	-
Temperatura	°C	22,71 ± 2,36	-	-	-
TDS	mg/L	628,79 ± 263,49	-	-	-
TSS	mg/L	156,48 ± 73,36	220*	400	400
ST	mg/L	773,23 ± 318,93	1.600	1.500	1.600
Cloruro	mg/L	456,44 ± 172,42	-	-	-
Alcalinidad	mg/L	417,38 ± 269,49	-	-	-
Dureza total	mg/L	389,22 ± 190,46	-	-	-
Hierro total	mg/L	6,87 ± 3,65	25	10	25
Fósforo total	mg/L	27,34 ± 19,05	15*	12*	10*
Nitritos	mg/L	9,80 ± 7,79	-	-	-
Nitratos	mg/L	744,53 ± 580,57	-	-	-
NTK	mg/L	250,38 ± 28,23	60*	60*	-
DQO	mg/L	5976,31 ± 2.382,91	500*	900*	900*
DBO ₅	mg/L	2683,13 ± 598,90	250*	400*	350*
IB	-	0,46 ± 0,08	-	-	-
Coliformes fecales	NMP/100ml	13733,33 ± 3.925,98	-	-	-

pH: Potencial de hidrógeno. TDS: Sólidos disueltos totales. TSS: Sólidos suspendidos totales. ST: Sólidos totales. NTK: Nitrógeno total de kjeldahl. DQO: Demanda química de oxígeno. DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno. IB: Índice de biodegradabilidad. [12]: Doce muestras compuestas por monitoreo de seis meses. *: Parámetro fuera de los límites permisible por las normas. Ecuador: Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Libro VI Anexos 1. Nicaragua: Decreto Ejecutivo N°. 21-2017. Venezuela: Normas oficiales para la calidad del agua en Venezuela.

camal las grandes generaciones que desecha el faenamamiento incrementan el valor de este parámetro.

La medida de hierro total obtenida se encuentra levemente por debajo del rango para mataderos (hierro ≤ 14) reportados por Fonfría y Ribas³⁷. El agua residual del matadero en su composición contiene gran parte sangre de bovino y porcino, de modo que la tonalidad del color rojizo del agua predomina por la presencia de iones de hierro que al estar expuestos al aire se oxidan lentamente formando un precipitado de ion férrico, lo que ocasiona que aumente la turbidez e intensifique el color a oscuro³⁸. Es fundamental la presencia de nitrógeno y fósforo en el agua ya que son nutrientes esenciales para los ciclos de la materia, tanto en la vida marina como para el medio ambiente que los rodea, además de aportar en el crecimiento de macro y microorganismos en las fuentes de agua²⁴. En la caracterización se aprecia la existencia de iones naturales de nitrógeno como nitritos y nitratos, los valores de estos parámetros presentan una concentración elevada muy descentralizada, es decir, en cada caracterización del agua residual el valor de nitritos y nitratos varió considerablemente en las muestras iniciales. Mientras que, el NTK posee una concentración inferior a nitratos con una dispersión notable, comportamiento semejante fue proporcionado por Garneró³⁹. La cantidad de fósforo total medido de muestra una concentración moderadamente elevada con una variación sumamente dispersa, conducta similar fue reportada

por Ruiz *et al.*⁴⁰. La presencia de altas concentraciones de estas sustancias en masas de agua manifiesta problemas especiales causando una eutrofización más rápida en los canales receptores, lo que provoca una rápida disminución de las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) ralentizando los ciclos bioquímicos³².

La mayoría de los valores obtenidos de TSS, DQO y DBO₅ presentan una alta dispersión debido a la composición del agua residual, este comportamiento varía con la cantidad de faenamamiento diario que representan las altas concentraciones de materia orgánica, valores con el mismo comportamiento, pero con mayor concentración fueron reportados por Pabón y Suárez⁴¹. Este acontecimiento origina una señal alarmante de sobrecarga de contaminantes orgánicos a la red de alcantarillado público por superar los límites permisibles para su descarga, razón por la cual se requiere tomar acciones para reducir la carga orgánica minimizando el impacto ambiental de estas aguas residuales hasta cumplir normativas.

Con frecuencia, este camal emplea peróxido de hidrógeno para actividades de limpieza en la jornada de trabajo, este compuesto químico en contacto con el agua residual reacciona con la materia orgánica teniendo un efecto oxidante que permite mineralizar los compuestos, incluso los poco biodegradables; la interacción prolongada con el agente interviene en el crecimiento de la contaminación por microorganismos y oxida los

compuestos inorgánicos hasta el punto de obtener dióxido de carbono e iones⁴². Por ese motivo, el índice de biodegradabilidad (DBO₅/DQO) promedio del camal de Portoviejo es de 0,46, indicando que el contenido orgánico presente es biodegradable por lo que es factible aplicar un tratamiento biológico al agua residual que se descarga al sistema de alcantarillado público⁴³.

Evaluación de coagulantes químicos

Con la prueba de jarras se evaluó el comportamiento de tres diferentes coagulantes en las mismas condiciones de dosificación. Este tipo de procedimiento analiza la reducción de la turbidez, no obstante, el objetivo del tratamiento es la descarga al sistema de alcantarillado y debido a la naturaleza del agua residual del camal fue establecido el análisis de DQO como variable representativa de este proceso, la alta concentración de carga orgánica que está presente en la muestra inicial incide en el elevado valor del parámetro (figura 2).

Al finalizar esta etapa se identificó que el coagulante que tiene mayor eficiencia de remoción fue el cloruro férrico a diferencia del sulfato de aluminio y el policloruro de aluminio, presentando un resultado preliminar con un 62,80% de remoción de materia orgánica. De acuerdo con Zerbato *et al.*⁴⁴, esto fue debido a que el uso de cloruro férrico tiene ventajas sobre otros coagulantes al tratarse con agua residual, incluida su eficacia en un amplio rango de pH y temperatura, así mismo esta produce iones trivalentes de mayor peso molecular que son esenciales para el proceso de coagulación para la sedimentación de flóculos formados.

Dosificación óptima con cloruro férrico y polímero catiónico

La determinación de la remoción de DQO con diferentes variaciones de dosificación del cloruro férrico y con una dosis de 0,75 ml de polímero catiónico, valor propuesto en función del coagulante por Azabache *et al.*²⁶, dio como resultado una curva de dispersión en donde se observaron los puntos representativos de este análisis (figura 3).

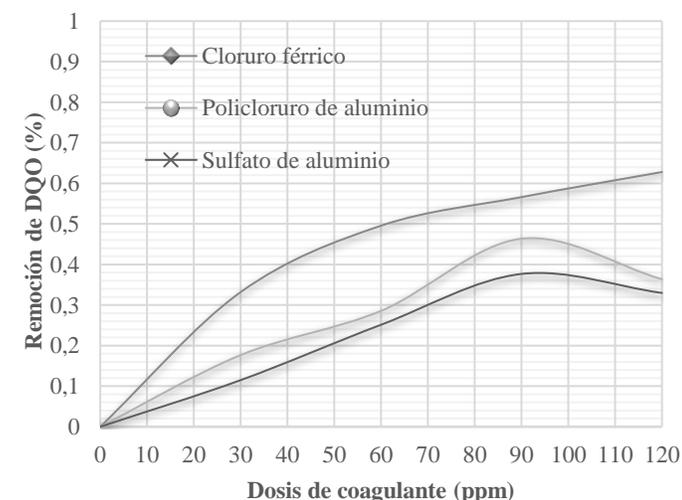


Fig. 2: Evaluación preliminar de coagulantes.

Como se observó, destaca como dosis óptima de cloruro férrico la dosificación en la que se aplicaron 280 ppm junto con 7,5 ppm de polímero catiónico por obtener el mejor porcentaje de remoción de DQO de un 67,67%. El porcentaje de remoción obtenido es cercano al reportado por Garnero³⁹ del agua residual del efluente de un frigorífico con un valor de 71,1%, sin embargo, ellos ajustaron el pH a 6 con una dosis similar de cloruro férrico correspondiente a 280 ppm, lo que les permitió conseguir una leve mejora en eficiencia con el coagulante.

Operación de la planta pre piloto

El tratamiento A constó de un recipiente con el agua pretratada, esta se administraba en el proceso de coagulación-floculación donde se homogeniza la mezcla añadiendo cloruro férrico y polímero catiónico en dosis óptima por medio de la prueba de jarra.

Posteriormente, el agua tratada pasaba por un sedimentador con sistema de purga y salida de agua que alimentaba al reactor de lodos activados con un volumen de 15 litros, inyectando por medio de un aireador 16 L/min con un tiempo de residencia hidráulico de 3,75 días, junto con un clarificador secundario que dispone de un sistema de purga. La tabla 4 presenta los datos de la caracterización obtenida del agua tratada.

El tratamiento B constó de un recipiente con el agua fresca que fue de alimentación para el reactor de lodos activados con un volumen de 15 litros, inyectando por medio de un aireador 16 L/min con un tiempo de residencia hidráulico de 5 días, junto con un clarificador secundario que dispone de un sistema de purga. La tabla 5 presenta los datos de la caracterización obtenida del agua tratada.

En el tratamiento primario de la tabla 4 (coagulación, floculación y sedimentación) el agua residual se mezcló con el coagulante y floculante, la sal de cloruro férrico en contacto con

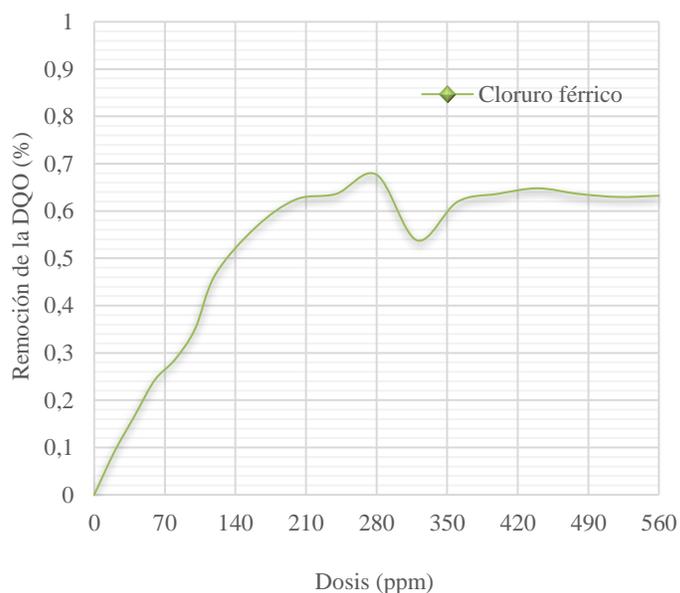


Fig. 3: Reducción de DQO con cloruro férrico y polímero catiónico al 1%.

Tabla 4. Caracterización del agua residual tratada por el primer tratamiento.

Parámetro	Unidad	A ₁	A ₂	A ₃	% R
Turbidez	NTU	68,43 ± 0,06	27,40 ± 0,20	22,83 ± 0,23	66,63
Conductividad	μS/cm	1442,67 ± 4,16	1574,67 ± 2,31	1423,00 ± 7,81	1,36
pH		7,87 ± 0,04	7,04 ± 0,01	7,02 ± 0,01	10,80
Salinidad	%	0,67 ± 0,06	0,77 ± 0,06	0,67 ± 0,06	0,00
Temperatura	°C	26,20 ± 0,10	25,40 ± 0,10	24,60 ± 0,10	6,11
TDS	mg/L	763,33 ± 1,15	733,33 ± 1,53	693,33 ± 4,93	9,17
TSS	mg/L	293,67 ± 6,66	49,33 ± 1,15	138,67 ± 0,58	52,78
ST	mg/L	1057,00 ± 6,08	782,67 ± 2,52	832,00 ± 4,36	21,29
Cloruro	mg/L	359,89 ± 59,98	699,78 ± 39,99	323,23 ± 20,81	10,19
Alcalinidad	mg/L	1139,54 ± 116,10	1441,19 ± 153,59	227,91 ± 25,30	80,00
Dureza total	mg/L	426,67 ± 48,88	240,00 ± 27,71	192,00 ± 16,00	55,00
Hierro total	mg/L	7,67 ± 2,31	33,37 ± 0,55	0,50 ± 0,01	93,43
Fósforo total	mg/L	19,33 ± 0,58	11,33 ± 0,58	0,47 ± 0,06	97,59
Nitritos	mg/L	24,90 ± 0,10	1,75 ± 0,05	1,18 ± 0,02	95,28
Nitratos	mg/L	587,50 ± 11,07	459,12 ± 3,12	65,06 ± 0,81	88,93
NTK	mg/L	263,80 ± 10,70	235,78 ± 10,70	31,52 ± 3,50	88,05
DQO	mg/L	8068,15 ± 14,56	2958,56 ± 61,56	255,79 ± 0,96	96,83
DBO	mg/L	3614,00 ± 116,76	1848,33 ± 120,23	178,33 ± 5,51	95,07
IB	-	0,45 ± 0,01	0,63 ± 0,05	0,70 ± 0,02	-
Coliformes fecales	NMP/100ml	13733,33 ± 3.925,98	876,67 ± 63,51	183,33 ± 11,55	98,67

A₁: Agua residual después del pretratamiento. A₂: Agua tratada del sedimentador primario de coagulación-floculación.

A₃: Agua tratada del clarificador secundario del reactor de lodos activados. % R: Remoción total de parámetros fisicoquímicos.

Tabla 5. Caracterización del agua residual tratada por el segundo tratamiento.

Parámetro	Unidad	B ₁	B ₂	% R
Turbidez	NTU	68,43 ± 0,06	49,23 ± 0,15	28,06
Conductividad	μS/cm	1442,67 ± 4,16	1273,33 ± 8,14	11,74
pH		7,87 ± 0,04	7,34 ± 0,06	6,77
Salinidad	%	0,67 ± 0,06	0,57 ± 0,06	15,00
Temperatura	°C	26,20 ± 0,10	25,07 ± 0,06	4,33
TDS	mg/L	763,33 ± 1,15	637,00 ± 2,65	16,55
TSS	mg/L	293,67 ± 6,66	208,00 ± 1,00	29,17
ST	mg/L	1057,00 ± 6,08	845,00 ± 3,00	20,06
Cloruro	mg/L	359,89 ± 59,98	216,60 ± 20,81	39,81
Alcalinidad	mg/L	1139,54 ± 116,10	127,36 ± 25,30	88,82
Dureza total	mg/L	426,67 ± 48,88	144,00 ± 16,00	66,25
Hierro total	mg/L	7,67 ± 2,31	0,28 ± 0,01	96,30
Fósforo total	mg/L	19,33 ± 0,58	0,93 ± 0,15	95,17
Nitritos	mg/L	24,90 ± 0,10	5,51 ± 0,01	77,85
Nitratos	mg/L	587,50 ± 11,07	58,41 ± 0,07	90,06
NTK	mg/L	263,80 ± 10,70	44,36 ± 5,35	83,19
DQO	mg/L	8068,15 ± 14,56	378,60 ± 1,41	95,31
DBO ₅	mg/L	3614,00 ± 116,76	192,33 ± 2,52	94,68
IB	-	0,45 ± 0,01	0,51 ± 0,01	-
Coliformes fecales	NMP/100ml	13733,33 ± 3.925,98	346,67 ± 11,55	97,48

B₁: Agua residual después del pretratamiento. B₂: Agua tratada del clarificador secundario del reactor de lodos activados.

% R: Remoción total de parámetros fisicoquímicos.

el agua del camal se disocia en iones de cloruro y hierro con el fin de desestabilizar las cargas y sedimentarse en partículas de mayor peso molecular, debido a esto el contenido presenta un incremento de cloruros en un 94,44% y un 335,22% en hierro. A partir de la etapa A₂ del tratamiento se observó un cambio significativo en la remoción de turbidez con un 59,96% trabajando con las dosis óptimas, valores similares fueron reportados en Castro *et al.*⁴⁵, obteniendo aproximadamente un 55,3%

trabajando con 320 ppm de coagulante. Esto fue debido a que este proceso causó la precipitación de los componentes contaminantes suspendidos y coloidales presentes generando aproximadamente un 30% de lodos a partir del agua residual, dentro de sus parámetros destacó una reducción sobresaliente en el análisis microbiológico de 93,09% en la presencia de coliformes fecales.

Los valores de remoción para TSS fueron de 83,20% y un 21,85% para nitrato cuando se evaluó esta etapa, pero las estimaciones presentadas por Azabache *et al.*²⁶, fueron en presencia de concentraciones iniciales más elevadas por lo que presentó una baja reducción de TSS con un 1,79%, pero con un porcentaje similar de reducción en un 20% para nitrato con la misma configuración del test de jarra, aunque trabajó con 40 ppm de cloruro férrico y 15 ppm de polímero catiónico durante 35 minutos de sedimentación. De igual manera, se apreció un leve cambio en la remoción del valor de NTK se redujo un 10,62% trabajando con las condiciones iniciales, no obstante, en el análisis obtenido en Garneró³⁹ es sumamente superior la remoción dando un 68,8% ajustando el pH a 6 con 280 ppm de dosis óptima de cloruro férrico.

El porcentaje de remoción que presentó este tratamiento fue de 63,33% para la materia orgánica presente en el análisis de DQO, pero el valor obtenido es ligeramente inferior por Boughou *et al.*⁴⁶ del agua residual de Rabat, Marruecos que cuenta con un matadero municipal situado en Yacoub Al Mansour con un valor de 54,40% con la condición de trabajar con un pH de 5,83. Sin embargo, ellos emplearon una dosis inferior de cloruro férrico correspondiente a 28,8 ppm, además de una configuración diferente del test de jarra que consistió en una mezcla rápida de 120 rpm por 30 segundos y una mezcla lenta de tan solo 40 rpm por 20 minutos, lo que les permitió conseguir esa eficiencia.

El índice de biodegradabilidad (DBO₅/DQO) del agua residual tratada con cloruro férrico y polímero catiónico se elevó hasta 0,63 implicando que se precipitó en forma de lodos aproximadamente 1/3 de materia orgánica poco biodegradable e indicando que el contenido orgánico presente en el agua residual por naturaleza ahora es muy biodegradable, de modo que es muy viable aplicar un tratamiento biológico al agua residual tratada⁴³.

En las tablas 4 y 5 se observó una mejoría notable en la mayoría de los parámetros analizados de los valores del agua tratada por el reactor de lodos activados, la cantidad de materia orgánica biodegradable DBO₅ del agua tratada, el valor de remoción oscila entre 90,35% para A y 94,68% para B con un tiempo de retención hidráulica de 3,75 y 5 días respectivamente, se encontraron levemente mayor del rango reportado para sistemas de reactores biológicos para tratamientos de agua residual Sombatsompop *et al.*⁴⁷. En cuanto a la remoción de DBO₅ reportados por Oktafani *et al.*⁴⁸, fue del 72,23% en el tratamiento de aguas de matadero de pollos mediante GAS-SBR con un tiempo de aireación de 2 horas. Por otro lado, Pabón y Suárez Gélvez⁴¹, quienes aplicaron un arranque y operación de un tratamiento combinado para los efluentes de frigoríficos que consistió de cribas, desarenador, sedimentador primario, homogeneización, reactor de lodos activados y filtro biológico, lograron porcentajes de remoción de DBO₅ de un 46,4% en el proceso aerobio.

En relación con las eficiencias de remoción de DQO alcanzadas tanto para el tratamiento A como para B fueron de 91,35% y 95,31%, respectivamente, se encontraron dentro del rango reportado para otros sistemas de tratamientos biológicos de lodos activados⁴⁹. Autores como Carrasquero *et al.*⁵⁰, lograron una remoción entre 90,92% y 93,78% de la DQO en su fase aeróbica trabajando con un efluente de un matadero de reses, usando un reactor por carga secuencial (SBR) de tres fases: la primera anaerobia de 1,5 horas, la segunda aeróbica de 10 horas y la última anóxica de 2,5 horas. Esta reducción en los reactores aerobios del parámetro nos proporciona la medida de DQO degradable del agua residual por medio de la diferencia de entrada y salida del proceso aerobio piloto⁵¹.

Se llevó a cabo un análisis de los datos recopilados durante la eliminación del DQO en dos los tratamientos biológicos de A y B. Los resultados, que se pueden apreciar en la tabla 6, indican que, según la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de remoción de DQO en los datos analizados ($p > 0,05$). En consecuencia, se puede afirmar que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 6. Pruebas de normalidad

Pruebas de normalidad				
	Tratamientos	Kolmogórov-Smirnov		
		Estadístico	gl	Sig.
% Remoción	A	0,102	32	0,200
DQO	B	0,118	32	0,200

No obstante, en la prueba de Levene detallada en la tabla 7, se detecta la falta de homogeneidad entre las varianzas ($p < 0,05$), lo que resalta diferencias significativas en las varianzas de ambos tratamientos. Por consiguiente, se procede a llevar a cabo una prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Tabla 7. Prueba de homogeneidad de varianza

	Estadístico de Levene	gl ₁	gl ₂	Sig.
% Remoción DQO	4,285	1	62	0,043

Al analizar los resultados de la tabla 8 mediante la prueba U de Mann-Whitney, se identifican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos utilizados ($p < 0,05$).

Esto se refleja claramente en la figura 4, donde se aprecia que el tratamiento B presenta un mejor rendimiento en términos del porcentaje de remoción de DQO en el proceso biológico de lodos activados.

Tabla 8. Prueba de U de Mann-Whitney de muestras independientes para remoción de DQO

Resumen de prueba de hipótesis			
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	
La distribución de % Remoción DQO es la misma entre las categorías de tratamientos.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	0,00	

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de 0,05.

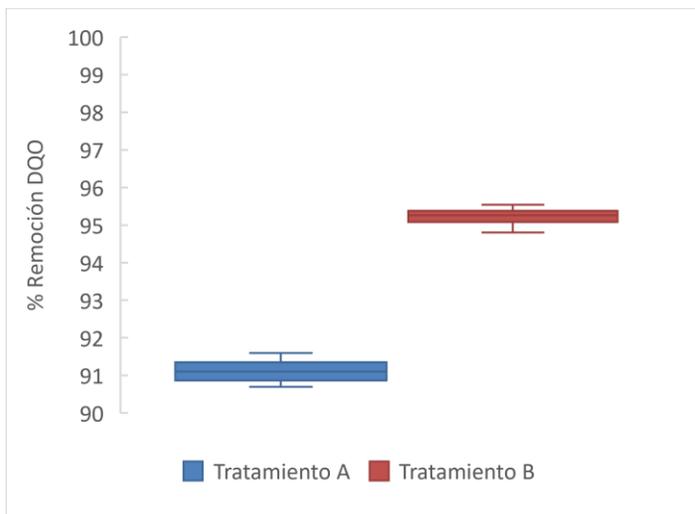


Fig. 4: Remoción de DQO en tratamientos biológicos de A y B.

Se observó un buen porcentaje en las eficiencias de remoción de fósforo total, tanto para el tratamiento A como para B fueron de 95,88% y 95,17% respectivamente, se encontraron valores mayores al rango reportado por Rahimi *et al.*⁴⁹, obteniendo una eficiencia que varía entre 76% al 90% para sistemas de tratamientos biológicos de reactores discontinuos. En cuanto con la cantidad de TKN de las aguas tratadas, el valor de remoción oscila entre 86,63% para A y 83,19% para B, dichos porcentajes se encuentran ligeramente dentro del rango reportado por Sombatsompop *et al.*⁴⁷, con un valor entre 86% a 93% para sistemas de reactores biológicos secuenciales para agua residual. Pero en los análisis reportados por Carrasquero *et al.*⁵², se logró una remoción inferior en fósforo total con 56% y cercana en NTK con 81% en su fase aeróbica trabajando con un efluente proveniente de un matadero de reses, usando un reactor por carga secuencial (SBR) con un tiempo de retención hidráulica de 12 horas en tres fases: anaerobia, aerobia y anóxica.

La remoción de la cantidad de sales de bicarbonato, cloruros, sulfatos, calcio, magnesio y sodio medidos por medio del análisis de dureza total obtuvieron un 20% para A y un 66,25% para B; mientras que, la reducción de iones inorgánicos en el tratamiento biológico de lodos activados en forma de cloruros presentó un 53,81% para A y 39,81% para B. Autores como Calderón *et al.*⁵³, lograron una remoción inferior de 15,30% en dureza total y 28,53% en cloruros con la aplicación de microorganismo eficaces EM® como inóculos microbianos en las aguas residuales domésticas en las lagunas de oxidación de Subtanjalla con un tiempo de residencia de un mes y medio. En tratamientos convencionales estos dos parámetros no muestran una reducción significativa en procesos aerobios, pero con el uso de los microorganismos eficientes en tratamientos biológicos a través de su digestión aceleran la degradación natural de los compuestos orgánicos y destruyen las impurezas de los microorganismo patógenos⁵⁴; condición similar sucede con la biomasa activa de los reactores de los tratamientos A y B, por lo que el lodo activado creado a partir de la misma agua residual del camal posee un comportamiento semejante a este tipo

de microorganismos y por ende presenta una agua tratada con valores inferiores de los que ingresó al reactor.

En las aguas residuales de mataderos y frigoríficos en general es posible conseguir buenos porcentajes de remoción de los parámetros del agua al aplicar un tratamiento aerobio debido a la composición de estas aguas. En el tratamiento A el porcentaje de remoción en ciertos análisis fue menor al tratamiento B debido a la implementación del proceso primario de coagulación-floculación.

La remoción total de carga alcanzada en ambos tratamientos presenta buenos porcentajes en la caracterización del agua tratada, el tratamiento A dispone de remociones promedio en su mayoría más elevadas como un 66,63% de turbidez; 93,43% de hierro total; 97,59% de fósforo total; 88,05% de NTK; 96,83% de DQO; 95,07% de DBO₅ y 98,67% de coliformes fecales. Por su parte, el tratamiento B dispone de remociones promedio levemente inferior como un 28,06% de turbidez; 96,30% de hierro total; 95,17% de fósforo total; 83,19% de NTK; 95,31% de DQO; 94,68% de DBO₅ y 97,48% de coliformes fecales.

Para que el agua residual del camal pueda ser descargada al sistema de alcantarillado público se debe comprobar el cumplimiento de los límites permisibles de las normativas del país, dado que esta no debe poner en peligro la salud y el bienestar de los seres vivos que la rodean, tal es el caso de las de normas de Ecuador, Nicaragua y Venezuela que establecen valores máximos para ciertos parámetros como son conductividad, pH, temperatura, TSS, ST, hierro total, fósforo total, nitrógeno total Kjeldahl, DQO y DBO₅. La ejecución de ambos tratamientos con sus respectivos tiempos de residencia hidráulica y operaciones demuestran que los procesos propuestos cumplen los límites establecidos por estas tres normativas, por lo tanto, el agua tratada por estos sistemas puede ser descargada al alcantarillado público.

Esquema del diseño de plantas

En la ejecución del diseño de la planta se registraron diversas variables vinculadas a las operaciones de los tratamientos, donde V es volumen en m³, Q es caudal en m³/d, S es DQO en mg/L y X son sólidos suspendidos volátiles en mg/L. En la figura 5 se registraron las diversas operaciones del primer tratamiento denominado A, que consistió en un tratamiento de coagulación-floculación seguido de un reactor de lodos activados. Mientras que, en la figura 6 se registraron las diversas operaciones del segundo tratamiento denominado B que consistió únicamente de un tratamiento secundario de un reactor de lodos activados.

Parámetros cinéticos

Para identificar los parámetros cinéticos del proceso biológico, es necesario conocer primero la velocidad específica de consumo de sustrato por cada uno de los tratamientos que se resuelve con la ecuación 1:

$$(A) q_s = \frac{(S_a - S_e)}{\theta_H X} = \frac{(2958,56 - 255,79) \text{ mg/L}}{(3,75 \text{ d})(1484 \text{ mg/L})} = 0,624 \frac{\text{mg DQO}}{\text{mg SSV} * \text{d}}$$

$$(B) q_s = \frac{(S_a - S_e)}{\theta_H X} = \frac{(8068,15 - 378,60) \text{ mg/L}}{(5 \text{ d})(1484 \text{ mg/L})} = 0,832 \frac{\text{mg DQO}}{\text{mg SSV} * \text{d}}$$

En la figura 7 se puede ver la representación gráfica de la función lineal de la ecuación 4 para el cálculo de las constantes cinéticas k y K_s obtenidas a partir del modelo cinético.

De acuerdo con los datos de la figura 6, se determinaron los valores de k= 0,624 mg DQO/mg SSV*d y K_s=0,044 mg DQO/L para el tratamiento A; y para el tratamiento B fueron k= 1,039 mg DQO/mg SSV*d y K_s=0,062 mg DQO/L.

Para el cálculo del coeficiente de respiración endógena se utilizó la ecuación 6 dando:

$$(A) k_d = \frac{\mu_{max} S_e}{k_s + S_e} - \frac{1}{\theta_H} = \frac{(0,624)(255,79)}{(0,044 + 255,79)} - \frac{1}{3,75} = 0,0357 \text{ d}^{-1}$$

$$(B) k_d = \frac{\mu_{max} S_e}{k_s + S_e} - \frac{1}{\theta_H} = \frac{(1,039)(378,6)}{(0,062 + 378,6)} - \frac{1}{5} = 0,0839 \text{ d}^{-1}$$

Para el cálculo de la producción de biomasa por consumo de sustrato se utilizó la ecuación 8 dando los siguientes valores:

$$(A) Y = \frac{X(1 + \theta_H k_d)}{(S_a - S_e)} = \frac{(1155)(1 + (3,75)(0,0357))}{(2958,56 - 255,79)} = 0,999 \frac{\text{mg SSV}}{\text{md DQO}}$$

$$(B) Y = \frac{X(1 + \theta_H k_d)}{(S_a - S_e)} = \frac{(1484)(1 + (5)(0,0839))}{(8068,15 - 378,6)} = 1,003 \frac{\text{mg SSV}}{\text{md DQO}}$$

La determinación de los índices volumétricos de los tratamientos se utilizó la ecuación 9:

$$(A) IVL = \frac{C_v}{C_s} \times 1000 = \frac{10,5 \text{ ml/L}}{311 \text{ mg/L}} * 1000 = 33,76 \text{ mg/L}$$

$$(B) IVL = \frac{C_v}{C_s} \times 1000 = \frac{24 \text{ ml/L}}{473 \text{ mg/L}} * 1000 = 50,74 \text{ mg/L}$$

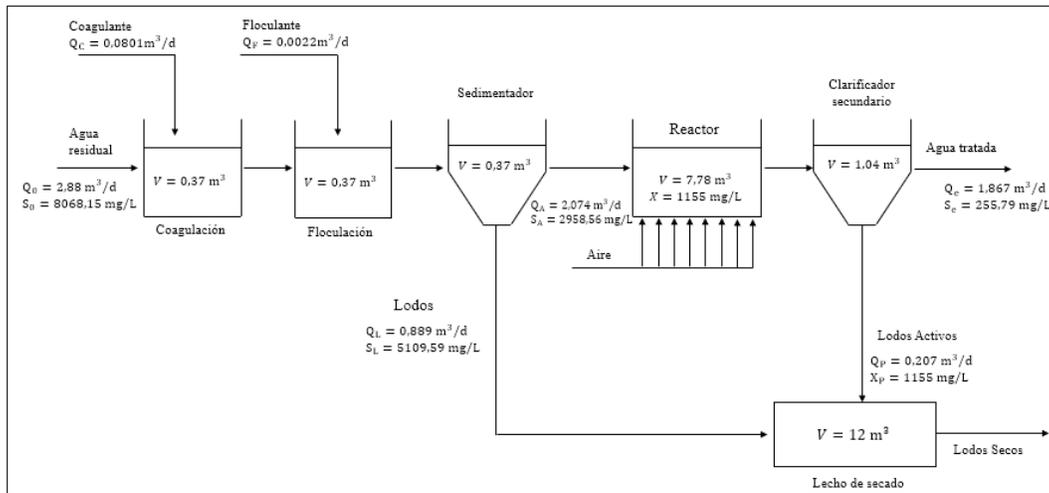


Fig. 5: Esquema de tratamiento A. Fuente propia

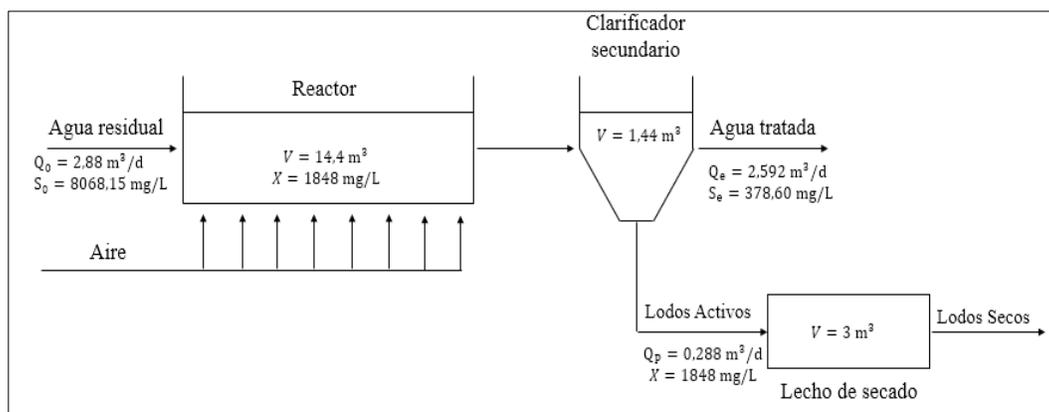


Fig. 6: Esquema de tratamiento B. Fuente propia.

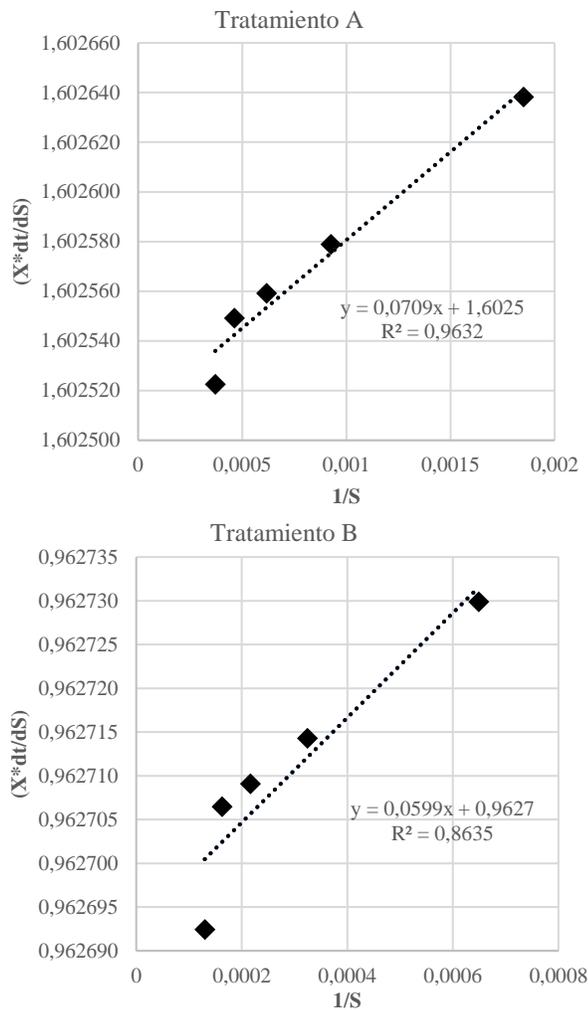


Fig. 7: Funciones lineales del modelo Michaelis-Menten de lodos activados para tratamiento en A y B.

Mientras que para la edad del lodo de los procesos biológicos se utilizó la ecuación 10:

$$(A) \text{ Edad del lodo} = \frac{C_s}{C_i} \times D = \frac{1500 \text{ mg/L}}{782,67 \text{ mg/L}} * 3,75 \text{ d} \\ = 7,187 \text{ días}$$

$$(B) \text{ Edad del lodo} = \frac{C_s}{C_i} \times D = \frac{2400 \text{ mg/L}}{1057 \text{ mg/L}} * 5 \text{ d} \\ = 11,353 \text{ días}$$

En la tabla 9 se muestran los parámetros de los coeficientes ci-

Tabla 9. Parámetros cinéticos.

Coefficientes cinéticos	Símbolo	Unidad	A	B
Índice de biodegradabilidad	IB	-	0,63	0,45
Tiempo de residencia hidráulica	Θ_H	d	3,75	5,00
Velocidad específica de consumo de sustrato	q_s	mg DQO/mg SSV.d	0,624	0,832
Tasa máxima de crecimiento	k	mg DQO/mg SSV.d	0,624	1,039
Constante de saturación del sustrato	K_s	mg DQO/L	0,044	0,062
Coefficiente de respiración endógena	k_d	d ⁻¹	0,357	0,839
Producción de biomasa por consumo de sustrato	Y	mg SSV/mg DQO	0,999	1,003
Índice volumétrico de lodos	IVL	mg/L	33,76	50,74
Edad de los lodos	-	d	7,187	11,353

néticos durante los dos tipos de tratamientos fueron obtenidos a partir de los modelos y ecuaciones propuestas.

Como se observó en A y B, los coeficientes cinéticos están en relación de una fuente de sustrato de materia orgánica como es el DQO y una biomasa en el reactor a partir de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) del agua residual del camal. De acuerdo con Carreño *et al.*⁵⁵, para diseñar los reactores de lodos activados deben establecerse parámetros cuantitativos medibles como los coeficientes cinéticos que reflejen efectivamente las características de las aguas residuales tratadas, las capacidades del reactor, los requerimientos y funcionamiento de las aguas residuales que se tratan.

Conforme a la relación entre el IVL y las características de sedimentación de los lodos activados propuesta por Grady *et al.*⁵⁶, para valores menores de 80 mg/L se clasifica como excelente, indicando una buena calidad y compactación de los lodos formados.

La influencia de la edad de los lodos en el tratamiento secundario radica en la eficiencia de los mismos. Rodríguez *et al.*²⁹, en su estudio evaluaron la variación de sustrato y biomasa respecto a diferentes edades de los lodos, con lodos de 10 días obtuvieron alta remoción de sustrato en comparación con el valor de remoción con lodos de 5 días, sin embargo, lodos de 15 días removieron una cantidad de sustrato cercana a la obtenida con lodos de 10 días, incluso destacó el aumento de biomasa. De acuerdo con Gil⁵⁷, lodos inferiores a 5 días crecen rápido, pero son constituidos por flóculos muy diminutos que decantan deficientemente, mientras que de mayor edad generan flóculos grandes con mayor sedimentabilidad, pero con menor crecimiento microbiano, elevada concentración de lodos con alta edad sin retirar provoca una condición de inanición, causante de la menor remoción de materia orgánica. La edad de lodos obtenida se encuentra en el rango adecuado, donde se busca mantener un equilibrio en el cual la cantidad de lodos diarios retirados sea proporcional al crecimiento bacteriano diario.

Viabilidad económica

La viabilidad económica del tratamiento A constó de gastos de de equipo, electricidad y capital de inversión, además de insumos químicos que se usaron en el proceso de coagulación-floculación, donde el costo del cloruro férrico fue de \$120,86/mes

Tabla 10. Capital total de inversión.

A. Costo directos	A	B
A.1. Equipo comprado	\$5.351,62	\$1.996,20
A.2 Instalación de equipo	\$2.515,26	\$938,21
A.3 Instrumentos y control (instalados)	\$963,29	\$359,32
A.4 Tuberías (instalados)	\$3.532,07	\$1.317,49
A.5 Eléctricos (instalados)	\$588,68	\$219,58
A.6 Edificios (incluye servicios)	\$963,29	\$359,32
A.7 Mejoras del terreno	\$535,16	\$199,62
A.8 Servicios auxiliares (instalados)	\$3.746,14	\$1.397,34
A.9 Terreno	\$321,10	\$119,77
Total directos (A)	\$18.516,62	\$6.906,85
B. Costo indirecto		
B.1 Ingeniería de supervisión	\$1.766,04	\$658,75
B.2 Gastos de construcción	\$2.194,17	\$818,44
B.3 Contratista	\$1.123,84	\$419,20
B.4 Contingentes	\$2.247,68	\$838,40
Total indirectos (B)	\$7.331,72	\$2.734,79
Capital fijo para la inversión (A+B)	\$25.848,34	\$9.641,64
C. Capital de trabajo	\$4.602,40	\$1.716,73
Inversión Total (A+B+C)	\$30.450,73	\$11.358,38

y del polímero catiónico es de \$4,09/mes. Mientras que, el tratamiento B constó únicamente de los gastos de equipo, fuentes de energía e inversión para su funcionamiento. Sin embargo, la biomasa activa necesaria en los reactores aerobios se realizó en función de los lodos climatizados formados a partir de la tratabilidad biológica a escala pre piloto de la misma agua residual del camal, lo que hizo viable y económico la formación de estos lodos activados.

La tabla 10 hace referencia al valor estimado de capital de inversión total de los tratamientos por medio del método de factores de Lang, modificados por Peters y Timmerhaus con un valor de \$30.450,73 para A y \$11,358,38 para B.

La cotización de equipos de la planta de tratamientos de aguas residuales para tratar un caudal de 2,88 m³/d que produce el matadero es de \$5.351,62 para A y \$1.996,20 para B que des-

cargara al sistema de alcantarillado público. Mientras que, Andrade *et al.* (2021)⁵⁸, estimó una planta de tratamiento de agua residuales de baja carga orgánica con un caudal de 1.479,6 m³/d para parroquias del cantón Riobamba con un valor de \$31.699,40 que descargara a un cuerpo de agua dulce teniendo en cuenta materiales de buena calidad para su construcción. La relación costo del equipo sobre caudal es de 21,42 en Riobamba mientras que en los métodos A y B para el matadero son 1858,20 y 693,13, respectivamente. Considerando la gran diferencia que existe entre ellas, hay que tener en cuenta que el de Riobamba está diseñado para trabajar en presencia de menores características fisicoquímicas alrededor de unas veinte veces inferior a diferencia de las altas concentraciones que se presentan en el camal.

La valoración que se obtuvo de la implementación de la planta del camal en Portoviejo es de seis a dieciséis veces menor a la estimación del autor propuesta con anterioridad, aunque la finalidad de descarga es distinta la estimación económica es viable al valorar un gasto sumamente inferior en el diseño de una planta de tratamiento de agua residual para este tipo con estas características fisicoquímicas del agua.

Se estima un precio promedio de los lodos activos como fertilizante o composta orgánica generados a partir de la planta de tratamiento residual con un valor de \$0,59 por cada kilogramo producido de biomasa (QuimiNet).

La tabla 11 muestra el flujo de caja representando los ingresos y egresos al cabo de cinco años, con un ingreso constante para A de \$32.072,40 y para B de \$18.351,36.

Como se detalla en la tabla 12, se tiene una tasa de interés del 15%, y con los cálculos obtenidos en el flujo de caja se obtuvo un valor actual neto de \$7.935,51 para A y \$1.604,94 para B; con una tasa interna de retorno de 25,55% y 20,82%, respectivamente, demostrando que se obtiene mejor viabilidad y rentabilidad económica para la implementación de una planta de tratamiento de agua residual en el camal de Portoviejo con la propuesta A.

Tabla 11. Flujo de caja.

		A				
Año	0	1	2	3	4	5
Ingresos	\$0,00	\$32.072,40	\$32.072,40	\$32.072,40	\$32.072,40	\$32.072,40
Egresos	\$30.450,73	\$20.621,19	\$20.621,19	\$20.621,19	\$20.621,19	\$20.621,19
Flujo de Caja	-\$30.450,73	\$11.451,21	\$11.451,21	\$11.451,21	\$11.451,21	\$11.451,21
		B				
Año	0	1	2	3	4	5
Ingresos	\$0,00	\$18.351,36	\$18.351,36	\$18.351,36	\$18.351,36	\$18.351,36
Egresos	\$11.358,38	\$14.484,20	\$14.484,20	\$14.484,20	\$14.484,20	\$14.484,20
Flujo de Caja	-\$11.358,38	\$3.867,16	\$3.867,16	\$3.867,16	\$3.867,16	\$3.867,16

Tabla 12. VAN y TIR.

	A	B
Tasa de interés	15%	15%
VAN	\$7.935,51	\$1.604,94
TIR	25,55%	20,82%

Conclusiones

El agua residual del camal de Portoviejo presenta una alta concentración y dispersión en su caracterización fisicoquímica, este comportamiento varía según a la cantidad de faenamiento diario que representan las altas variaciones de materia orgánica, inorgánica y metales.

Los tratamientos A y B aplicados al agua residual del camal obtuvieron buenos porcentajes en la eliminación de materia contaminante. El tratamiento A mostró mayor remoción de los parámetros fisicoquímicos a diferencia del B con un tiempo de retención hidráulica menor, sin embargo, en éste se utilizaron agentes químicos por el proceso de coagulación-floculación. La operación del tratamiento A tuvo una eficiencia de remoción de 96,83% de DQO, 95,07% de DBO₅ y 52,78% de TSS, mientras que el tratamiento B obtuvo una remoción de 95,31%, 94,68% y 29,17%, respectivamente.

Con base en los resultados después de los reactores aerobios se determina que es factible utilizar los lodos climatizados formados a partir de la tratabilidad biológica a escala pre piloto. Además, la viabilidad económica de la propuesta de la planta de tratamiento de agua residual del camal evidencia la rentabilidad que comprende, tanto el tratamiento A como B, no obstante, el tratamiento A es la opción con mejor beneficio teniendo como punto a favor mayor ingreso de capital obtenido a partir de la biomasa como fuente de composta orgánico.

La ejecución de ambos tratamientos con sus respectivas operaciones demuestra que los procesos propuestos con las condiciones establecidas cumplen los límites establecidos por las normativas de Ecuador: Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Libro VI Anexos 1; Nicaragua: Decreto Ejecutivo N°. 21-2017 y Venezuela: Normas oficiales para la calidad del agua en Venezuela, por lo que el agua tratada por estos sistemas puede ser descargada al sistema de alcantarillado público.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Técnica de Manabí por permitir el uso de los instrumentos y equipos de la institución, en especial a la Ing. Alexandra Córdova PhD por ser una tutora responsable y estar pendiente en el desarrollo del trabajo. Al Lcdo. Oswaldo García por su constante guía en los análisis realizados en el laboratorio y al Camal Municipal de Portoviejo que permitió el acceso a sus instalaciones para la realización de este estudio.

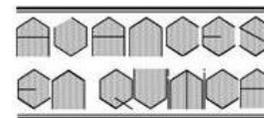
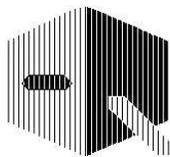
Referencias

1. ML Quispe Pérez, LC Piñas Rivera, JR Del Valle Gonzáles, F Aguirre Chávez. Aplicaciones Tecnológicas de tratamiento de aguas residuales. México: Nosótrica Ediciones (2020).
2. GR Pajares Echevarría, W Quiroz Marquina, GI Galarreta Oliveros, B Álvarez Lujan. Diseño del proceso de tratamiento de

- aguas residuales municipales para reducir la contaminación hídrica en el distrito de Samanco. **INGnosis**, **3(1)**, 84–100 (2017).
3. M Philipp, K Masmoudi Jabri, J Wellmann, H Akrouit, L Bous-selmi, S-U Geiße. Slaughterhouse Wastewater Treatment: A Review on Recycling and Reuse Possibilities. **Water**, **13(22)**, 3175 (2021).
 4. H Falla-Cabrera. Reciclaje de residuos y desechos De las industrias cárnicas y lácteas en América Latina. Procanor, Quito Ecuador, 155 p. (2006).
 5. D Muñoz Muñoz. Sistema de tratamiento de aguas residuales de matadero: para una población menor 2000 habitantes. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA**, **3(1)**, 87–98 (2005).
 6. G Da Ros. La contaminación de aguas en Ecuador: Una aproximación económica. Quito-Ecuador: ABYA-YALA (1995).
 7. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP). Bienestar Animal Faenamiento de Animales de Producción (2018).
 8. MA Musa, S Idrus. Physical and Biological Treatment Technologies of Slaughterhouse Wastewater: A Review. **Sustainability**, **13(9)**, 4656 (2021).
 9. M Baquerizo, M Acuña, M Solis-Castro. Contaminación de los ríos: caso río Guayas y sus afluentes. **Manglar**, **16(1)**, 63–70 (2019).
 10. D Borja, KS Llangarí, HB Moina. Cuantificación de efluentes de aguas residuales del Camal Frigorífico Riobamba. **Ciencia Digital**, **3(2)**, 783–794 (2019).
 11. Z Rinqest, M Basitere, SKO Ntwampe, M Njoya. Poultry slaughterhouse wastewater treatment using a static granular bed reactor coupled with single stage nitrification-denitrification and ultrafiltration systems. **Journal of Water Process Engineering**, **29**, 100778 (2019).
 12. F Orssatto, MHF Tavares, FM da Silva, E Eyng, L Fleck. Optimization of nitrogen and phosphorus removal from pig slaughterhouse and packing plant wastewater through electro-coagulation in a batch reactor. **Revista Ambiente & Água**, **13** (2018).
 13. AE Abdouni, S Bouhout, I Merimi, B Hammouti, K Haboubi. Physicochemical characterization of wastewater from the Al-Hoceima slaughterhouse in Morocco. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, **19(3)**, 423–429 (2021).
 14. F Renault, B Sancey, J Charles, et al. Chitosan flocculation of cardboard-mill secondary biological wastewater. **Chemical Engineering Journal**, **155(3)**, 775–783 (2009).
 15. Y Lorenzo-Acosta. Estado del arte de tratamiento de aguas por coagulación-floculación. **ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar**, **XL(2)**, 10–17 (2006).
 16. G Moeller, AC Tomasini Ortiz. Microbiología de lodos activados: Memorias curso internacional de sistemas integrados de

- tratamiento de aguas residuales y su reúso para un medio ambiente sustentable. Bogotá (2004).
17. JP da Silva, MA Brand, PRC Soares, M de L Salamon, TM Rodrigues, G Güttler. Compaction as a sustainable alternative to dried sludge from poultry slaughterhouse wastewater for energy generation. **Ciencia Rural**, **51**, e20200320 (2021).
 18. Metcalf. Ingeniería Sanitaria: Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. España: Labor S.A. (1985).
 19. A Noyola Robles, E Vega González, J Ramos Hernández, C Calderón Mólgora. Alternativas de tratamientos de aguas residuales. 3rd ed. México: IMTA (2000).
 20. F Osorio Robles, JC Torres Rojo, M Sánchez Bas. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes: Aplicación de procesos industriales a la reutilización de aguas residuales. Madrid: Ediciones Díaz de Santos (2010).
 21. C Ramos Galarza. Diseño de Investigación experimental. **CienciAmérica**, **10(1)**, 1–7 (2021).
 22. INEN. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2176:2013. Agua. Calidad del Agua. Muestreo de técnicas de Muestreo. Primera Edición (2013).
 23. HACH COMPANY. Manual de Análisis de Agua. Segunda edición en español (2000).
 24. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Baird R, Bridgewater L. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Washington D.C: American Public Health Association (2017).
 25. F Abouelenien, YA Trabik, M Shukry, et al. A Pilot Model for the Treatment of Slaughterhouse Wastewater Using Zeolite or Psidium-Leaf Powder as a Natural Coagulant, Followed by Filtration with Rice Straw, in Comparison with an Inorganic Coagulant. **Processes**, **10(5)**, 887 (2022).
 26. Y Azabache, E Murrieta, P García Mora, M Ayala, G Caceres, M Garcia. Tratamiento del agua residual de un matadero: Eficiencia del proceso de coagulación - floculación. **Agroindustrial Science**, **10(1)**, 23–27 (2020).
 27. M Caravali, ML Lote, LC Echeverry. Evaluación de los Parámetros Físicoquímicos en un Reactor Discontinuo de Lodos Activados para el Tratamiento de Aguas con Metanol. **Ingeniería**, **22(1)**, 98–110 (2017).
 28. FN Kemmer, J McCallion. Manual del Agua. Su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Mexico: McGraw-Hill/Interamericana de Mexico, S. A. de C. V. (1989).
 29. T Rodríguez Chaparro, EA Pérez Navarrete, E Vivas Mora. Determinación de las constantes cinéticas y estequiométricas en un biorreactor de lodos activados convencional a escala (laboratorio para las aguas residuales de un frigorífico). **Revista Ciencia e Ingeniería Neogranadina**, **13(1)**, 9–16 (2003).
 30. Metcalf. Wastewater engineering treatment and resource recovery. McGraw-Hill (2013).
 31. W Schmidell Netto, HM Soares, C Etchebehere, R Javier Menes, NC Bertola, E Martín Contreras. Tratamiento Biológico de aguas Residuárias. 1st ed. Florianópolis: Tribo da Ilba (2007).
 32. RS Ramalho. Tratamiento de aguas residuales. Barcelona: REVERTÉ, S. A. (2021).
 33. A Orozco Jaramillo. Bioingeniería de aguas residuales: Teoría y diseño. 2nd ed. Bogotá, Colombia: Acodal (2014).
 34. C Medina-Valderrama, W Uriarte-Tirado, E Cardenas-Vásquez, S Orrego-Zapo. Tratamiento de aguas residuales de camales mediante tecnologías avanzadas de oxidación: proceso fenton. **Revista INGENIERÍA UC**, **27(2)**, 165–174 (2020).
 35. G Quille Calizaya, T Donaires Flores. Tratamiento de efluentes líquidos y sólidos de camal municipal Ilave. **Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research**, **15(1)**, 65-72 (2013).
 36. AM Perojo-Bellido de Luna, Y Aguilera-Corrales, A Villar-Aneiros, Y de la C Avilés-Aguilera. Caracterización de las aguas residuales generadas en la producción de conjugados monovalentes en el Instituto Finlay de Vacunas. **Vaccinomonitor**, **31(2)**, 60–67 (2022).
 37. RS Fonfría, Ribas JP. Ingeniería ambiental: contaminación y tratamientos. Barcelona, España: MARCOMBO, S. A. (1989).
 38. MR Lapeña. Tratamiento de aguas industriales: Aguas de proceso y residuales. Barcelona, España: MARCOMBO, S. A. (1990).
 39. JA Garnero. Evaluación del cloruro de hierro (III) como coagulante en el tratamiento de efluentes de la industria frigorífica. A. Congreso Internacional de la mejora continua y la innovación en las organizaciones (2005).
 40. I Ruiz, MC Veiga, P de Santiago, R Blázquez. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. **Bioresource Technology**, **60(3)**, 251–258 (1997).
 41. SL Pabón, JH Suárez Gélvez. Arranque y operación a escala real de un sistema de tratamiento de lodos activos para aguas residuales de matadero. **Ingeniería e Investigación**, **929(2)**, 53–58 (2009).
 42. SB Monge, AMT Silva, C Bengoa. Manual técnico sobre procesos de oxidación avanzada aplicados al tratamiento de aguas residuales industriales. España: PROGRAMA CYTED (2018).
 43. DH Ahn, WS Chang, TI Yoon. Dye stuff wastewater treatment using chemical oxidation, physical adsorption and fixed bed biofilm process. **Process Biochemistry**, **34(5)**, 429–439 (1999).
 44. MG Zerbato, E Carrera, MS Eliggi, et al. Cloruro Férrico para la coagulación optimizada y remoción de enteroparásitos en agua. **AUGM DOMUS**, **1**, 18–26 (2009).
 45. R de PV de Castro, VM de Mello, VMF Alexandre, MC Cammarota. Physico-chemical and enzymatic pre-treatment for wastewater from slaughterhouse. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, **24(5)**, 975–981 (2019).
 46. N Boughou, I Majdy, E Cherkaoui, M Khamar, A Nounah. Effect of pH and time on the treatment by coagulation from

- slaughterhouse of the city of Rabat. *MATEC Web of Conferences*, 149, p. 02091 (2018).
47. K Sombatsompop, A Songpim, S Reabroid, P Inkong-ngam. A comparative study of sequencing batch reactor and movingbed sequencing batch reactor for piggery wastewater treatment. *Maejo International Journal of Science and Technology*, **5(02)**, 191–203 (2011).
48. B Oktafani, L Siami, R Hadisoebroto, T Tazkiaturrizki, R Ratnaningsih. The effect of aeration time on chicken slaughterhouse water treatment using GAS-SBR. *Journal of Physics: Conference Series*, **1402(3)**, 033011 (2019).
49. Y Rahimi, A Torabian, N Mehrdadi, B Shahmoradi. Simultaneous nitrification–denitrification and phosphorus removal in a fixed bed sequencing batch reactor (FBSBR). *Journal of Hazardous Materials*, **185(2)**, 852–857 (2011).
50. SJ Carrasquero Ferrer, DC Marquina Gelvez, JG Soto López, S Vilorio Rincón, MC Pire Sierra, AR Díaz Montiel. Remoción de nutrientes en aguas residuales de un matadero de reses usando un reactor biológico secuencial. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, **25(2)**, 43–60 (2015).
51. E Ronzano, JL Dapena. Tratamiento biológico de las aguas residuales. Ediciones Díaz de Santos (2015).
52. S Carrasquero, E Matos, F Saras, M Pire, G Colina, A Díaz. Evaluación de la eficiencia de un reactor por carga secuencial tratando aguas residuales provenientes de un matadero de reses. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, **29(3)**, 7–16 (2014).
53. DF Calderón Huamaní, PP Huaranca Contreras, JJ Díaz Rodríguez. Tratamiento Aguas Residuales Mediante Tecnología de Microorganismos Eficientes – Substanzjalla, Ica - Perú. *ÑAWPARISUN - Revista de Investigación Científica*, **1(3)**, 13–18 (2019).
54. K Rodríguez-Jorge, R Aguila-Michelena, J de la C Bello-Céspedes, L Ortega-Viera, G Michelena-Álvarez. Tratamiento biológico con microorganismos eficientes, para reducir la carga contaminante en aguas residuales de la industria azucarera y los derivados. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, **57(2)**, 83–96 (2023).
55. UF Carreño Sayago, JJ Perez, D Cote Montañez, AL Agatón. Modelación de un sistema de lodos activados en el sector de las curtiembres de San Benito Bogotá. *Producción + Limpia*, **11(2)**, 9–21 (2016).
56. L Grady, G Daigger, H Lim. *Biological Wastewater Treatment*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., (1999).
57. M Gil Rodríguez. Modelo dinámico del proceso secundario de depuración de aguas residuales urbanas. *Revista Internacional de Métodos Numéricos para Cálculo y Diseño en Ingeniería*, **14(4)**, 525–538 (1998).
58. ML Andrade Avalos, DF Borja Mayorga, MJ García Veloz. Diseño y cotización de una planta de tratamiento de aguas residuales para parroquias rurales del Cantón Riobamba - Provincia de Chimborazo-Ecuador. *Conciencia Digital*, **4(2)**, 198–214 (2021).



Desarrollo y validación de un método de HPLC para la separación y cuantificación de ácido gálico en extracto de frutos de *Cotoneaster pannosus* provenientes de Bogotá-Colombia

Emerson Eliecer León Ávila*, Laura Stephania Ballén Díaz, Oscar Alfonso Vargas Bautista

Facultad de Ciencias, Programa de Química Farmacéutica, Universidad El Bosque.
Grupo de Investigación en Química Aplicada (INQA) Bogotá, Colombia.

(*) leonemerson@unbosque.edu.co

Recibido: 06/02/2024

Revisado: 15/03/2024

Aceptado: 29/04/2024

Resumen

La planta Holly (*Cotoneaster pannosus*) originaria de China y presente actualmente en Bogotá-Colombia poseen en su fruto variedad de metabolitos secundarios, entre ellos se puede encontrar el ácido gálico, sustancia que según estudios posee propiedades hepatoprotectoras. Por ello, en el presente trabajo se propone el desarrollo de un método de separación y cuantificación validado para ácido gálico que puede estar presente en un extracto hidroalcohólico obtenido del tratamiento de los frutos de *Cotoneaster pannosus* por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV, con el objetivo de establecer las mejores condiciones de separación que permitan resultados precisos y robustos.

Palabras claves: ácido gálico; *Cotoneaster pannosus*; cromatografía líquida de alta eficiencia; estandarización; validación

Abstract

Development of a validated high-efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the separation and quantification of gallic acid in an extract of *Cotoneaster pannosus* fruits from Bogotá-Colombia. The Holly plant (*Cotoneaster pannosus*) native to China and currently present in Bogota, Colombia, has a variety of secondary metabolites in its fruit, including gallic acid, a substance that according to studies has hepatoprotective properties. That is why in the present work the standardization and validation of a method of separation and quantification of gallic acid that may be present in a hydroalcoholic extract obtained from the treatment of the fruits of *Cotoneaster pannosus* by means of high-efficiency liquid chromatography with UV detection is carried out, with the aim of establishing the best separation conditions that allow precise and robust results.

Keywords: Gallic acid; *Cotoneaster pannosus*; High Performance Liquid Chromatography; Standardization; Validation

Introducción

El uso indiscriminado de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y antibióticos ha generado una de las reacciones adversas a medicamentos (RAM) más frecuentes, como lo es la hepatotoxicidad. Uno de los retos en el área de la salud es prevenir este tipo de RAM debido a que su diagnóstico es difícil por la falta de marcadores fiables para su uso en la práctica clínica¹, y el tratamiento para este tipo de afecciones está basado en la suspensión de consumo de los medicamentos o en el peor de los casos el trasplante hepático².

Una de las alternativas promisorias para la prevención de estas reacciones es el uso de plantas con variedad de compuestos bioactivos, que permitan reducir el riesgo de sufrir estas afecciones, entre estas se encuentran los frutos de *Cotoneaster pannosus* conocido también como Holly liso, el cual posee diversos metabolitos secundarios entre los que se destaca el ácido gálico (AG), al que se le atribuye una actividad antioxidante que le permite actuar como agente preventivo por sus propiedades hepatoprotectoras³.

Según literatura existen diferentes fuentes de ácido gálico, sin

embargo, *Cotoneaster pannosus* es una alternativa asequible, debido a la facilidad de cultivo y su amplia proliferación; adicional a ello, en la actualidad se encuentra incluida en el catálogo de plantas invasoras de los humedales de Bogotá-Colombia⁴, promoviendo la recolecta de sus frutos sin un impacto ambiental significativo, debido a que no es una planta endémica de Colombia y su uso se limita exclusivamente a propósitos ornamentales. En este contexto, *Cotoneaster pannosus* es una opción viable para la extracción de ácido gálico.

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica analítica usada para separar determinados compuestos en diferentes matrices, fundamentada en la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas del analito⁵. Del mismo modo, dicha técnica usa alta presión para dirigir la fase móvil (líquida) a través de columnas cerradas, las cuales contienen la fase estacionaria (generalmente sílice o sílice modificado) que da lugar a la separación de diferentes compuestos⁵. Adicionalmente, presenta ventajas tales como, reproducibilidad entre ensayos, sensibilidad para trazas e impurezas y capacidad de separación de compuestos no volátiles o semi volátiles y costos considerablemente bajos⁶.

Con base en lo anterior y la previa revisión bibliográfica, se propone obtener un extracto hidroalcohólico proveniente de los frutos de la planta Holly liso como posible fuente de ácido gálico para futuros usos medicinales, soportado mediante el desarrollo y validación de un método de separación y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) bajo los parámetros de precisión, linealidad, exactitud, robustez, reproducibilidad y estableciendo límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD).

Materiales y métodos

Obtención del extracto de los frutos de Holly liso

La recolección de los frutos se realizó en el mes de junio del año 2022 en la ciudad de Bogotá-Colombia, específicamente en la localidad de Usaquén, en el parque Lisboa con coordenadas 4°42'53"N 74°01'58"W. Se realizó la recolección de 0,4539 kg de frutos por medio de la metodología de recolección de muestras en cuadrante, en la cual se establece o se enmarca una determinada zona para realizar el muestreo⁷.

Para la elección de la metodología de extracción se realizaron 3 ensayos: extracción con ácido fórmico, extracción por calentamiento y extracción asistida por baño ultrasónico; estos ensayos se realizaron teniendo en cuenta una previa revisión bibliográfica⁸⁻¹¹. Las inyecciones iniciales permitieron observar la posible presencia del analito y determinar que el método de extracción más eficiente fue la asistida por baño ultrasónico.

Para la extracción se realizó un tratamiento previo, el cual consistió en macerar los frutos de *Cotoneaster pannosus* con 0,02 L de una solución etanol (75%): agua en proporción 40:60 respectivamente. Posterior a esto, se llevó a baño ultrasónico durante 50 min a una temperatura de 323,15 K. Se dejó en reposo durante 24 h protegido de la luz y se filtró al vacío para eliminar compuestos no disueltos. Finalmente, el extracto hidroalcohólico se dispuso en filtros para jeringa de 0,45 μm para eliminar impurezas.

Separación del ácido gálico (AG) de la matriz

La separación del AG se realizó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, estableciendo como condiciones iniciales las basadas en la revisión bibliográfica¹². A partir de estas condiciones, se realizó la optimización del método mediante múltiples ensayos, asegurando las variaciones de las condiciones cromatográficas, donde se procedió a identificar el posible pico del analito de interés frente al pico de un patrón de AG, realizando la comparación en cuanto al tiempo de retención de los mismos.

Cuantificación del ácido gálico (AG)

Para poder trabajar con un patrón de referencia que permita soportar el estudio, se adquirió con Sigma Aldrich lote SLCL2739; N° CAS: 149-91-7 el estándar de ácido gálico (CAS 149-91-7) marca TRC Canadá, con una pureza de $\geq 97,50\%$.

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración, como se muestra en la figura 2, por medio de HPLC UV-VIS utilizando el método de adición estándar. Se prepararon viales de capacidad 1,5 mL con la adición inicial de 400 μL extracto y una cantidad creciente patrón de AG, obteniendo 11 puntos con concentración conocida, donde el primer punto de la curva (punto cero o punto sin adición de patrón) corresponde al extracto puro obtenido.

Validación del método de separación

Para garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de un método analítico se lleva a cabo el proceso de validación. El cual, según la FDA, es el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las condiciones de funcionamiento del procedimiento cumplen los requisitos de las aplicaciones analíticas previstas¹³. Debido a esto, para el presente trabajo se evalúan los siguientes parámetros de validación:

Linealidad. Para la determinación de la linealidad se realizó una curva de calibración por el método de adición estándar. Se prepararon viales de capacidad 1,5 mL con la adición de un volumen de 400 μL extracto y una cantidad creciente de patrón de AG, para elaborar la curva de calibración y obtener la ecuación de la recta mediante regresión lineal y a su vez el coeficiente de determinación¹⁴.

Exactitud. Se determinó por medio del porcentaje de recuperación inyectando una muestra de 5,66 ppm de estándar de AG. Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación entre el dato teórico y el resultado obtenido mediante la regresión lineal¹⁵.

Precisión. Se trabajó con un patrón de 270 ppm, el cual se corrió 5 veces en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, obteniendo 5 tiempos y 5 áreas. Finalmente se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Robustez. Para la determinación de la robustez se realizó la corrida cromatográfica de un patrón de concentración conocida a condiciones diferentes de pH. En el primer ensayo se corrió por triplicado el patrón con una fase móvil de agua: acetonitrilo, con el gradiente de concentración estipulado. Del mismo modo, el segundo ensayo se corrió por triplicado con agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% v/v. Para la evaluación de este parámetro se compararon los promedios de los tiempos de retención y las áreas bajo la curva obtenidas en cada ensayo¹³.

Límite de detección y cuantificación. Se realizó una curva de calibración con patrones de AG a una concentración bajas comprendida entre 1,0 a 7,0 ppm. Posteriormente, se realizó un análisis de datos de la regresión, donde se calcula el error típico de la curva de calibración de todo el conjunto de datos, y la pendiente de la curva de calibración¹⁶.

Resultados y discusión

Separación y cuantificación de AG presente en frutos de Cotoneaster pannosus por HPLC

Para definir las condiciones de separación y cuantificación del

AG, se tuvieron en cuenta sus propiedades fisicoquímicas tales como: solubilidad en agua (0,01 kg/ L), valor de Log P (0,70) y sus grupos funcionales con el fin de determinar la afinidad por las diferentes fases. Según bibliografía¹⁷, la columna más usada para la separación del AG mediante cromatografía líquida de alta eficiencia corresponde a la C18 debido a su baja polaridad.

Del mismo modo, teniendo presente que el AG es un ácido débil, se define que el tipo de cromatografía en fase reversa a usar corresponde a la supresión iónica. Para el desarrollo de este tipo de cromatografía, se debe tener presente que el pKa del AG es igual a 4,4; en donde dicho valor corresponderá al punto de equilibrio entre la especie ionizada y la no ionizada. De tal modo, la fase móvil debe manejar un valor de pH menor a 4,4 para obtener una mayor cantidad de especie no ionizada, mejorando la retención del analito y su cuantificación; en la literatura se evidencia el uso de ácido fórmico para desplazar el equilibrio hacia la especie no ionizada¹². Se debe tener una adecuada concentración del ácido usado o un valor de pH óptimo, para no permitir un aumento en el ancho del pico. En otras palabras, las moléculas no ionizadas, se difunden más lento que las moléculas ionizadas, generando falta de equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta falta de equilibrio promueve que las moléculas ionizadas pasen por el detector en un tiempo menor que el de las molecular sin ionizar. De manera que, las moléculas con mayor retención harán que el ancho de base se extienda hasta que todas las moléculas retenidas salgan¹⁸.

Finalmente, se optimizó las demás condiciones cromatográficas de forma experimental, secuencial y lógica; luego de múltiples ensayos donde se modificó el flujo, concentraciones de la composición de la fase móvil y tipos de columnas, se encontró que las mejores condiciones frente a selectividad, resolución, platos teóricos y precisión corresponden a las mencionadas en la tabla 1. En la figura 1 se evidencia al pico de AG con un tiempo de retención (T_R) de 11,54 min, dicho pico es el producto de una adición estándar. De modo que, se realiza una comparación entre el área bajo la curva del patrón y el área del extracto resultante con una adición de patrón de AG en el posible tiempo de retención específico. La resta corresponde a un valor positivo, confirmando la presencia de AG en los frutos de Holly liso recolectado en Bogotá-Colombia. Como resultado se

Tabla 1. Condiciones de separación para el AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*.

Condición	Valor o característica
Columna cromatográfica	Phenomenex Gemini 5 μ m C18, 110 Å, (150 mm x 4,6 mm)
Composición de fase móvil	Agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% v/v y acetonitrilo grado HPLC.
Velocidad de flujo	0,550 mL/min
Tipo de flujo	Gradiente tipo escalonado o step
Temperatura	303,15 K
Volumen de inyección	20,00 μ L
Longitud de onda	272 nm

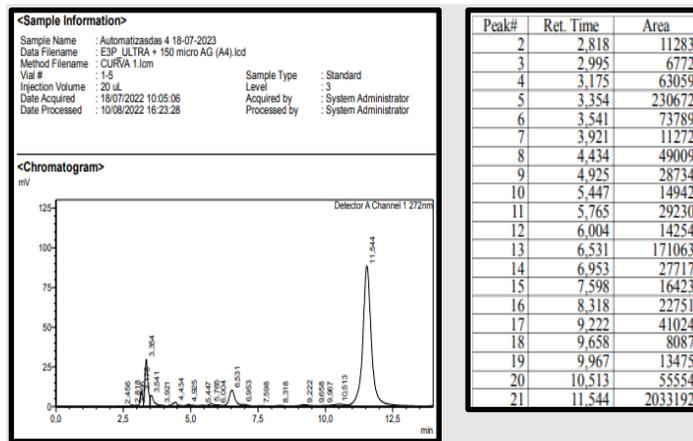


Fig. 1: Cromatograma obtenido del extracto de frutos de *Cotoneaster pannosus* más 150 μ L de estándar de AG con las condiciones finales de separación.

determinó que la concentración de AG es de 1,54 ppm en 0,4569 kg de frutos de Holly liso tratados.

Validación del método

Con el objetivo de que el método proporcione resultados reproducibles y confiables, se realiza la validación del método de separación y cuantificación teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Linealidad. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración, como se muestra en la figura 2, por medio de HPLC UV-VIS utilizando el método de adición estándar. Se prepararon viales de capacidad 1,5 mL con 400 μ L de extracto hidroalcohólico resultante y cantidad creciente de AG, obteniendo 11 puntos con concentración conocida del patrón de ácido gálico (AG) de 0 ppm; 5,66 ppm; 11,30 ppm; 17,00 ppm; 22,60 ppm; 28,30 ppm; 34,00 ppm; 39,60 ppm; 45,30 ppm; 51,00 ppm y 56,60 ppm. Finalmente, se realizó la corrida cromatográfica por triplicado para obtener los resultados de área y elaborar la curva de calibración y la ecuación de la recta mediante la regresión lineal.

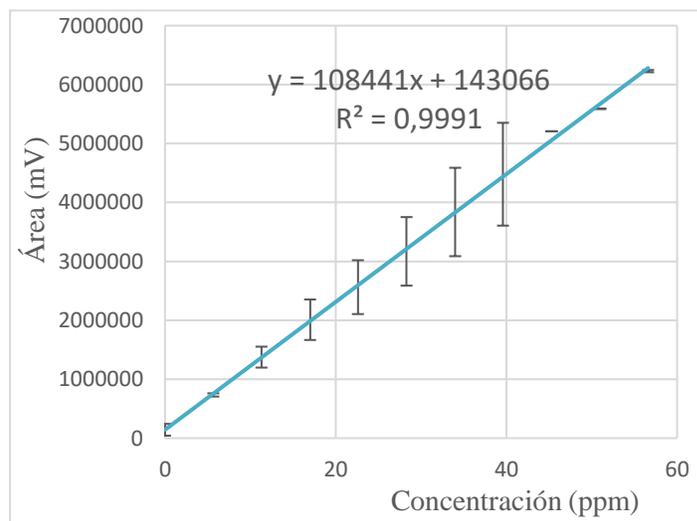


Fig. 2. Curva de calibración con adición de patrón de ácido gálico.

Una vez obtenida la curva de calibración del promedio del triplicado del ensayo de linealidad, tal y como indica la ICH Q2¹⁴, se llevó a cabo un análisis del gráfico con el fin de determinar los puntos que presentaban una mayor desviación de la línea de tendencia para hacer su respectivo descarte, sin embargo, no se evidenciaron puntos con desviación significativa, por tanto, se evaluó este parámetro con todos los puntos.

Según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA (1994), para que un método se considere lineal, su R² debe ser mayor o igual a 0,999¹³; como se observa en la figura 1, el R² obtenido para el método fue de 0,9991; dato que cumple con el requisito, razón por la cual se considera un método lineal en el rango de trabajado.

Límite de detección y cuantificación (LDD-LDC). Para la determinación del LDD y del LDC se tuvo en cuenta el enfoque basado en la desviación estándar (σ) de la respuesta y la pendiente. En primer lugar, la estimación de la pendiente (m) se puede realizar mediante la construcción de una curva de calibración (figura 3). Por otro lado, la desviación estándar (σ) se puede estimar mediante el análisis de un blanco, el cual de acuerdo con el método utilizado corresponde al extracto etanólico obtenido, mediante la desviación estándar residual de la regresión lineal¹⁶. El programa Microsoft Excel puede realizar un análisis de datos, específicamente una estadística de la regresión, donde se calcula datos claves relacionados con la regresión lineal, entre ellos se destaca el error típico. El error típico arrojado fue de 13546,5; el cual corresponde a la desviación estándar (σ) sobre la curva de calibración o regresión lineal de todo el conjunto de datos. Con tal valor, y el valor de la pendiente (figura 3), se determina el LDD y LDC de la siguiente manera¹⁶:

$$\text{LDD} = \frac{3,3 * \text{Error típico}}{m} = \frac{3,3 * 13546,4561}{91789} = 0,4870 \text{ ppm}$$

$$\text{LDC} = \frac{10 * \text{Error típico}}{m} = \frac{10 * 13546,4561}{91789} = 1,48 \text{ ppm}$$

Según indican los cálculos de LDD y LDC, se determina que el presente método no puede garantizar resultados reproducibles

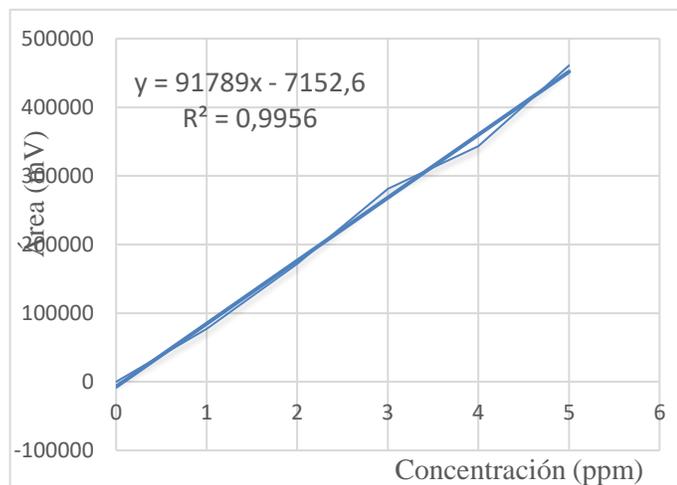


Fig. 3: Curva de calibración para la determinación del límite de cuantificación y el límite de detección.

a concentraciones menores a 1,48 ppm. Por otra parte, este método puede arrojar valores poco diferenciables con la señal de ruido del equipo por debajo de concentraciones de 0,487 ppm, que se considera como el límite de detección.

Para la determinación de LDD y LDC mediante detectores UV-VIS, se considera difícil asegurar la detección de compuestos a bajas concentraciones debido a pérdidas graduales del compuesto, pérdidas en la sensibilidad de la lámpara UV-VIS y aumento en el ruido por parte de este¹³. Asimismo, una fluctuación en la línea base, se puede dar por el uso de una columna que ya no sea apta o la variación de las proporciones de la fase móvil, las cuales afectarán la detección y cuantificación del analito¹⁹.

Precisión. Para la evaluación de la precisión del método, se determinó la dispersión de los datos obtenidos al realizar 5 réplicas del mismo analito, este parámetro se expresó estadísticamente a través de la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación, como se muestra en la tabla 2. El valor de aceptación para este parámetro según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA¹³ debe ser menor a 1. De este modo, se puede observar que si bien, los valores del tiempo de retención tienen un coeficiente de variación que garantiza la precisión del método (0,46%), se puede decir que el método es preciso en términos del tiempo de retención.

Tabla 2. Resultados de precisión para el patrón de ácido gálico.

Ensayo	Tiempo de retención (minutos)
1	11,52
2	11,49
3	11,53
4	11,62
5	11,59
Promedio	11,55
s	0,05412
CV %	0,4684

<Sample Information>

Sample Name : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión 1.2)
 Data Filename : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión 1.2).lcl
 Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm
 Vial # : 1-26 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 20 uL
 Date Acquired : 15/07/2022 9:54:55 Acquired by : System Administrator
 Date Processed : 15/07/2022 10:19:56 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

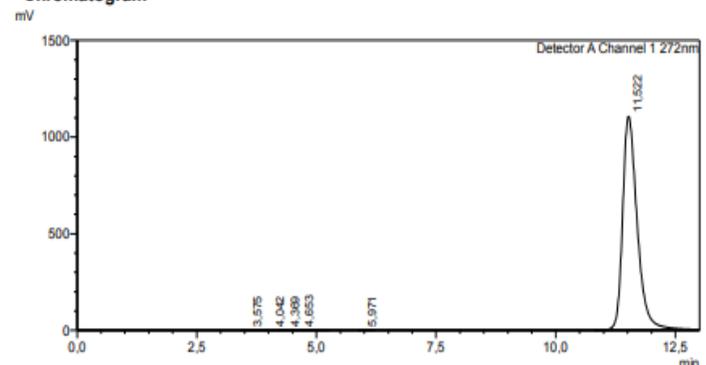


Fig. 4. Cromatograma de precisión para el patrón de ácido gálico.

Reproducibilidad. Por medio de este parámetro se evaluaron las variaciones en la respuesta del método como consecuencia al cambio de experimentador. Durante la evaluación de la repetibilidad cada uno de los experimentadores realizó 10 corridas correspondientes a una curva de calibración, de ello se comparó estadísticamente la variabilidad de la respuesta del método por medio del coeficiente de variación, de allí se obtuvo resultados menores a la unidad, con una diferencia de 0,012 entre cada uno de los ensayos. Así mismo, se evidencia que el experimentador B posee tres datos alejados al promedio: 11,60 min; 11,61 min y 11,62 min. De modo que, se realizó una prueba Q para el dato 11,60 min y saber si es necesario realizar el descarte de dichos datos. A continuación, se evidencia la prueba Q realizada¹⁶.

$$Q_{Exp} = \frac{|\text{resultado dudoso} - \text{Resultado más próximo}|}{\text{Resultado más alto} - \text{Resultado más bajo}}$$

$$Q_{Exp} = \frac{|11,60 - 11,58|}{11,62 - 11,52} = 0,2 \quad Q_{Crit} \text{ (de 10 datos al 95\% de confianza)} \\ = 0,466$$

Se obtiene que $Q_{Exp} < Q_{Crit}$, por lo que no se realiza ningún descarte en los datos. Teniendo en cuenta lo anterior, y que la diferencia entre el CV de cada ensayo es de 0,012; se puede interpretar que es un método reproducible.

Exactitud. El porcentaje de recuperación se evaluó a partir de la curva realizada para la determinación de los límites de cuantificación y detección (figura 3), con el fin de realizar la cuantificación por medio de estándar externo. Se realizó la inyección de un patrón de 5,66 ppm y por medio de la ecuación de la recta presentada a continuación²⁰, se realizó el despeje con el área obtenida del patrón para comparar el valor teórico con el experimental, obteniendo un porcentaje de recuperación del 103,2%.

$$Y = 91789 X - 7152,6 = 529032 \text{ mV}$$

$$X = \frac{529032 + 7152,6}{91789} = 5,84 \text{ ppm}$$

$$\frac{5,84}{5,66} * 100 = 103,2\%$$

Este valor puede estar influenciado por errores sistemáticos y por contaminación o impurezas, razones por las que pudo provocarse el aumento del valor estimado. No obstante, se obtuvo un valor de porcentaje de recuperación aceptado²¹, por lo tanto, se considera que este método es exacto.

Robustez. En la determinación de la robustez, se determinó que el pH era una de las especificaciones idóneas para el sistema, donde se decidió realizar inyecciones con agua sin ácido fórmico para evaluar la robustez del método. Al realizar la inyección sin el ácido fórmico se evidenció un aumento en el tiempo de retención a 19 minutos. Los drásticos cambios en la separación eran de esperarse, ya que el pH ejerce una gran influencia en la retención del AG, sin embargo, la forma en que cambiaron los resultados no eran los esperados, ya que, al no tener un pH ácido en la fase móvil, se tendrá al AG ionizado, el cual será más a fin a la fase estacionaria, generando una disminución en el tiempo de retención. Para la explicación de este resultado, se estudian el comportamiento del AG a distintos rangos de pH, realizando un análisis según el pKa en donde se ve afectada la geometría de la molécula, las propiedades eléctricas y el estado de ionización²². De allí, se concluye que el AG se puede presentar de 3 formas distintas según la variación del pH. En la figura 5 se evidencia que el AG puede formar enlaces de hidrógeno de forma intramolecular. Lo anterior se explica debido a una segunda ionización en el hidroxilo de la posición “para” respecto al ácido carboxílico, además de la redistribución de cargas negativas que se sitúan predominantemente en las moléculas de oxígeno, esto a su vez, provoca una disminución en la distancia entre los OH aumentando la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares para su estabilización (figura 5). De modo que, el AG no podrá hacer los puentes de hidrógeno con la fase móvil, obteniendo un predominio en las interacciones con el grupo aromático y la fase apolar, aumentando el tiempo de retención.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede observar que el valor de pH es crítico para la separación del AG en cromatografía líquida de alta eficiencia. Además, para considerar un posible rango de pH, o un rango en que el método es robusto, se debe tener en cuenta el pKa del AG, el cual tiene un valor de 4,4. Según lo anterior, y teniendo en cuenta que se pretende dirigir el equilibrio hacia el compuesto no ionizado, se podría inferir que el rango de pH a utilizar es entre 1,0 y 4,0.

Cuantificación del AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*

Para realizar la cuantificación de AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal obtenido a través del método de adición estándar de modo que, la adición de patrón a la muestra problema genera un incremento

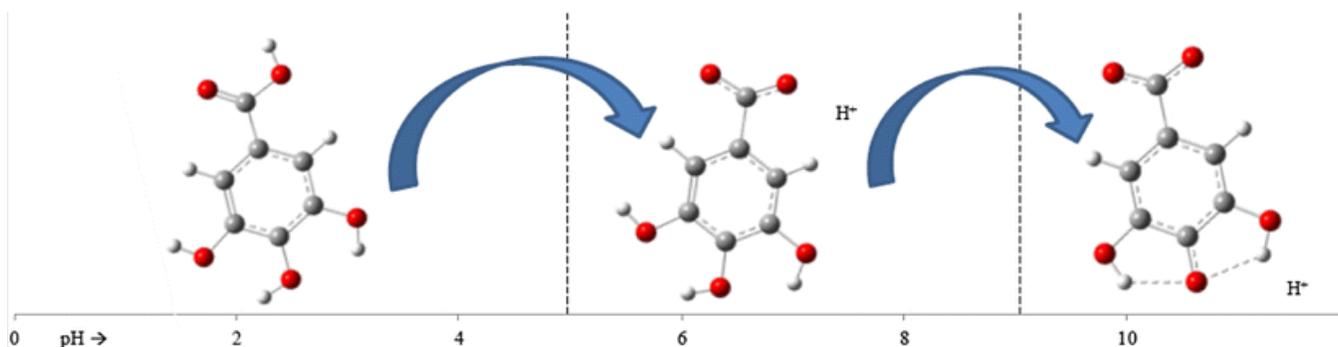


Fig. 5: Ionización del AG al aumentar el pH (Badhani y Kakkar, 2017).

en la posible señal del analito de interés (AG) superando la señal causada por los interferentes y permitiendo la identificación del posible pico de interés²³.

Tomando como base la curva de calibración obtenida en el análisis de linealidad del método, se toma la ecuación de la recta obtenida y se extrapola al valor de concentración obtenido en los frutos de Holly liso de Bogotá Colombia. Teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvo una concentración de 1,536 ppm de AG en 0,4539 kg de frutos de *Cotoneaster pannosus*. Según bibliografía, se ha reportado la separación y cuantificación de AG en diferentes especies vegetales, donde se destacan aquellas obtenidas mediante HPLC, reportando concentraciones de 14,64 ppm para el té verde, 127, ppm para las avellanas y 2,72 ppm para la calabaza blanca^{22,24}. Según bibliografía, se ha reportado la separación y cuantificación de AG en diferentes especies vegetales, donde se destacan aquellas obtenidas mediante HPLC, reportando concentraciones de 14,6 ppm para el té verde, 127 ppm para las avellanas y 2,72 ppm para la calabaza blanca^{22,24}. Se debe tener en cuenta que la concentración de AG depende en gran medida del método de extracción, por lo que se pudo tener bajos rendimientos debido a este. Teniendo en cuenta características del Holly liso, como lo son, la fácil proliferación, su alta tasa de crecimiento, el fácil acceso y el bajo impacto ambiental que representa la recolecta de sus frutos, se considera que los frutos de Holly liso son una posible fuente natural promisoría de AG.

Parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos permiten saber la calidad de la separación del analito, donde entre mayor sea la diferencia entre los tiempos de elución, se hablará de una mejor separación²⁵. Para la determinación de dichos parámetros, se deben considerar algunos datos que se infieren de la figura 6. De dicha figura se describe el tiempo muerto (t_m^{***}) = 2,46 min, el tiempo de retención del AG = 11,54 min y el tiempo de retención del compuesto más cercano al AG = 10,51 min.

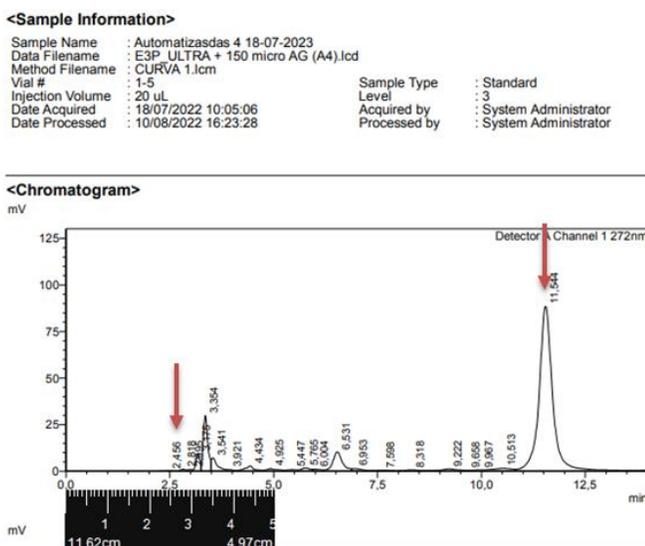


Fig. 6: Cromatograma del extracto más patrón de AG a 17 ppm para la determinación de los parámetros cromatográficos.

Tiempo de retención y tiempo de retención corregido (t_r')²⁶

$$t_r' = t_r - t_m = 11,54 \text{ min} - 2,45 \text{ min} = 9,08 \text{ min}$$

donde: t_r' = tiempo de retención corregido

t_r = tiempo de retención

t_m = tiempo muerto

Para entender el tiempo de retención obtenido se debe tener en cuenta los grupos hidroxilos que otorgan a la molécula cierta afinidad hacia los solventes acuosos, no obstante, el Log P nos indica un comportamiento apolar. El uso de una matriz compleja requiere que cada uno de los compuestos presentes posean diferencial de migración a través de la columna para lograr la separación, por ello se incrementó la proporción de agua en el inicio del gradiente con el fin de eluir las otras moléculas (más afines al solvente de mayor polaridad) presentes en el extracto. Una vez separadas las otras moléculas, se generó una rampa de concentración aumentando la proporción de acetonitrilo, de modo que la fase móvil presentara mayor afinidad hacia el AG, permitiendo de esta forma ajustar el tiempo de retención del AG justo después de salida de los otros componentes.

Factor de capacidad (k')²⁶

$$k' = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{9,080 \text{ min}}{2,450 \text{ min}} = 3,700$$

donde: t_r' = tiempo de retención corregido

t_m = tiempo muerto

Según Ahuja y Dong, “el factor de capacidad (k') mide el número de veces en que el analito es retenido en relación con un componente no retenido”²⁵. Se debe tener en cuenta que quienes tienen valores muy altos de (k') poseen tiempos largos de ensayo y un posible ensanchamiento de los picos en la columna. Por otro lado, para obtener una retención adecuada, la mayoría de los analitos en los ensayos eluyen con valores de (k') entre 1 y 20. El resultado corresponde a 3,700, siendo un valor acertado para determinar que el AG tiene una adecuada interacción con la fase estacionaria y la fase móvil para lograr su separación.

Resolución (R)²⁶

$$\begin{aligned} R &= \frac{1}{4} * \sqrt{N} * \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} * \frac{k'}{(k' + 1)} \right) \\ &= \frac{1}{4} * \sqrt{5955} * \left(\frac{(1,130 - 1)}{1,130} * \frac{3,700}{(3,700 + 1)} \right) \\ &= 1,720 \end{aligned}$$

donde: N = número de platos teóricos

α = selectividad

k' = factor de capacidad

Se considera de suma importancia determinar la resolución, ya que, según su valor, se podrá determinar si hay una separación y una cuantificación sólida de cada uno de los picos evaluados. Para este caso, se determinó la resolución entre el pico de AG, con t_r de 11,54 minutos y el pico adyacente a este, con t_r de

10,51 minutos. Ahora bien, de acuerdo con el *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* el valor de resolución objetivo es $> 2^{25}$, sin embargo, entre otras guías como Agilent Technologies, menciona que valores $> 1,7$ son los deseables para los métodos robustos²⁷. Además, considera que el valor de 1 es el mínimo para que se produzca una separación medible y que permita una separación adecuada²⁸. De modo que, al observar la resolución calculada (1,720) se observa una separación entre los picos mencionados.

Número de platos teóricos (N) y altura del plato (H)²⁶

Número de platos teóricos

$$0,3500 \text{ cm} * \frac{5 \text{ min}}{4,970 \text{ cm}} = 0,3521 \text{ min}$$

$$N = 5,550 * \frac{t_r^2}{W_{0,5}^2} = 5,550 * \frac{(11,54 \text{ min})^2}{(0,3521 \text{ min})^2} = 5955 \text{ platos teóricos}$$

donde $W_{0,5}$ = ancho a media altura

Altura del plato²⁶

$$H = \frac{L}{N} = \frac{150000 \mu\text{m}}{5955} = 25,18 \mu\text{m}$$

donde: H= Altura del plato

L= Longitud de la columna

N= Número de platos teóricos

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna, la cual está relacionada con el tiempo de retención del analito y el ancho del pico²⁵. Este modelo de platos teóricos permite determinar la eficiencia de la separación por medio de la relación inversamente proporcional con el ancho del pico. En este caso se realizó la determinación de los platos teóricos por medio del ancho a media altura del pico de AG, donde se obtuvo un valor de 5955 platos teóricos, valor que permite determinar que el método es eficiente según los lineamientos de la FDA en su guía de validación para métodos cromatográficos donde el valor de aceptación es > 2000 platos teóricos¹³. La variación en este resultado puede verse influenciada por los mecanismos de ensanchamiento de banda tales como: camino múltiple o difusión turbulenta, transferencia de masa y difusión longitudinal. Donde el principal mecanismo presente en este parámetro corresponde al de camino múltiple, ya que este hace referencia a las diferentes trayectorias que puede tomar la sustancia para finalmente eluir, siendo unas distancias mayores que otras, afectando de este modo el ancho del pico y por lo tanto influenciando negativamente el número de platos teóricos¹⁷.

Conclusiones

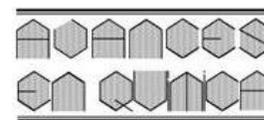
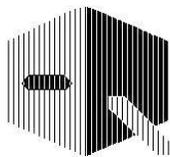
En el presente trabajo de investigación se validó la metodología de separación de ácido gálico (AG) en *Cotoneaster pannosus* de Bogotá-Colombia, por medio de la determinación de las condiciones cromatográficas que permitieron resultados reproducibles. Para la cuantificación y la validación del ácido gálico,

se eligió como el mejor método de extracción el asistido por baño ultrasónico, esto en comparación a la extracción con ácido fórmico y extracción por calentamiento, la cual se considera importante por su bajo impacto ambiental, facilidad de uso y su innovación al pertenecer a una técnica no convencional. Por otro lado, la determinación de las óptimas condiciones de separación se llevó a cabo a partir de un análisis secuencial, experimental y lógico. El análisis se evidenció mediante los cromatogramas obtenidos con las siguientes condiciones de separación: columna Phenomenex Gemini 5 μm C18 (150 mm x 4,6 mm), temperatura de 30°C, flujo de 0,550 mL/ min en gradiente, volumen de inyección de 20,00 μL , longitud de onda de 272 nm y una fase móvil compuesta por agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% v/v y acetonitrilo grado HPLC. Gracias a dichas condiciones de separación se determinó que la cantidad de ácido gálico presente en el fruto de la planta de *Cotoneaster pannosus* es 1,536 ppm, lo cual corresponde a una cantidad promisorio teniendo en cuenta sus características. Finalmente, la validación de la metodología de separación obtuvo resultados lineales, reproducibles (CV1 = 0,3630 % y CV2= 0,3510%), exactos (% de recuperación = 103,2%) y con LDD y LDC de 0,487 ppm y 1,48 ppm respectivamente. Asimismo, se considera que el método no es robusto en términos de pH, debido a la alta influencia que tiene el mismo en la retención del analito.

Referencias

1. RJ Andrade, M Robles, A Fernández, S López, C López, MI Lucena. Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: A challenge for gastroenterologists. **World Journal of Gastroenterology**, **13(3)**, 329-340 (2007).
2. A Cano, LM Cifuentes, PJ Amariles. Toxicidad hepática causada por medicamentos: revisión estructurada. **Revista Colombiana de Gastroenterología**, **32(4)**, 337-348 (2017).
3. U Latief, H Husain, D Mukherjee, R Ahmad. Hepatoprotective efficacy of gallic acid during Nitrosodiethylamine-induced liver inflammation in Wistar rats. **Journal of Basic & Applied Zoology**, **76**, 31-41 (2016).
4. AM Díaz, JE Díaz, O Vargas. Catálogo de plantas invasoras de los humedales de Bogotá. Grupo de Restauración Ecológica de la Universidad Nacional de Colombia y Secretaría Distrital de Ambiente (2012). Disponible en: https://oab.ambientebogota.gov.co/?post_type=dlm_download&p=3692
5. O Mikeš. High-Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Bio oligomers. Separation of Individual Compound Classes. **Journal of Chromatography library**, **41(B)**, B377-B467 (1988).
6. MW Dong. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. **LCGC North America**, **31(6)**, 472-476 (2013).
7. JE Weaver. The quadrat method in teaching ecology. **The Plant World**, **21(11)**, 267-283 (1918).
8. J Leblanc, A Akbarzadeh, J Andrews, H Lu, P Golding. Heat extraction methods from salinity-gradient solar ponds and introduction of a novel system of heat extraction for improved efficiency.

- Solar Energy**, **85(12)**, 3103–3142 (2011).
9. F Zakaria. Quantitative HPLC Analysis of Gallic Acid in *Benincasa hispida* Prepared with Different Extraction Techniques. **Sains Malaysiana**, **43(8)**, 1181–1187 (2014).
 10. PR Das, JB Eun. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. **Food Chemistry**, **253**, 22–29 (2018).
 11. CD Xuan, HN Xuan, DH Dong, TM Thuy, X Chinh. Tannins: Extraction from Plants. En *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*. IntechOpen (2020).
 12. F Les, V López, G Caprioli, R Iannarelli, D Fiorini, M Innocenti, M Bellumori, F Maggi. Chemical constituents, radical scavenging activity and enzyme inhibitory capacity of fruits from *Cotoneaster pannosus* Franch. **Food & Function**, **8(5)**, 1775–1784. (2017).
 13. FDA Food and Drug Administration. Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods (1994). Disponible en: <https://www.fda.gov/media/75643/download>
 14. ICH Q2 Harmonised Tripartite Guideline. Validation Of Analytical Procedures: Text and methodology Q2 (R1). En: *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use* (1996).
 15. CC Sabido, CR Rosado, JG Castellanos, AF Betancur, LA Guerrero, PO Acereto. Adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso. **Revista Latinoamericana de Química**, **38(2)**, 113–122 (2010).
 16. B Castillo, R González. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. **Revista Cubana de Farmacia**, **30(1)**, 1-7 (1996).
 17. FH Alencar, HR Nunes. Gallic acid: Review of the methods of determination and quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, **46(3)**, 257–265 (2016).
 18. EE Leon, J Guevara. Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in Different Developmental Stages of the Fungus *Amanita muscaria*. **Journal Chemistry**, **2020**, 1-4 (2020).
 19. OA Quattrocchi, RF Laba, SA Andrizzi. *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires (1992).
 20. W Horwitz, JW Latimer. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Official Method 931-01. Phosphorus in plants. Cap 3, pp. 21 Arlington VA, USA(2005).
 21. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis: Phosphorus in plants. Association of Official Analytical Chemists, Estados Unidos (1990).
 22. B Badhani, R Kakkar. DFT study of structural and electronic properties of gallic acid and its anions in gas phase and in aqueous solution. **Structural Chemistry**, **28(6)**, 1789–1802 (2017).
 23. MT Stauffer. Introductory chapter: The many faces of calibration and validation in analytical methodology in the present day. En: *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. IntechOpen (2018).
 24. PB Collins, MA Thompson. Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications. Nova Publishers. USA (2013).
 25. S Ahuja, MW Dong. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. **Separation Science and Technology**, **(6)**, 1-658 (2005).
 26. P Ravisanka, S Anusha, K Supriya, UA Kumar. Fundamental Chromatographic Parameters. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, **55(2)**, 46-50 (2019).
 27. P. Carr, R. Majors. *The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development*. Agilent Technologies, USA (2015)
 28. EE León. Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de diosgenina en un extracto del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro (*Stenocereus griseus*). **Avances en Química**, **18(2)**, 55-59 (2023).
 29. DC Harris. *Quantitative Chemical Analysis*. Editorial W. H. Freeman and Company. New York (2010).



El bagazo de la caña de azúcar como sustrato en la fermentación láctica

Miguel Omar Vera Dueñas¹, Alex Javier Romero Moreira¹, Génesis Alejandra Zambrano Zambrano¹,
Wilmer Ponce², María Antonieta Riera^{1*}

¹) Departamento de Procesos Químicos, Alimentos y Biotecnología. Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Carrera de Ingeniería Química. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador

²) Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Portoviejo, Portoviejo, Ecuador.

(*) maria.riera@utm.edu.ec

Recibido: 23/03/2024

Revisado: 12/04/2024

Aceptado: 30/04/2024

Resumen

El bagazo de caña, subproducto lignocelulósico derivado de la industria azucarera, tiene potencial para la producción energética y el desarrollo de productos biotecnológicos de alto valor. Esta investigación se enfocó en la valorización del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de ácido láctico. Se determinó su composición en cuanto a contenido de celulosa, compuestos extraíbles, lignina, holocelulosa y azúcares reductores totales. Mediante un pretratamiento de hidrólisis ácida usando un 2% de ácido clorhídrico por 30 minutos a 75 °C, se preparó el bagazo para los procesos fermentativos. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 37 °C y 40 °C durante periodos de 48, 72 y 96 horas. El residuo reportó 51,26 ± 2,10% de celulosa, 13,60 ± 2,31% de extraíbles, 11,59 ± 0,49% de lignina, 76,44 ± 1,19% de holocelulosa y 0,84 ± 0,18g/L de azúcares totales. La cuantificación del ácido láctico generado se realizó utilizando cromatografía líquida de alta resolución, registrando una concentración máxima de 5,69 g/L bajo condiciones de 37 °C y 48 horas de fermentación.

Palabras claves: Ácido láctico; bioproductos; valorización del bagazo.

Abstract

Sugarcane bagasse as a substrate in lactic fermentation. Cane bagasse, a lignocellulosic byproduct derived from the sugar industry, has the potential for energy production and the development of high-value biotechnological products. This research focused on the sugarcane bagasse valorization (*Saccharum officinarum*) for lactic acid production. Cellulose content, extractable compounds, lignin, holocellulose, and total reducing sugars were determined. The bagasse was prepared for the fermentation processes with acid hydrolysis pretreatment using 2% hydrochloric acid for 30 minutes at 75°C. Fermentations were carried out at 37 °C and 40 °C for 48, 72 and 96 hours. The residue reported 51.26 ± 2.10% cellulose, 13.60 ± 2.31% extractables, 11.59 ± 0.49% lignin, 76.44 ± 1.19% holocellulose and 0.84 ± 0.18g/L of total sugars. The quantification of the lactic acid generated was carried out using high-performance liquid chromatography, recording a maximum concentration of 5.69 g/L under conditions of 37 °C and 48 hours of fermentation.

Keywords: Lactic acid; bioproducts; bagasse valorization

Introducción

El aprovechamiento de los residuos agroindustriales como sustratos en procesos biotecnológicos para la producción de productos de alto valor agregado es una alternativa atractiva ya que estos materiales son abundantes, renovables y de bajo costo¹. Se perfilan como una opción para reducir la dependencia del petróleo y al mismo tiempo, obtener nuevos compuestos que son económicos o técnicamente inviables de obtener por síntesis química^{2,3}.

La agroindustria es una de las aportaciones más importantes en la economía del Ecuador ya que mediante la manufactura, es posible la conservación y transformación de materias primas. Las provincias con mayor superficie agropecuaria se encuentran en la región Costa del país, destacándose la producción de maíz, arroz y caña de azúcar^{4,5}. Una de las principales problemáticas ambientales que genera esta actividad es la producción

de residuos donde solo una pequeña fracción es comestible para el hombre y animales, quedando la mayoría sin disposición final adecuada constituyendo un foco de contaminación⁶.

Los residuos agrícolas poseen en su estructura altos contenidos de polisacáridos, que pueden ser utilizados para la producción de azúcares fermentables. Un claro ejemplo es el bagazo de la caña de azúcar porque presenta características interesantes, tales como su renovabilidad, bajo valor económico y abundancia⁷. Este residuo está constituido principalmente de 50 % de celulosa, 25 % de hemicelulosas y 25 % de lignina⁸. A pesar de que es utilizado como combustible en las industrias azucareras, alimentaria, de papel, alcohol y química, grandes cantidades son acumuladas en la naturaleza¹. Estudios relacionados con el tratamiento de los hidrolizados de bagazo de caña⁹, son de interés en la producción de productos biotecnológicos.

Investigaciones recientes se enfocan en encontrar nuevas me-

tecnologías usando este residuo como sustrato, para la obtención de bioetanol, biohidrógeno, bioplaguicidas fúngicos y ácido láctico^{10,11}. Este último es precursor del ácido poliláctico, un polímero biodegradable que puede ser un sustituto del plástico convencional derivado del petróleo^{12,13}.

El ácido láctico (AL), es un ácido orgánico natural de importancia industrial por sus amplias aplicaciones en la industria de alimentos, como acidulante, preservante y antimicrobiano. En la industria farmacéutica, como electrolito y fuente de minerales. En la industria cosmética como pH buffer y rejuvenecedor de la piel. En la industria química como neutralizante, solvente y agente limpiador^{14,15}.

Cerca del 90% de la producción mundial de ácido láctico proviene de la fermentación láctica, debido a que se emplea materia prima de bajo costo. Algunos microorganismos pueden producir AL ópticamente puro, mientras que la síntesis química produce una mezcla racémica de AL y su proceso de producción tiene consecuencias negativas para el planeta^{16,17}.

Sin embargo, convertir los azúcares de la pared celular del bagazo de caña en ácido láctico es un gran desafío debido a la naturaleza protectora bioquímica y estructural de la lignina, que dificulta la hidrólisis de los polisacáridos en monosacáridos fermentables. De manera general, los procesos de conversión empleados comprenden de cuatro a cinco etapas: reducción del tamaño de partícula, pretratamiento hidrolítico, sacarificación enzimática, fermentación y purificación. Cada etapa presenta diferentes metodologías que pueden generar varios resultados¹⁸. Por ejemplo, en ciertos procesos no es necesario llevar a cabo la sacarificación enzimática, sólo cuando la producción de azúcares fermentables obtenidos en la hidrólisis es baja^{19,20}. La finalidad de reducir el tamaño de partículas es facilitar el acceso del ácido o del álcali a las zonas cristalinas de la estructura lignocelulósica para separar la lignina de la celulosa. Los azúcares fermentables liberados pueden convertirse posteriormente en AL mediante bacterias ácido-lácticas. Finalmente, el producto de interés se puede recuperar del licor de fermentación y determinar su concentración mediante la cromatografía de alta resolución (HPCL)^{21,22}.

Esta transición hacia la utilización de sustratos renovables y de bajo costo, como el bagazo de caña de azúcar, no solo ofrece una ruta sostenible para la producción de compuestos valiosos como el ácido láctico, sino que también contribuye significativamente a la mitigación de los problemas de desechos y contaminación ambiental²³. Dentro de este contexto, se propuso utilizar el residuo del bagazo de caña de azúcar, el cual es un residuo agrícola abundante y con alto contenido de azúcares, para la obtención de ácido láctico a través de un proceso fermentativo.

Materiales y métodos

Residuo utilizado

El bagazo de caña (BGC) empleado en esta investigación se obtuvo en el proceso de producción artesanal de jugo de caña

proveniente del cantón Junín, provincia de Manabí, de la costa ecuatoriana. El mismo se recolectó en sacos de yute con capacidad de 10 L y se trasladó al laboratorio, donde se redujo su tamaño en un molino de acción mecánica. Luego se tamizó en un tamiz ASTM No. 70. Las muestras tamizadas se conservaron en bolsas plásticas herméticas a temperatura ambiente hasta su utilización.

Microrganismo y preparación del inóculo

Se utilizó la cepa liofilizada YOFLEX Lb-12 de *Lactobacillus delbrueckii*. Se tomó 0,5 g de cultivo y se activó en 50 mL caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), incubando a 37 °C durante 24 h. Luego, se tomó 1 mL de la muestra y se realizaron 10 diluciones seriadas por duplicado en Agar MRS, incubándose a 37 °C por 48 h²¹.

Pretratamiento del residuo

Se efectuó un pretratamiento de hidrólisis ácida mediante lo señalado por Quintero Mora *et. al.*²⁴. Se trabajó con una solución de HCl al 2% (v/v), temperatura y tiempo de 75 °C y 30 min, respectivamente. La proporción fue de 1:10 (p/v), por cada gramo de biomasa corresponden 10 mL de solución. El hidrolizado se filtró con papel Whatman, y al jarabe obtenido se le ajustó el pH entre 4 - 4,5 con NaOH 5N, para el proceso de fermentación.

Determinación de azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores (ART) en las muestras hidrolizadas se determinó con espectrofotómetro HACH, modelo Dr5000, a 540 nm mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando glucosa como estándar¹². En el proceso de extracción de ART se evaluó el factor de tiempo de reacción de hidrólisis ácida a tres niveles (15, 30, 45 min). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para un total de 9 experimentos.

Caracterización del residuo

Se realizó la caracterización fisicoquímica del bagazo de caña de azúcar (BGC). Se determinó su humedad, celulosa, lignina, hemicelulosa, holocelulosa y extraíbles. Los procedimientos utilizados en cada caso se describen a continuación. La humedad se determinó según lo descrito en la norma ASTM-E871²⁵, para lo cual se tomó 1 g de muestra se llevó a la estufa a una temperatura de 105 ± 2 °C durante 1 hora. Por diferencia de peso se determinó el porcentaje de humedad usando (1), donde %H es el porcentaje de humedad, m la masa de la muestra en g y m₁ la masa seca en g.

$$\%H = \frac{m - m_1}{m} \times 100 \% \quad (1)$$

El contenido de celulosa se encontró utilizando la metodología descrita por Domínguez *et al.*²⁶. Para ello se tomó 1 g de la muestra, se añadió 15 mL de solución de ácido acético al 80% en masa/volumen (m/v); 1,5 mL de HNO₃ y se llevó a agitación constante durante 20 minutos. La muestra tratada se filtró y se lavó con etanol, se secó en estufa a una temperatura de 100-105 °C durante 90 minutos y se pesó (material A). Se procedió a la

incineración a 540°C (material B), se dejó secar en un desecador y se pesó. Los resultados obtenidos se emplearon para determinar el % de celulosa mediante (2):

$$\%Celulosa = \frac{materialA - materialB}{Pesodelamuestra} \times 100 \% \quad (2)$$

En la determinación de lignina se siguió el procedimiento señalado por Domínguez *et al.*²⁶. Se tomó 1 g de la muestra, se añadió 70 mL de H₂SO₄ al 1,5% (v/v) y se llevó a agitación constante por 2 horas, se filtró y se lavó con agua destilada. A este material se le añadió 30 mL de una solución al 72% (v/v) de H₂SO₄ con agitación constante durante 4 horas. La muestra tratada se filtró y se lavó con agua destilada, se secó en estufa a una temperatura de 100-105 °C durante 120 minutos y se pesó (material C). Se incineró a 540 °C (material D), se dejó secar en un desecador y se procedió a pesar. El % de lignina se calculó usando (3).

$$\%Lignina = \frac{materialC - materialD}{Pesodelamuestra} \times 100 \% \quad (3)$$

La holocelulosa y hemicelulosa presente en el BGC, se encontró tomando 2 g de muestra libre de extractos, que se colocó en un matraz de 500 mL. Se añadió 160 mL de agua destilada, 1 g de clorito de sodio NaClO₂ y 0,2 mL de ácido acético. Se introdujo en un baño termostático a una temperatura entre 70 °C a 80 °C. Pasada 1 hora se añadió nuevamente 1 g de clorito de sodio NaClO₂ y 0,2 mL de ácido acético CH₃COOH. Este proceso se repitió tres veces durante 3 horas, hasta que la muestra se tornó blanca. Se recogió el residuo y se introdujo en un crisol previamente pesado, y se secó a 105 ± 3°C durante 3 horas hasta peso constante²⁷. El porcentaje de holocelulosa (%HC) se calculó mediante (4) y el porcentaje de hemicelulosa se calculó con (5).

$$\%HC = \frac{Pesodelresiduo seco (g)}{Pesodelamuestra original libre de extracto} \times 100 \% \quad (4)$$

$$\%Hemicelulosa = \%Holocelulosa - \%Celulosa \quad (5)$$

Para determinar los extraíbles se tomaron 12 g de muestra previamente tamizada, seca y con humedad determinada. Se colocó el dedal en el sistema de extracción (Soxhlet con condensador a reflujo) manteniendo una relación de ¾ de solvente con respecto al balón. Se realizó la extracción con n-Hexano durante 5 horas, se secó el contenido del dedal (libre de extraíbles) durante 48 horas a temperatura ambiente, luego se transfirió el material a un crisol previamente tarado y se pesó. Se secó en estufa a 100 ± 5 °C durante 2 horas, se sacó la muestra y se transfirió a un desecador durante 15 min²⁸. Se pesó y secó hasta peso constante. El porcentaje de extraíbles se obtuvo por medio de (6), donde P.M es el peso libre de extraíble en gramos.

$$\%Extraíbles = \frac{12 \times P.M}{12} \times 100 \% \quad (6)$$

Fermentación láctica

Se estableció un diseño de experimentos mixto (tabla 1), con dos factores: temperatura con dos niveles (37°C y 40°C) y tiempo de reacción con tres niveles (48 h, 72 h y 96 h). El experimento se llevó a cabo en Erlenmeyer de 100 mL, en los que

Tabla 1. Diseño del experimento

Factor	Nivel
Temperatura (°C)	37
	40
Tiempo (h)	48
	72
	96

se dispuso el inóculo e hidrolizado, se reguló el pH entre 4 - 4,5 y la concentración de azúcar presente en el medio, con la adición de sacarosa en polvo hasta una concentración de azúcar del 20% (m/v). Posteriormente, se selló herméticamente generando un ambiente anaerobio. Los recipientes se colocaron en una incubadora a 37 °C y 40 °C en iguales tiempos de reacción (48 h, 72 h y 96 h)²⁹. Estos ensayos se efectuaron por triplicado.

Cuantificación del ácido láctico

La identificación y cuantificación del ácido láctico se realizó mediante una modificación del método propuesto por Zamanova *et al.*³⁰, utilizando un cromatógrafo líquido ACCELA de ThermoFisher Scientific, equipado con una columna C18 de fase reversa (5µm; 4,6x100mm) y un fotodetector de matriz de diodos UV-VIS (PDA). Para la concentración del ácido láctico producido, se filtró la solución y luego se centrifugó a 2500 rpm por 5min, en tubos falcon para centrífuga. Una vez terminada la centrifugación, el sobrenadante obtenido se pasa por dos filtraciones, la primera por medio de un papel filtro Whatman con la ayuda de un embudo de porcelana y un Erlenmeyer de 500 mL conectado a una bomba de vacío. Posteriormente, se realizó una microfiltración al vacío, en membrana de un poro de 1,2 µm. La fase móvil binaria empleada, consistió en acetonitrilo (A) y una solución 3x10⁻² M de H₃PO₄, (B), a un radio de 12:88 (v/v) respectivamente, con un flujo constante de 0,7 mL/min. La detección fue realizada a una longitud de onda de 210 nm con un volumen de inyección de 20 µL, y temperatura controlada de 40 °C en la columna y compartimiento de muestras.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), usando el software *Statgraphics Centurion XVIII*. Se utilizó la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95 %.

Resultados

Caracterización del residuo

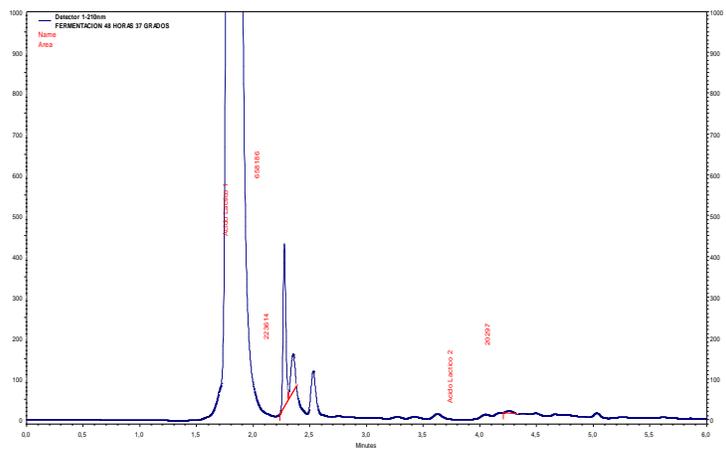
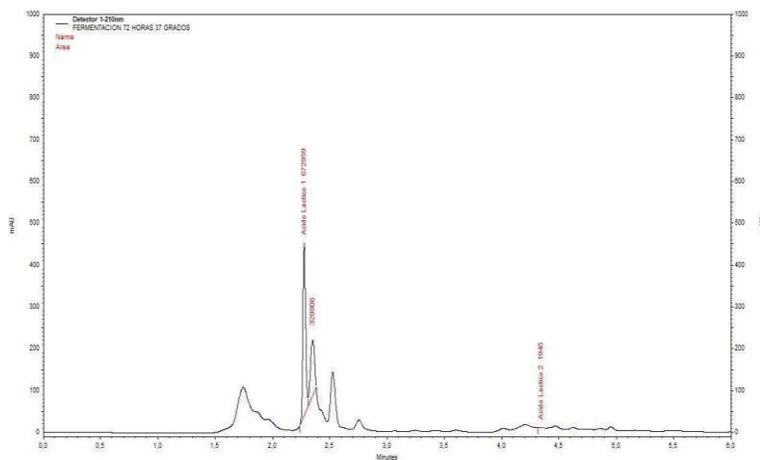
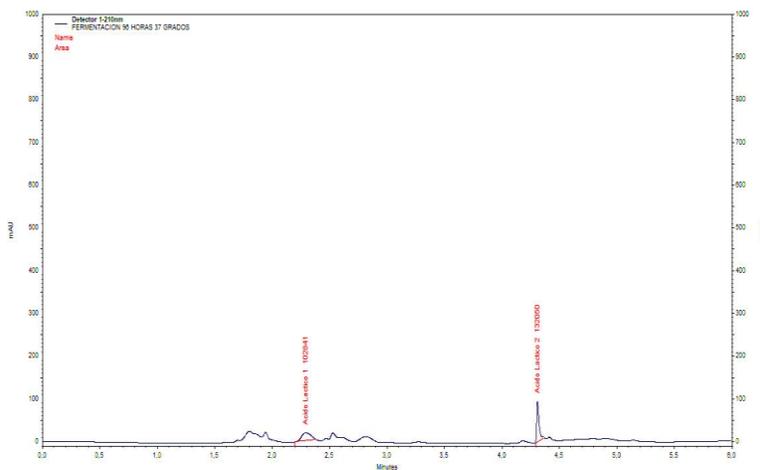
En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica del BGC.

Fermentación láctica

Gracias a los procesos fermentativos, se obtuvo ácido láctico en cada una de las condiciones operacionales establecidas. Los resultados correspondientes se presentan en las figuras 1-6.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del BGC *

Parámetro	$\bar{x} \pm \sigma$
Humedad (%)	8,30 \pm 0,92
Celulosa (%)	51,26 \pm 2,10
Lignina (%)	11,59 \pm 0,49
Holocelulosa (%)	76,44 \pm 1,19
Hemicelulosa (%)	25,18 \pm 2,78
Extraíbles (%)	13,60 \pm 2,31

**Fig. 1:** Producción de AL registrada a 37 °C a 48 h.**Fig. 2:** Producción de AL registrada a 37 °C a 72 h.**Fig. 3:** Producción de AL registrada a 37 °C a 96 h.

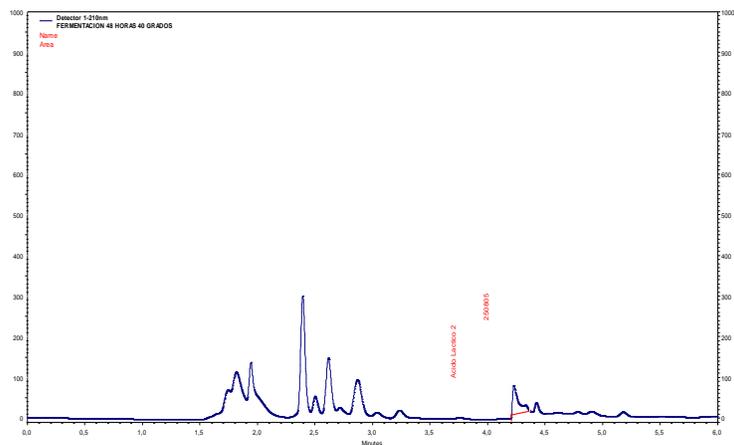


Fig. 4: Producción de AL registrada a 40 °C a 48 h.

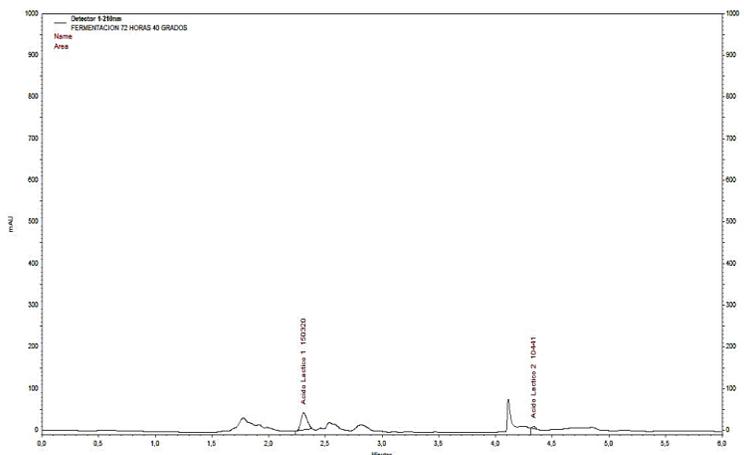


Fig. 5: Producción de AL registrada a 40 °C a 72 h.

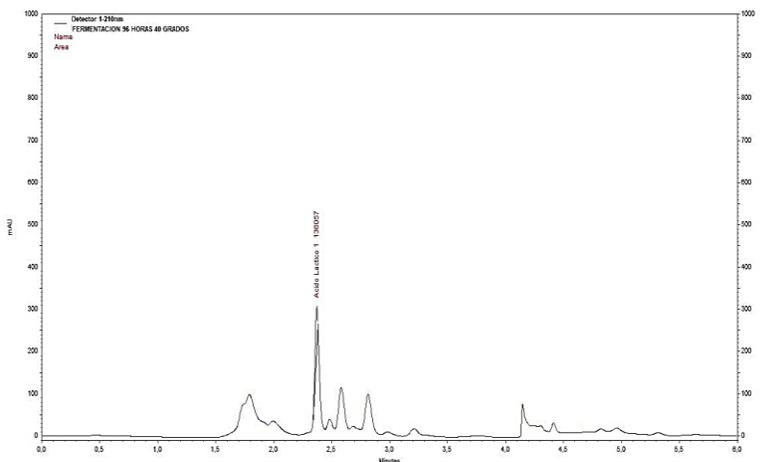


Fig. 6: Producción de AL registrada a 40 °C a 96 h.

Tabla 3. Concentración de AL para cada tratamiento.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Concentración (g/L)
37	48	5,70
	72	5,65
	96	1,63
40	48	1,77
	72	0,95
	96	0,74

Cuantificación del ácido láctico

A partir del proceso de fermentación láctica (Tabla 3), se determinó que las condiciones de trabajo de 37 °C con un tiempo de fermentación de 48 h y 72 h favorecen la obtención de ácido láctico, por ser estas con las cuales se obtuvieron mejores resultados.

Análisis estadístico

En la tabla 4 se presentan los resultados del ANOVA obte-

Tabla 4. ANOVA para la producción de ácido láctico.

Factor	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<i>Efectos principales</i>				
A: Tiempo (min)	2,23529E+07	1,11765E+07	11.100.599.095	0.00000
B: Temperatura (°C)	4,52468E+07	4,52468E+07	44.939.752.221	0.00000
<i>Interacciones</i>				
AB	1,21721E+07	6,08604E+06	6.044.735.120	0.00000

nido para la producción de ácido láctico, considerando las variables que intervinieron en el proceso de fermentación.

Discusión

Los resultados obtenidos en la caracterización del BGC, contrastan en investigaciones similares realizadas con el mismo residuo. Ferrer *et al.*³¹, obtuvieron una humedad de $7,5 \pm 1,46$ %; azúcares reductores de $6,09$ g/L. Chandler *et al.*³², reportaron un contenido de humedad de $5,19 \pm 0,32$ %, $17,28 \pm 0,04$ % de extraíbles y $1,51 \pm 0,09$ g/L para los azúcares reductores.

El contenido de humedad obtenido en este trabajo es superior a lo reportado en otros trabajos³³, lo que puede atribuirse a diferencias en el método de secado o en las condiciones ambientales durante el almacenamiento de los residuos. Estas diferencias en el contenido de humedad podrían influir en la eficiencia de la hidrólisis, ya que un mayor contenido de agua puede diluir los reactivos y disminuir la concentración de catalizador, afectando así la tasa de reacción. La variabilidad en los niveles de azúcares reductores y extraíbles puede ser resultado de la heterogeneidad intrínseca del BGC, así como de las diferencias en los procedimientos de extracción utilizados en cada estudio. Una mayor presencia de extraíbles puede competir con los azúcares reductores durante la reacción de hidrólisis ácida, posiblemente inhibiendo la formación de AL. Es importante destacar que la presencia de estos compuestos en las concentraciones detectadas es un indicativo favorable para el proceso de hidrólisis en la producción de AL, ya que asegura una cantidad suficiente de sustrato reaccionante³⁴.

En una investigación similar Ferrer *et al.*³¹, reportaron $12,86 \pm 0,28$ % para el contenido de lignina; $71,52 \pm 1,92$ %; $52,25 \pm 0,34$ % y $19,27 \pm 1,58$ % para los contenidos de holocelulosa, celulosa y hemicelulosa respectivamente. Para Chandler *et al.*³², los resultados para lignina, holocelulosa, celulosa y hemicelulosa fueron de $12,49 \pm 0,08$ %; $70,24 \pm 1,90$ %; $65,25 \pm 0,89$ % y $7,99 \pm 1,01$ %, respectivamente. Domínguez *et al.*²⁶, registraron $53,73$ % para el contenido de celulosa y $26,37$ % de lignina. Cabrera-Ayala y Novoa³⁵, obtuvieron $1,3 \pm 0,05$ % de lignina soluble, $23,8 \pm 0,76$ % de lignina insoluble, $70,50 \pm 2,06$ % de holocelulosa, $49,3 \pm 1,33$ % de celulosa y $21,2 \pm 0,73$ % de hemicelulosa. Por su parte Alokika *et al.*³⁶, indican que el BGC contiene entre 32-45% de celulosa y 20-32% de hemicelulosa, proporcionando

una base comparativa robusta para las mediciones de celulosa y hemicelulosa registradas en esta investigación.

Con base a lo reportado en la literatura consultada, se evidencia que los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran dentro de los valores reportados para la composición lignocelulósica del bagazo de caña de azúcar. La similitud entre los valores reportados, sugiere que las condiciones de pretratamiento y las características inherentes del bagazo de caña de azúcar mantienen una relativa uniformidad entre distintas muestras y métodos de estudio. La lignina, por otro lado, puede afectar la eficiencia del proceso al actuar como un inhibidor físico y químico, limitando el acceso de los reactivos a la celulosa y hemicelulosa, reduciendo la eficiencia de la sacarificación, o formando productos secundarios que requieren purificación adicional³⁶. Por ende, un contenido elevado de lignina podría requerir etapas adicionales de pretratamiento para mejorar los rendimientos de AL³⁵. La similitud en la composición lignocelulósica reflejada en los resultados obtenidos en nuestra investigación indica que las técnicas de procesamiento aplicadas son adecuadas para la obtención de AL y están en concordancia con las metodologías establecidas, lo que contribuye a la replicabilidad y escalabilidad del proceso para su aplicación industrial.

En la producción de ácido láctico, la muestra a 37 °C y 48 h presentó mayor contenido de ácido láctico al observar una mayor altura y área de los 3 picos identificados. Esto indica que se obtuvo una concentración máxima de producto luego de 48 horas de reacción. Por el contrario, a 37 °C (72 y 96) h de reacción, la concentración disminuye como resultado de la transición de las fases estacionaria y de muerte de los microorganismos.

Al finalizar la fermentación a 40 °C durante los tiempos establecidos, se evidencia mayor presencia de ácido láctico en el pico de la muestra a 48 h de reacción, alcanzando la mayor concentración en el menor tiempo de estudio. Sin embargo, la cantidad de AL obtenido fue inferior respecto a 37 °C por la incidencia de la temperatura. Esto sugiere el uso de bacterias preferiblemente termófilas, que fermenten rápida y completamente este tipo de sustratos.

Saavedra *et al.*³⁷ resaltaron la eficacia de *Lactobacillus plantarum* en la conversión de melaza de caña a ácido láctico, sugiriendo que las condiciones óptimas para la fermentación pueden ser altamente específicas para el sustrato y la cepa

utilizada. Al comparar estos hallazgos con los del presente estudio, se evidencia que la cepa empleada en la muestra fermentada, pudo haber tenido una adaptabilidad particularmente alta a las condiciones de fermentación o una afinidad específica por los nutrientes presentes, lo que resultó en una mayor producción de ácido láctico. Esto se corrobora con la altura y área de los picos identificados en el cromatograma, donde la muestra sometida a 37 °C y 48 h muestra una clara ventaja en la concentración máxima alcanzada.

Djukić-Vuković *et al.*³⁸ enfatizan la importancia de la selección de cepas capaces de fermentar eficientemente sustratos complejos en condiciones variables. La disminución en la concentración de ácido láctico observada en las muestras a podría atribuirse a la influencia de la temperatura durante la fermentación, lo que contrasta con la necesidad de emplear bacterias termófilas para mejorar la sostenibilidad y eficiencia de la producción. El menor rendimiento de AL comparado con el estudio anterior resalta la relevancia de la temperatura en la actividad y viabilidad de las bacterias, y subraya la posibilidad de optimizar aún más el proceso mediante la manipulación de este parámetro y la selección de cepas con perfiles termófilos adecuados para estas condiciones. Estos ajustes podrían conducir a una producción de ácido láctico más consistente y predecible, alineada con las metas de sostenibilidad y rentabilidad³⁸.

En investigaciones similares se evaluó el uso de residuales agrícolas para la obtención de ácido láctico. Jawad *et al.*³⁹, alcanzaron una concentración de 17,484 g/L de AL al trabajar con residuos de cáscara de mango y 5,9 g/L al emplear piña como sustrato. En una investigación se empleó una mezcla de residuos de mora y suero de leche, obteniendo una concentración de $461,068 \pm 0,118 \mu\text{g}$ ácido láctico/L⁴⁰. Así mismo, Rodríguez Rojas *et al.*⁴¹, obtuvieron una concentración de ácido láctico de 2,54 g/L al utilizar bagazo de caña de azúcar, siendo un valor inferior al reportado en este trabajo.

La comparativa de los resultados de ácido láctico obtenidos en este estudio con aquellos reportados en otros trabajos^{39,40}, indica una variación significativa en las concentraciones alcanzadas, lo cual puede ser atribuible a varios factores clave en el proceso de fermentación. Saavedra *et al.*³⁷, señalaron la importancia de la optimización del medio de fermentación, en particular cuando se utiliza melaza de caña como sustrato, lo cual indica que la composición del medio puede tener un efecto sustancial en la eficiencia de la producción de ácido láctico. En esta investigación, la selección del BGC como sustrato podría haber influenciado la disponibilidad de nutrientes y, por consiguiente, la producción de ácido láctico, comparativamente menor a la obtenida al utilizar residuos de cáscara de mango y piña, lo que posiblemente se deba a diferencias en la composición de azúcares y otros compuestos fermentables presentes en los distintos residuos³⁹.

En investigaciones recientes se ha demostrado que la eliminación de lignina y extractivos del bagazo de caña mejora significativamente la sacarificación y la fermentación, alcanzando una conversión de celulosa del 87% y una producción de etanol de 15,17 g/L⁴². Vaz *et al.*⁴³, exploraron diferentes pretratamientos químicos en el bagazo de caña, encontrando que los tratamientos con ácidos sulfúrico y oxálico, además de los alcalinos con peróxido de hidrógeno, son particularmente efectivos para solubilizar la hemicelulosa y eliminar lignina, respectivamente. En un trabajo similar, se introdujo un paso innovador de pre-fermentación de carbohidratos solubles en agua antes del pretratamiento ácido, mejorando notablemente la producción de ácido D-láctico con el bagazo de caña como sustrato. Con ello se logró reducir la generación de inhibidores y aumentar la producción de ácido D-láctico a 57,0 g/L, un avance significativo que refleja el potencial de optimización del proceso de fermentación¹³.

La elección de cepas bacterianas, así como las condiciones de fermentación (temperatura y tiempo de reacción), también son aspectos determinantes en la eficiencia de conversión de los sustratos complejos en ácido láctico³⁸. El uso de bacterias termófilas, podría mitigar las diferencias de rendimiento observadas frente a los resultados donde emplearon bagazo de caña de azúcar y obtuvieron concentraciones superiores⁴¹. Esto coincide con lo señalado respecto a la optimización de los métodos de producción y la adaptación de los microorganismos a los sustratos y condiciones de fermentación específicos³⁸.

La glucosa añadida en algunos de los estudios comparativos podría ser un factor determinante en la eficiencia de la fermentación. La disponibilidad directa de este monosacárido como fuente de carbono fácilmente asimilable para las bacterias podría explicar las altas concentraciones de ácido láctico³⁸, lo que resalta la influencia de la suplementación del sustrato en la obtención de resultados óptimos.

Otro aspecto observado, es la notable disminución en la concentración de ácido láctico con el aumento del tiempo de fermentación para ambas temperaturas, 37 °C y 40 °C, siendo mayor en la temperatura más alta. A 37 °C, hay una disminución significativa después de las 48 horas iniciales, podría interpretarse como el agotamiento de los nutrientes disponibles o la acumulación de inhibidores metabólicos. Al respecto Abdel *et al.*⁴⁴, señalan que los inhibidores derivados de lignocelulosa pueden afectar la producción de ácido láctico. Los resultados sugieren que, después de un período óptimo de fermentación, los productos de la reacción o los cambios en el ambiente pueden inhibir el metabolismo bacteriano o la viabilidad celular.

En cuanto a la temperatura es importante establecer condiciones óptimas para la producción de ácidos lácticos ópticamente puros, que son precursores del polímero biodegradable poliácido láctico⁴⁵. Las temperaturas más altas pueden

afectar la estabilidad de las enzimas y la integridad de las células bacterianas, resultando en una menor producción de ácido láctico, como se observa en el decremento significativo de la concentración a 40 °C en comparación con 37 °C en todos los tiempos evaluados. Esto puede deberse a la sensibilidad de las bacterias productoras de ácido láctico a las temperaturas elevadas, lo que puede afectar su crecimiento y fermentación.

La disminución continua de la concentración de ácido láctico a 40 °C señala que las bacterias podrían estar experimentando estrés térmico, lo que impacta negativamente en su capacidad para producir ácido láctico. Esto podría estar relacionado con la desnaturalización de enzimas involucradas en la ruta metabólica de producción de ácido láctico o con una alteración en la permeabilidad de la membrana celular que afecta la homeostasis interna y, por ende, en el metabolismo bacteriano⁴⁵.

La caracterización del BGC indica que este residuo posee un alto contenido de celulosa y holocelulosa, componentes preferentes para la fermentación. Sin embargo, el contenido de lignina podría requerir etapas de pretratamiento adicionales para mejorar la disponibilidad de los azúcares fermentables. Estos hallazgos subrayan la importancia de una selección cuidadosa de las condiciones de pretratamiento y fermentación para optimizar la producción de ácido láctico, así como la necesidad de cepas bacterianas con capacidades metabólicas específicas para sustratos complejos.

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los datos evidenció diferencias estadísticamente significativas en la producción de ácido láctico influenciadas por las variables de temperatura y tiempo. La producción óptima de ácido láctico se observó a 37 °C con tiempos de fermentación de 48 h y 72 h, demostrando que estas condiciones favorecen la actividad fermentativa de *Lactobacillus delbrueckii*. La disminución notable de la concentración de ácido láctico a 96 h y a una temperatura de 40°C sugiere un posible efecto inhibitorio debido al estrés térmico o al agotamiento de nutrientes, lo cual es coherente con la literatura existente que resalta la sensibilidad de las cepas bacterianas a las condiciones ambientales.

Los altos valores de F y en contraste unos valores de P prácticamente nulos (0.00000) confirman que ambas variables, tanto de forma individual como conjunta, afectan de manera decisiva la producción. Esto sugiere que cualquier cambio en la temperatura y el tiempo de fermentación altera significativamente la cantidad de ácido láctico producido. Esta información es de importancia en la optimización del proceso de fermentación, enfatizando la necesidad de controlar rigurosamente dichas variables para maximizar los rendimientos.

Conclusiones

El bagazo de caña de azúcar se destaca como una materia prima abundante, con potencial para ser utilizada como sustrato en la generación de productos de valor agregado. La

hidrólisis química, empleando ácidos en bajas concentraciones, representa una vía viable para la obtención de azúcares destinados a procesos fermentativos. Los resultados de la fermentación láctica indican que el incremento de la temperatura a 40°C conlleva a una notable reducción en la producción de ácido láctico. Este fenómeno subraya cómo la interacción de diversas variables, incluyendo el tipo de sustrato, el agente hidrolizante, su concentración, el tiempo y la temperatura de reacción, el pH y la cepa utilizada, juega un rol crucial en la producción de ácido láctico. La interpretación del análisis estadístico confirma la sinergia existente entre las condiciones físicoquímicas del bagazo de caña de azúcar y las variables operativas de la fermentación. De allí, la necesidad de pretratar el bagazo para disminuir su contenido de lignina y aumentar la disponibilidad de los azúcares fermentable. Dentro de este contexto, para optimizar los rendimientos futuros, es esencial determinar la proporción ideal de glucosa o de otros nutrientes en el medio de fermentación, a fin de maximizar la producción de ácido láctico a partir del bagazo de caña de azúcar.

Referencias

1. E Martínez, M Villareal, E Almeida, J Silva, A Solenzal, L Canilha, S Mussanto. Uso de diversas materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *biotecnológica de xilitol. Ciencia y tecnología de los alimentos*, **3(5)**, 295-301 (2002).
2. G Mustafa, M Arshad, I Bano, M Abbas, M. Biotechnological applications of sugarcane bagasse and sugar beet molasses. *Biomass Conversion and Biorefinery*, **13**, 1489-1501 (2020).
3. B Jin, P Yin, Y Ma, L Zhao. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32**, 678-686 (2005).
4. Perfil sectorial en la Agroindustria. Instituto de promoción de exportaciones e inversiones, Ecuador (pp. 2-27). PROECUADOR (2017).
5. P Baral, A Pundir, V Kumar, A Kurmi, D Agrawal, D. Expedient production of concentrated glucose-rich hydrolysate from sugarcane bagasse and its fermentation to lactic acid with high productivity. *Food and Bioproducts Processing*, **124**, 72-81 (2020).
6. K Cury, Y Aguas, A Martínez, R Olivero, LC Ch. Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, **9(S1)**, 122-132 (2017).
7. R Suárez, RB Morín. Caña de azúcar y sostenibilidad: enfoques y experiencias cubanas. *Desarrollo Alternativo A.C. Desal*, **19**, 41-26 (2005).
8. K Nalawade, P Baral, SP Patil, A Pundir, A Kurmi, K Konde, S Patil, D Agrawal. Evaluation of alternative strategies for generating fermentable sugars from high-solids alkali pretreated sugarcane bagasse and successive valorization to L (+) lactic acid. *Renewable Energy*, **157**, 708-717 (2020).

9. R Rodríguez, M Felipe, J Almeida, M Vitolo, P Gómez. The influence of pH, temperatura and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, **18**, 299-311 (2001).
10. JO Madu, BO Agboola. Bioethanol production from rice husk using different pretreatments and fermentation conditions. **3 Biotech**, **8(1)**, **15** (2018).
11. A González-Leos, MG Bustos-Vázquez, G Rodríguez-Castillejos, LV Rodríguez-Durán, A Del Ángel-DeL Ángel. Kinetics of lactic acid fermentation from sugarcane bagasse by *Lactobacillus pentosus*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, **19(1)**, 377-386 (2019).
12. HAE Duran, DC Parada, D Laverde, DY Peña, C Vásquez. Obtención de ácido poli l-láctico mediante policondensación con catalizador de cinc metálico. **Scientia et technica**, **1(36)**, 267-272 (2007).
13. Z Qiu, X Han, A Fu, Y Jiang, W Zhang, C Jin, D Li, J Xia, J He, Y Deng, N Xu, H Gu, J Xu. Enhanced cellulosic D-lactic acid production from sugarcane bagasse by pre-fermentation of water-soluble carbohydrates before acid pretreatment. **Bioresource Technology**, **368**, 128324 (2022).
14. P Westerhoff, Y Yoon, S Snyder, E Wert. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental science y technology**, **39(17)**, 6649-6663 (2005).
15. D Wischral, JM Arias, LFA Modesto, DF Passos, N Pereira. Lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysates by *Lactobacillus pentosus*: Integrating xylose and glucose fermentation. **Biotechnology Progress**, **35 (1)**, e2718 (2018).
16. E Cubas-Cano, C González-Fernández, M Ballesteros, E Tomás-Pejó. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. **Biofuels, bioproducts and biorefining**, **12(2)**, 290-303 (2018).
17. Q An, J Bu, J Cheng, BB Hu, YT Wang, MJ Zhu. Biological saccharification by *Clostridium thermocellum* and two-stage hydrogen and methane production from hydrogen peroxide-acetic acid pretreated sugarcane bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, **45**, 30211-30221 (2020).
18. Q Ji, X Yu, AE Yagoub, L Chen, OA Fakayode, C Zhou. Synergism of sweeping frequency ultrasound and deep eutectic solvents pretreatment for fractionation of sugarcane bagasse and enhancing enzymatic hydrolysis. **Ultrasonics Sonochemistry**, **73**, 105470 (2021).
19. J Wu, A Elliston, G Le Gall, IJ Colquhoun, SR Collins, IP Wood *et al.* Optimising conditions for bioethanol production from rice husk and rice straw: effects of pre-treatment on liquor composition and fermentation inhibitors. **Biotechnology for biofuels**, **11(1)**, 1-13 (2018).
20. M Domínguez, AA Castillo, T Castrejón, M Granados, F Hernández, VH Alcalá, J Picazo. Estudio de la Cinética de la Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, **12(3)**, 153-159 (2011).
21. RE Tejada-Tovar, LP Tejada-Benítez, CN Tejada-Tovar, A Villabona-Ortiz, C Granados-Conde. Aprovechamiento de ñame espino post-cosecha (*Dioscorea rotundata P.*) en la extracción de ácido láctico. **Prospectiva**, **16(1)**, 76-82 (2018).
22. J Grewal, SK Khare. One-pot bioprocess for lactic acid production from lignocellulosic agro-wastes by using ionic liquid stable *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, **251**, 268-273 (2018).
23. A Simair, AS Qureshi, SP Simair, I Khushk, S Klykov, CH Ali, C Lu. An integrated bioprocess for xylanase production from agriculture waste under open non-sterilized conditions: Biofabrication as fermentation tool. **Journal of Cleaner Production**, **193**, 194-205 (2018).
24. LP Quintero Mora, Y Martínez Castilla, JA Velasco Mendoza, A Arévalo Rodríguez, Y Amparo Muñoz, NA Urbina Suarez. Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev.ION**, **28(1)**, 43-53 (2015).
25. American Society for Testing and Materials (ASTM). Norma E871-82. Método de prueba estándar para análisis de humedad de combustibles de madera en partículas. West Conshohocken: ASTM International (2019).
26. MM Domínguez, A Álvarez Castillo, M Granados Baeza, F Hernández Campos. Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, **13(4)**, 202-203 (2012).
27. CP Loja Sánchez. Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores. Tesis de grado mención en Ingeniería Química. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador (2017).
28. MR Fonseca Maldonado. Determinación de la composición química de la madera de pino candelillo (*Pinus maximinoi H. E. Moore*) procedente de la finca Río Frío, Tactic, Alta Verapaz. Tesis de grado mención en Ingeniería Química. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala (2006).
29. CG Calvopiña Toapanta, JC Manotoa Betancourt. Obtención de ácido láctico a partir de lactosuero y almidón de papa mediante fermentación láctica. Tesis de grado mención en Ingeniería Química. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador (2020).
30. MVN Zamanova, TI Glotova, D Krutas, V Novikov. Determinación simultánea por HPLC-UV de ácido láctico, ácido glicólico, glicólido, lactida y acetato de etilo en monómeros para producir polímeros biodegradables. **Procedia Chemistry**, **10**, 244-251 (2014).
31. JR Ferrer, G Páez, L Arenas de Moreno, C Chandler, Z Mármol, L Sandoval. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. **Revista de la Facultad de Agronomía**, **19(1)**, 23-33 (2002).
32. C Chandler, N Villalobos, E González, E Arenas, Z Mármol, J Ríos, CA Mazzarri. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. **Rev. Multiciencias**, **12(3)**, 245 – 253 (2012).

33. C Vieira, MC Codogno, F Maugeri Filho, R Maciel Filho, A Mariano. Sugarcane bagasse hydrolysates as feedstock to produce the isopropanol-butanol-ethanol fuel mixture: Effect of lactic acid derived from microbial contamination on *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. **Bioresource Technology**, **319**, 124140 (2020).
34. MJ Mantilla Torres. Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y paja de trigo con una posterior fermentación alcohólica para obtención de etanol. Tesis de grado mención en Ingeniero Químico. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador (2012).
35. C Cabrera Ayala, C Novoa Izaguirre. Influencia de la concentración y temperatura de fermentación de azúcares reductores obtenidos a partir de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, en la obtención de un biopolímero empleando *Bacillus subtilis*. **Agroindustrial Science**, **6**, 17-28 (2016).
36. Alokika, Anu, A Kumar, V Kumar, B Singh. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological Macromolecule**, **169**, 564-582s (2020).
37. S Saavedra, L Alejandro-Paredes, JC Flores-Santos, C Flores-Fernández, H Arellano-García, AI Zavaleta-Pesantes. Optimización de la producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* cepa Hui1 en un medio que contiene melaza de caña, **Agronomía Colombiana**, **39(1)**, 98-107 (2021).
38. A Djukić-Vuković, D Mladenović, J Ivanovic, J Pejin, L Mojović. Towards sustainability of lactic acid and poly-lactic acid polymers production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **108**, 238-252 (2019).
39. AH Jawad, AF Alkarkhi, OC Jason, AM Easa, N Nik Norulaini. Production of the lactic acid from mango peel waste - Factorial experiment. **Journal of King Saud University - Science**, **25(1)**, 39-45 (2013).
40. AC Soto Montes. Evaluación de la producción de ácido láctico empleando residuo de mora y suero de leche en sistema de lote. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia (2015).
41. MC Rodríguez Rojas, R Morales Rodríguez, D Rodríguez Gómez. Producción de ácido láctico a partir de bagazo de caña de azúcar residual de la industria azucarera. **Verano de la Investigación Científica**, **2(1)**, 1594-1597 (2016).
42. A Schmatz, J Candido, J., D de Franceschi de Angelis, M Brienzo. Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation Improved by Lignin and Extractives Removal from Sugarcane Bagasse. **Fermentation**, **9(5)**, 405 (2023).
43. FL Vaz, J da Rocha Lins, BR Alves Alencar, ÍB Silva de Abreu, E Espinosa Vidal, E Ribeiro, EV de Sá Barretto Sampaio, RSC Menezes, ED Dutra. Chemical pretreatment of sugarcane bagasse with liquid fraction recycling. **Renewable Energy**, **174**, 666-673 (2021).
44. M Abdel-Rahman, S Hassan, A Fouda, A Radwan, MG Barghoth, SG Desouky. Evaluating the Effect of Ligno-cellulose-Derived Microbial Inhibitors on the Growth and Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans* Azu-10. **Fermentation**, **7(1)**, 17 (2021).
45. S Huang, Y Xue, B Yu, L Wang, C Zhou, Y Ma. A Review of the Recent Developments in the Bioproduction of Polylactic Acid and Its Precursors Optically Pure Lactic Acids. **Molecules**, **26(21)**, 6446 (2021).

Desarrollo y validación de un método acoplado Análisis en flujo/Espectroscopía UV-visible para la cuantificación de maleato de enalapril

Carlos Ayala*, Eylhen's Rangel, Maribel Valero**, Baldeón Antonella,
Fernando Méndez, Luisana Miliani, Máximo Gallignani, Rosario Brunetto

Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad de Los Andes, La Hechicera, Mérida, 5101, Venezuela

(* carlosdaniel55@gmail.com (** maribelvalero46@gmail.com)

Recibido: 07/03/2024

Revisado: 25/03/2024

Aceptado: 29/04/2024

Resumen

El método acoplado de Análisis en Flujo con Espectroscopia de Absorción Molecular para la determinación de uniformidad de contenido de maleato de enalapril (antihipertensivo) en productos farmacéuticos, fue desarrollado basándose en una reacción con Permanganato de potasio en medio ácido. El criterio de medida seleccionado fue la lectura de absorbancia a 525 nm corregida mediante una línea base establecida entre 439 nm y 700 nm. El método permite determinar el en el intervalo de 14 y 50 mg L⁻¹, con un límite de detección de 4,00 mg L⁻¹. La metodología planteada ofrece múltiples ventajas buena precisión, repetitividad, exactitud y rapidez de análisis.

Palabras claves: enalapril; formas farmacéuticas sólidas; análisis en flujo; Espectroscopia UV

Abstract

Development and validation of a coupled Flow analysis/UV-visible spectroscopy method for the quantification of enalapril maleate. Coupled method of Flow Analysis with Molecular Absorption Spectroscopy for the determination of content uniformity of enalapril maleate (antihypertensive) in pharmaceutical products, was developed based on a reaction with potassium permanganate in an acidic medium. The measurement criterion selected was the absorbance reading at 525 nm corrected by a baseline established between 439 nm and 700 nm. The method allows enalapril maleate to be determined in the range of 14 and 50 mg L⁻¹, with a detection limit of 4.00 mg L⁻¹. The proposed methodology offers multiple advantages: good precision, repeatability, accuracy, and speed of analysis.

Keywords: Enalapril; Solid dosage forms; Flow analysis, UV spectroscopy

Introducción

El maleato de enalapril (ENM) es un medicamento que pertenece al grupo de los llamados inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) la cual cataliza la conversión de la angiotensina I a la sustancia hipertensora angiotensina II. Este fármaco es muy utilizado en el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, así como en la reducción de la incidencia de eventos isquémicos coronarios, incluido el infarto de miocardio¹.

El principio activo del ENM (figura 1), cuyo nombre IUPAC es (Z)-2-Butenodiato de (S)-1-[N-[1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]-L-alanil]-L-prolina y formula molecular C₂₀H₂₅N₂O₅•CH₄O₄, es una sal del enalapril, el cual es un derivado de los aminoácidos L-alanina y L-prolina con un peso molecular de 492,5 g/mol².

Las industrias farmacéuticas utilizan métodos establecidos en las diferentes farmacopeas para el control de calidad de principios activos farmacéuticos para su comercialización. En el caso

de la uniformidad de contenido del ENM, se utiliza un método oficial basado en el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección de ultravioleta^{4,5}. Estas propuestas, suelen presentar ciertas desventajas y condiciones, que se relacionan de forma directa con las limitaciones de las técnicas de detección y otras con el diseño metodológico o el procedimiento que plantean. Por ello, es común observar desarrollos metodológicos que pueden ser considerados como largos y monótonos, con muchas etapas en el procedimiento requerido, lo que ha conducido al desarrollo de nuevas filosofías de trabajo para la determinación de ENM que utilicen diversas técnicas instrumentales.

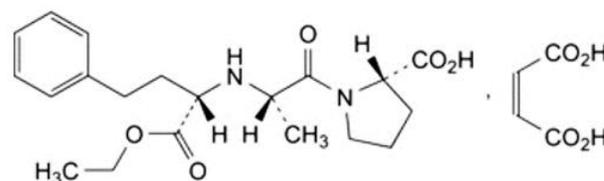


Fig. 1: Estructura molecular del maleato de enalapril³.

En la literatura especializada es posible encontrar diversos métodos de análisis para la cuantificación de ENM en formas farmacéuticas sólidas que involucran, el uso de la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas⁶, ultravioleta⁷, resonancia magnética nuclear⁸ y espectroscopia infrarroja¹. Estas propuestas resultan costosas en instrumentación como para ser utilizadas en el análisis de rutina del control de calidad del fármaco.

Otros métodos más accesibles incluyen métodos de titulación y espectrofotométricos. Al respecto, Vinay y colab.⁹ plantearon dos métodos por titulación (A y B) y dos métodos espectrofotométricos (C y D) para la determinación de ENM en tabletas. El método A, involucra una oxidación directa ENM con permanganato de potasio en un medio ácido (H_2SO_4); el método B conlleva una titulación donde el principio activo farmacéutico se oxida con un exceso de permanganato de potasio conocido, seguido por una determinación del permanganato sin reaccionar mediante valoración con sulfato de amonio ferroso. En ambos métodos, la relación estequiométrica ENM: $KMnO_4$ fue de 1:2. En espectrofotometría, el ENM fue cuantificado a partir de la reducción del permanganato de potasio en medio neutro, midiendo el máximo de absorbancia en 340 nm (método C) y en medio ácido monitoreando la absorbancia a 550 nm (método D). Estos métodos se caracterizan por una alta precisión y exactitud y se pueden adoptar en laboratorios de control de calidad para análisis de rutina.

Por su parte El Sheikh y colab.¹⁰ validaron un método espectrofotométrico para la determinación de ENM en formas puras y de dosificación. Se basa en la formación de complejos de pares de electrones de color amarillo entre el analito y dos colorantes de ácido sulfonftaleína, el púrpura de bromocresol (BCP) y el azul de bromofenol (BPB); observando valores óptimos de absorbancia en una solución buffer NaOAc-HCl de pH 2,8 y 3,0 respectivamente, con un volumen de 2,0 mL del mismo. Así mismo, también se demostró que un exceso de reactivo (colorante) resulta ser indiferente para la cuantificación ya que la reacción misma proporciona un máximo de absorbancia entre el ENM y el colorante para luego comenzar a descender de manera constante.

Posteriormente, Neelkant Prasad, y colab.¹¹ describieron un método espectrofotométrico para la cuantificación de ENM en dosificaciones, mediante su oxidación con permanganato de potasio en medio de ácido sulfúrico. Para ello, prepararon seis soluciones con alícuotas de las muestras con concentraciones entre 350 y 500 $\mu g L^{-1}$. A cada alícuota le agregaron 1 mL de permanganato de potasio al 0,5%, una cantidad de ácido sulfúrico concentrado y enrasaron con agua. La reacción completa se llevó a cabo en un tiempo de 10 min. La curva fue preparada con patrones certificados y presentó un intervalo de linealidad desde 250 a 500 $\mu g. mL^{-1}$. Al ser analizadas las muestras lograron apreciar que presentaron un pico intenso a 267 nm el cual se consideró como λ_{max} para construir la curva de calibración. La misma presentó un coeficiente de correlación $r^2=0,9990$, $SD= 1,33 \times 10^{-3}$, $LOD= 2,19 \mu g mL^{-1}$, $LOQ = 6,65 \mu g mL^{-1}$ y

respecto a las muestras se obtuvieron porcentajes de recuperación de $100,01 \% \pm 0,63 \% - 101,16 \% \pm 0,68 \%$.

De lo anterior, el analito bajo estudio ha sido cuantificado utilizando técnicas como: titulación, formación de complejos, determinación directa, extracción sólido - líquido, etc., potenciando a la espectroscopia UV-Visible como forma de detección. Sin embargo, estos métodos manuales suelen requerir de largos periodos de tiempos para que las reacciones sean completas, haciendo que la baja frecuencia de análisis sea una limitante para el uso de estos métodos en análisis de rutina. Por ello, las propuestas metodológicas automatizadas representan una alternativa muy atractiva para el analista cuando se enfrenta diariamente a un elevado número de muestras.

La técnica de análisis en flujo (AF)¹² es una herramienta que permite la automatización de los métodos químicos analíticos desarrollados manualmente y ha sido extensamente utilizada acoplada a diversos detectores, particularmente a un espectrofotómetro de absorción molecular en el UV/Vis. Hasta ahora esta articulación sigue siendo la más versátil y popular; y podría considerarse como uno de las de mayor importancia debido a la gran cantidad de especies capaces de absorber radiación en esta región. Entre las ventajas más sobresalientes de los sistemas AF se pueden mencionar su sencilla configuración, versatilidad y fácil operación. Al mismo tiempo, estos sistemas proporcionan una mayor reproducibilidad, incremento en la velocidad de análisis y reducción en el consumo de reactivos, junto con la disponibilidad instrumental y las ventajas económicas que aporta su incorporación a los laboratorios de investigación e industriales.

En conocimiento de los autores - hasta el momento - no se ha descrito un método automatizado para la determinación de ENM en productos farmacéuticos vía acoplamiento de la técnica análisis en flujo (AF- EAM-UV-Visible). Por lo anterior, el principal objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología simple para la determinación de ENM en formas farmacéuticas sólidas comercializadas en la ciudad de Mérida-Venezuela. El método propuesto se fundamenta en la reacción de oxido-reducción en medio ácido entre el permanganato de potasio y el enalapril (figura 2) en un sistema de flujo continuo. El fármaco reduce la señal de absorción del agente oxidante con el incremento de su concentración.

La necesidad de la propuesta nace a raíz de una problemática que afecta al sector farmacéutico en Venezuela y que se viene presentando con la crisis económica prolongada que vive el país. Este sector se ha visto afectado en lo que respecta a: la escasez y el alto costo de materia prima para la producción de

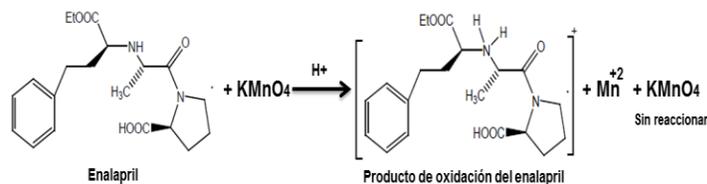


Fig. 2: Reacción química entre el ENM y el permanganato de potasio⁷.

fármacos por parte de los laboratorios nacionales y ausencia de productos farmacéuticos de marcas tradicionales y reconocidas a nivel mundial para el tratamiento de distintas enfermedades. Esto, ha conllevado a que en el mercado local (estado Mérida) se encuentren tanto en farmacias, como centros médicos, y ONG's; medicamentos de distintas marcas y procedencias sin la seguridad de saber si han sido sometidos a los distintos controles de calidad para ingresar al país. Es por esto, que el planteamiento de nuevas técnicas automatizadas de bajo costo en instrumentación y consumo de reactivos (muestras) y de fácil operación para la mejora del control de calidad del producto farmacéutico terminado, representa un tema de gran interés y relevancia para la investigación y desarrollo en la industria farmacéutica nacional, particularmente en tiempos de crisis.

Parte experimental

Equipos y accesorios

Las medidas de absorbancias fueron realizadas en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular, de la Facultad de Ciencias, con un espectrofotómetro de absorción de radiación Ultravioleta/Visible, *Thermo Scientific*, Modelo Evolution 300, provisto una lámpara de xenón y un ancho de banda variable, monocromador modificado Ebert y detector dual de fotodiodos de silicio. El instrumento se controla a través del software "VISION-Pro". Adicionalmente, se utilizó una celda de flujo UV/Vis Perkin Elmer, Qz, B063-1150, 10mm, 300 μ L capacidad, bombas peristálticas programables Ismatec IPC de 4 canales, una balanza analítica electrónica, *A & D Company*, Modelo ER-180A, material de vidrio tipo A y misceláneos varios.

Para la validación y contraste del método propuesto se utilizó un (FT-IR), Perkin Elmer, modelo Spectrum 400 (Nolwack, CT, USA) controlado por un Software Spectrum v6.3.4

Reactivos, solventes y muestras

Todos los reactivos que se utilizaron en la realización del presente trabajo fueron de grado analítico. Todas las soluciones patrón, fueron preparadas a partir de un patrón de maleato de enalapril adquirido de la casa comercial Chemo (99%). Las diversas soluciones de trabajo se prepararon con agua de alta pureza de 18 Ω ohm cm^{-1} de resistividad, suministrada por un sistema Milli-Q-TOC de Millipore. El permanganato de potasio fue proporcionado por Merck (99%), ácido sulfúrico J.T. Baker, (99,08%).

Las siete (07) muestras comerciales (1 muestras de 5 mg, 2 muestras de 10 mg y 4 muestras de 20 mg)) disponibles en la fecha del desarrollo de la metodología, del medicamento utilizadas en la presente investigación, fueron adquiridas en diferentes farmacias de la ciudad de Mérida.

Preparación de la solución de la muestra.

Con la finalidad de obtener una muestra representativa, se tomaron de forma aleatoria 10 tabletas del producto farma-

céutico, y se pesó cada una, obteniéndose así su peso promedio (\bar{x}) que para las presentaciones farmacéuticas utilizadas. Se trituran y se pulveriza hasta obtener un fino polvo homogéneo y representativo de la muestra. A continuación, por triplicado se pesan de este polvo cantidades equivalentes a la mitad del peso promedio de una tableta transfiriéndolo a balones aforados con tapa con la ayuda de agua, procurando que se encuentren en una concentración de 100 mg L^{-1} . Una vez disuelto el polvo y diluido con agua se lleva antes de aforar al ultrasonido por un tiempo de 25 minutos a una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se lleva a temperatura ambiente. Luego de esto se realiza el filtrado para separar los excipientes insolubles y así poder continuar con el enrasado adecuado con el medio de disolución acuoso. Finalmente se realizan las diluciones correspondientes llevando las muestras a una concentración aproximada a 30 mg L^{-1} .

Curva de calibración y soluciones de reactivos

La solución madre de maleato de enalapril fue preparada diariamente en medio acuoso a una concentración de 100 mg L^{-1} . A partir de esta solución se tomaron alícuotas para preparar 5 soluciones de concentración 14, 20, 30 40 y 50 mg L^{-1} y diluyendo luego con agua hasta el volumen final. Se preparó una solución de permanganato de potasio en una concentración de $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} .

Procedimiento general.

La figura 3, muestra el diagrama esquemático del montaje AFC-EAM-UV-Visible propuesto en este trabajo para la determinación de ENM en muestras farmacéutica. Consta de una bomba peristáltica de cuatro canales que propulsan la solución de permanganato de potasio, ácido sulfúrico y muestra (o estándares) a través de una tubería de Tygon; un serpentín de reacción y una celda de flujo de 1 cm de paso óptico y 300 μL de capacidad alineada al camino óptico del espectrofotómetro. Los reactivos y muestras se introducen en el sistema a través de sus respectivos canales, a temperatura ambiente, bajo las condiciones experimentales que se indican en la tabla 1. La bomba peristáltica permanece encendida durante todo el análisis propulsando un flujo continuo y constante.

El análisis involucra cuatro etapas: i) establecimiento de la señal de fondo, ii) introducción del agente oxidante, iii) introducción de estándares o muestras y iv) limpieza. La primera se

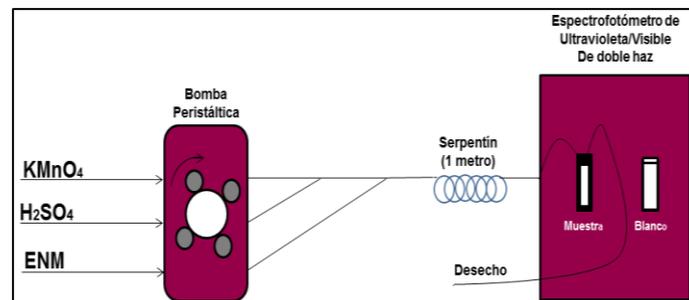


Fig. 3: Diagrama esquemático del montaje de Análisis en flujo continuo-UV/Vis utilizado para la determinación Enalapril.

realiza al iniciar cada sesión experimental de trabajo con el propósito de establecer la señal de fondo, es decir el “background” del sistema. Para ello, se coloca el ácido sulfúrico en su respectivo canal y agua destilada por los canales de la muestra y permanganato de potasio. Luego que se mezclen los tres canales en el serpentín de reacción, se realizan el espectro de absorción del blanco en forma continua entre 350 y 700 nm respectivamente, utilizando una velocidad de barrido de 960 nm min^{-1} .

En la segunda etapa, se introduce de manera continua el permanganato de potasio el cual se mezcla, con el ácido sulfúrico en el serpentín de reacción, manteniendo agua por el canal de introducción del ENM. Luego que se estabilice el flujo, se le da orden al sistema para que tome el espectro de absorción. La tercera etapa consiste en introducir la muestra (o estándar) para que se mezcle con el ácido y permanganato en el serpentín de reacción donde se produce la oxidación del enalapril según la siguiente reacción:

En este punto la mezcla resultante, que contiene el producto del ENM oxidado y el permanganato de potasio remanente, fluye a través de la celda de flujo. En ese momento se procede a realizar el espectro de absorción y cuantificando luego con la banda asociada al permanganato de potasio sin reaccionar, es decir, se evalúa la disminución de la señal analítica del agente oxidante (KMnO_4) con el aumento de la concentración del ENM. Antes de introducir al sistema una nueva muestra o estándar, se realiza una etapa de limpieza colocando agua por el canal de la muestra, evitando así efectos de memoria. Es importante destacar que la adquisición de los respectivos espectros en la modalidad continua se lleva a cabo realizando al menos tres barridos en de forma secuencial e independiente.

Optimización de parámetros. Con el objeto de obtener la máxima información requerida con el mínimo coste y la máxima eficiencia para la optimización de las variables que maximizan la variable respuesta (absorbancia), se utilizó un diseño experimental basado en un diseño compuesto central 2^5-1 + estrella. Dicho diseño consiste en un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales que permite monitorear un grupo de puntos axiales (denominados puntos de estrellas) que facilitan la determinación de la curvatura. La ventaja que presenta este tipo de diseño es que permite estudiar los diferentes parámetros alrededor de un valor central para cada parámetro, y valores con valores superiores o inferiores a este valor central, y son utilizados cuando se espera que la forma de variación del parámetro en estudio se base en una curvatura (es decir, un incremento de la señal analítica hasta alcanzar un máximo y posterior disminución). Adicionalmente, vale indicar que el uso de este tipo de diseños permite monitorear simultáneamente todos los parámetros del sistema propuesto mediante el uso del análisis multivariado. Luego, para la evaluación de los resultados se necesitan ciertos algoritmos que permitan descomponer toda la data y permiten ver los cambios que ocurren que resultan difíciles de observar a simple vista con los métodos convencionales (método univariado).

Con base en lo anterior, las variables seleccionadas para el estudio fueron: la concentración de permanganato de potasio, resolución, temperatura de extracción, concentración de ácido sulfúrico y tiempo de extracción. Estos parámetros se variaron a cinco niveles: la concentración molar de KMnO_4 se ajustó a $(4, 6, 8, 10, 12) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, la resolución 0.5, 1, 1.5, 2, 4 cm^{-1} , la temperatura en 0, 18, 25, 30, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, concentración de H_2SO_4 se fijó en 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mol. L^{-1} y el tiempo de extracción se ajustó a 10, 15, 25, 30 y 40 min. Para el diseño se utilizó el software *Statgraphics Centurion XVII*.

Resultados y discusión

Estudios preliminares

Espectros de absorción de los reactivos, muestra y criterio de medida. Las experiencias preliminares tendiente a la caracterización espectral de los diversos reactivos involucrados, así como el efecto del ENM sobre el agente oxidante (KMnO_4) en medio $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ (2:1), se llevaron a cabo fuera de línea y utilizando celdas estándar de cuarzo de 1cm de paso óptico y utilizando agua como referencia. Inicialmente, se estudió el espectro de absorción de la disolución $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ en proporción de 2:1 y de una solución de la muestra fortalecida con ENM. La figura 4(a-b), ilustra el comportamiento de absorción de estas soluciones donde se observa la ausencia de bandas en la región comprendida entre 300-750 nm respectivamente.

En el caso del permanganato de potasio, este ha sido utilizado como un agente oxidante fuerte en medio ácido y presenta una banda de absorción en este mismo intervalo (figura 4c) caracterizada por dos máximos bien definidos en 525 y 546 nm respectivamente. Las figuras 4(d-e), muestran el efecto que sufren las bandas del agente oxidante en medio ácido en presencia de una solución de la muestra (d) y una muestra enriquecida con 5 mg.L^{-1} de ENM (e). Este efecto se presenta por una depresión de la señal de absorbancia, especialmente en los dos máximos que es proporcional a la concentración del ENM.

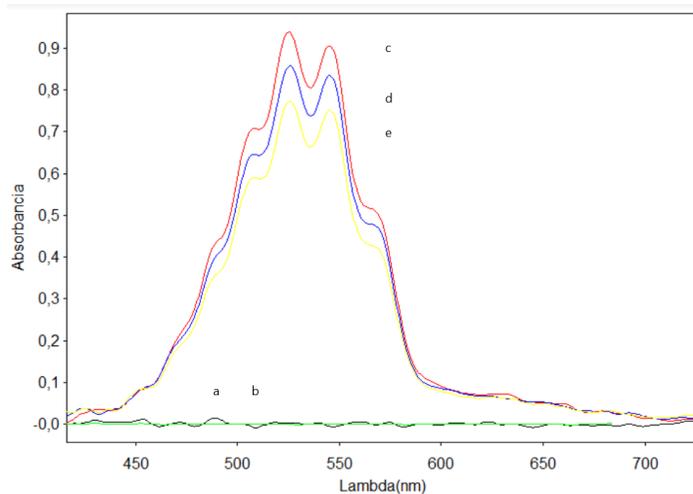


Fig. 4: Espectro de Absorción en el visible. a) $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ (2:1), b) Solución de la muestra fortalecida con 5 mg ENM L^{-1} , c: $([\text{KMnO}_4]=1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}, \text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ (2:1), d) solución c en presencia una muestra ENM enriquecida con 5 mg ENM L^{-1} .

A fin de seleccionar la banda analítica entre estas dos longitudes de onda y el criterio de medida, se prepararon diversas soluciones permanganato de potasio en medio ácido con concentraciones variables ENM (concentración final entre 0 y 20 mg. L⁻¹). Los mejores resultados en términos de menor desviación estándar y sensibilidad se obtuvieron tomando la medida de absorbancia a 525 nm corregida por una línea base establecida entre 439 nm y 700 nm y por sustracción de la señal del blanco en esta misma región espectral.

Optimización de los parámetros involucrados en la metodología propuesta. Se optimizaron diversos parámetros correspondientes al acoplamiento del sistema en flujo continuo (AFC) (concentración del ácido y del agente oxidante), a la etapa de tratamiento de la muestra (extracción sólida-líquido) (temperatura y tiempo de extracción y los parámetros espectroscópicos-instrumentales inherentes al sistema de detección (intervalo espectral de trabajo y resolución nominal). En lo que respecta a los primeros, algunos parámetros como los caudales de los diversos canales, así como la longitud y diámetro de los tubos de transferencia y del serpentín de reacción fueron establecidos sobre la base de experiencias previas desarrolladas en el laboratorio en el acoplamiento de sistemas en flujo con técnicas de detección atómicas previa a la generación de vapor frío del analito^{13,14} y moleculares (EAM UV/Vis y FTIR)^{14,15} (ver tabla 1).

En la tabla 1, se resumen las condiciones experimentales óptimas para el sistema de Análisis en flujo-espectroscopia UV-visible propuesto en este trabajo.

Las diversas combinaciones de los parámetros mencionados a los niveles indicados arrojaron una data con 28 experimentos en forma aleatoria, resultando en un número bajo de experiencias, para poder evaluar cinco parámetros, en cinco niveles.

Tabla1. Condiciones de operación del sistema en flujo propuesto.

Espectrofotómetro	
Parámetros	Valor seleccionado
Velocidad de barrido (nm min ⁻¹)	960
Resolución (cm ⁻¹)	1,5
Intervalo espectral (nm)	439 - 700
Criterio de medida	La absorbancia a 525 nm corregida por una línea base entre 439-700
Sistema de análisis en flujo continuo (AFC)	
Flujo del del KMnO ₄ (mL.min ⁻¹)	1
Flujo del ácido sulfúrico	1
Flujo de muestras (estándares)	1
Longitud y diámetro del serpentín de reacción	100 cm (0,8 mm d.i)
Concentración de KMnO ₄ (mol.L ⁻¹)	1,2.10 ⁻⁴
Concentración de H ₂ SO ₄ (mol.L ⁻¹)	1

Tabla 2. ANOVA: Análisis de varianza para absorbancia

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl*	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: [KMnO ₄]	1,36884x10 ⁻²	1	1,36884x10 ⁻²	46,42	0,0003
B: Resolución	2,59849x10 ⁻⁶	1	2,59849x10 ⁻⁶	0,01	0,9278
C: Temperatura	5,2414x10 ⁻⁵	1	5,2414x10 ⁻⁵	0,18	0,6859
D: [H ₂ SO ₄]	9,61959x 10 ⁻⁶	1	9,61959x10 ⁻⁶	0,03	0,8618
E: Tiempo de extracción	9,06364x10 ⁻⁶	1	9,06364x10 ⁻⁶	0,03	0,8658
AA	7,10248x10 ⁻³	1	7,10248x10 ⁻³	24,09	0,0017
AB	7,93469x10 ⁻⁵	1	7,93469x10 ⁻⁵	0,27	0,6199
AC	3,53975x10 ⁻⁴	1	3,5397x510 ⁻⁴	1,20	0,3095
AD	2,9154x10 ⁻⁶	1	2,9154x10 ⁻⁶	0,01	0,9236
AE	9,72784x10 ⁻⁵	1	9,72784x10 ⁻⁵	0,33	0,5837
BB	2,75371x10 ⁻⁵	1	2,75371x10 ⁻⁵	0,09	0,7688
BC	5,16584x10 ⁻⁵	1	5,16584x10 ⁻⁵	0,18	0,6881
BD	1,45772x10 ⁻⁴	1	1,45772x10 ⁻⁴	0,49	0,5047
BE	4,38989x10 ⁻⁵	1	4,38989x10 ⁻⁵	0,15	0,7111
CC	7,12134x10 ⁻⁷	1	7,12134x10 ⁻⁷	0,00	0,9622
CD	5,62151x10 ⁻⁴	1	5,62151x10 ⁻⁴	1,91	0,2098
CE	6,60284x10 ⁻⁷	1	6,60284x10 ⁻⁷	0,00	0,9636
DD	1,40067x10 ⁻³	1	1,40067x10 ⁻³	4,75	0,0657
DE	3,47095x10 ⁻⁴	1	3,47095.10 ⁻⁴	1,18	0,3139
EE	7,71585x10 ⁻¹³	1	7,71585x10 ⁻¹³	0,00	1,0000
Error total	2,06397x10 ⁻³	7	2,94853x10 ⁻⁴		
Total (corr.)	4,67278x10 ⁻¹	27			

*Gl: grados de libertad

Una vez realizados los distintos experimentos, utilizando una solución de muestra de maleato de enalapril $\approx 30 \text{ mg.L}^{-1}$, los resultados obtenidos (absorbancias) se evaluaron mediante un análisis de varianza (tabla 2). Este estudio descompone la variabilidad de absorbancia en fragmentos separados para cada uno de los efectos, entonces, prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este análisis se presentan 2 efectos que tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0% (filas resaltadas -en rojo- en la tabla 2). Adicionalmente, se puede inferir que solo un parámetro nos permite explicar el sistema (filas resaltadas -en azul- en la tabla 2) un 70,51 % de Razón-F, y como era de esperarse están relacionadas con la concentración del agente oxidante (KMnO_4), tanto en sus valores como la correlación que existe entre los niveles estudiados en este parámetro.

Asimismo, se puede observar en la figura 5 el diagrama de Pareto que permite estudiar la variación y correlaciones entre los parámetros en forma gráfica, que efectivamente la concentración del agente oxidante y la correlación entre los valores seleccionados para este parámetro, son los efectos que gobiernan el sistema, ya que ellos son los que superan el límite de tolerancia (línea azul en el diagrama) con un 95 % de confianza*. Adicionalmente, de la figura, se puede deducir que no existe correlación entre los demás parámetros, ya que se encuentran por debajo del valor del efecto estandarizado permitido. Esto también se puede corroborar en el ANOVA, donde se observa que los valores de P son mayores a 0,05 para estas evaluaciones.

Finalmente, en la tabla 3, se reportan los valores considerados óptimos por el diseño seleccionado para llevar a cabo el análisis propuesto.

Validación del método

Una vez identificados todos los parámetros que influyen en la reacción llevada a cabo, así como las posibles mejoras a la señal espectral por medio de la optimización, se procede a establecer las figuras de mérito del método, estudios de interferencia, así como los correspondientes estudios de precisión y exactitud.

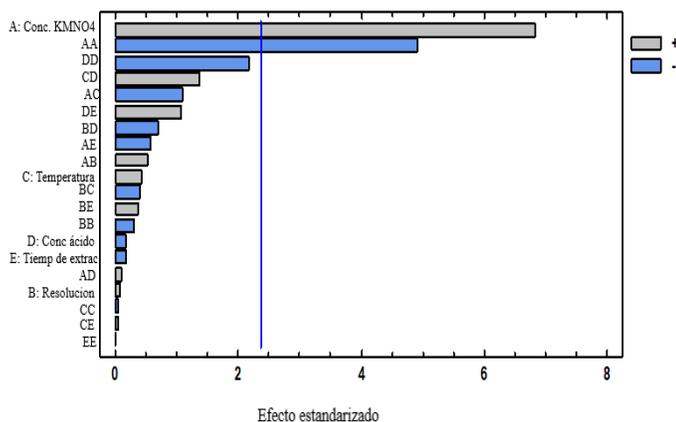


Fig. 5. Diagrama de Pareto estandarizado para absorbancia. La línea vertical indica el nivel de confianza de 95% ($p=0,05$).

Tabla 3. Factores establecidos y óptimos arrojados por el diseño compuesto central 2^5-1 + estrella

Factor	Valor establecido
$[\text{KMnO}_4]$ mol. L^{-1}	$1,2 \times 10^{-4}$
Resolución (cm^{-1})	1,5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30,0
$[\text{H}_2\text{SO}_4]$ mol. L^{-1}	1,0
Tiempo de extracción (min)	24,98

Características analíticas del método propuesto (figuras de mérito). Bajo las condiciones experimentales que se indican en las tablas 1 y 3 se caracterizó analíticamente el sistema en términos de respuesta lineal (hasta 80 mg L^{-1}), sensibilidad analítica, límite de detección y cuantificación. La curva de calibración se obtuvo preparando estándares de maleato de enalapril en concentraciones entre 14 y 50 mg L^{-1} . La curva incluyó una serie de cinco soluciones y el blanco y se midieron al menos tres veces cada una. En la figura 6, se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla (CCS), a partir de la cual se estableció la ecuación de la recta ($Y=-0,0029X + 0,9142$), la sensibilidad ($m = -0.0029$) y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9998$). El límite de detección (LOD) definido como la concentración del analito cuya señal instrumental corresponde a tres veces la desviación estándar del blanco ($3\text{sd}/m$) fue de 4 mgL^{-1} y de cuantificación (LOQ) definido como la concentración del analito cuya señal instrumental corresponde a diez veces la desviación estándar del blanco ($10 \text{ sd}/m$) fue de $13,36 \text{ mg L}^{-1}$.

Estudios de efectos interferentes. Con el fin de evaluar la selectividad del método para medir exacta y específicamente la señal del analito en la matriz de la muestra sin interferencia por parte de impurezas, productos de degradación o excipientes que comúnmente se encuentran presentes en las formulaciones sólidas de este medicamento; se realizaron estudios de adición de estándar a un grupo de cinco muestras farmacéuticas de diferentes casas comerciales (muestras 1-5), en la modalidad clásica en la que se mantiene fija la cantidad de muestra, se varía la cantidad de estándar y se mantiene fijo el volumen total.

Una vez medidas las muestras, los resultados fueron graficados como se muestra en la figura 6a y para efectos del cálculo de la concentración del analito fue necesario normalizar las curvas que se obtiene experimentalmente que evidencia el desgaste de KMnO_4 para obtener una curva asociada al incremento de la concentración del ENM (figura 6b).

Posteriormente se llevó a cabo un estudio estadístico en el cual se compara la pendiente obtenida del método de calibrado sencillo (CCS) con las pendientes asociadas a cada muestra en las diferentes adiciones de estándar. Para ello se utilizaron las ecuaciones de las rectas de regresión obtenida por mínimos cuadrados que se muestra en la tabla 4. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 e indican que no existen diferencias significativas entre las pendientes (t -Student 95% $< 2,57$, $n=5$), lo

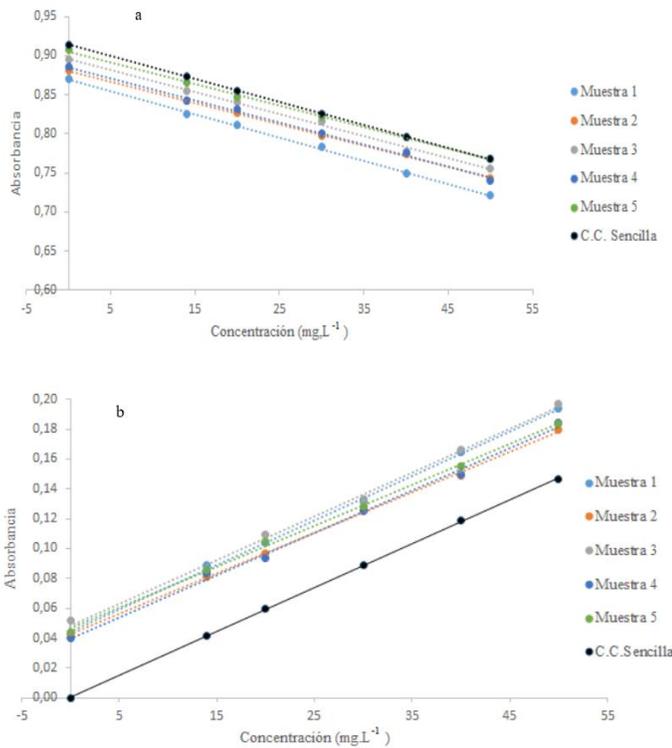


Fig. 6.a: CCS y CCAE directas para las cinco muestras seleccionadas obtenida por AF-EAM-UV-Visible, representando el desgaste del KMnO_4 con la concentración del ENM. **b:** CCS y CCAE inversas para las mismas muestras representando el incremento del ENM.

cual evidencia que los componentes de la matriz, así como el medio utilizado para la preparación de la solución de las muestras, no interfieren en la determinación del ENM en los comprimidos. En consecuencia, es posible la cuantificación del principio activo en el fármaco utilizando una curva de calibración sencilla construida utilizando soluciones del ENM preparadas en medio acuoso.

Tabla 4. Ecuaciones de las rectas de regresión de las figuras 6b

Muestra	Ecuación de la Recta	SD*	R ²
1	$Y=(0,0030 \pm 5.10^{-5})X + (0,0443 \pm 0,0014)$	0,0019	0,9991
2	$Y=(0,0027 \pm 4.10^{-5})X + (0,0424 \pm 0,0013)$	0,0019	0,9990
3	$Y=(0,0029 \pm 9.10^{-5})X + (0,0486 \pm 0,0028)$	0,0039	0,9960
4	$Y=(0,0028 \pm 7.10^{-5})X + (0,0400 \pm 0,0024)$	0,0034	0,9969
5	$Y=(0,0028 \pm 5.10^{-5})X + (0,0464 \pm 0,0016)$	0,0028	0,9984
C.C.S	$Y=(0,0029 \pm 2.10^{-5})X + (0,0003 \pm 0,0001)$	0,0018	0,9998

* SD: desviación estándar

Tabla 7. Comparación entre el método propuesto por UV/Visible y el método por FT-IR.

Muestra	Concentración nominal (mg)	Método de referencia FT-IR (mg)	Método propuesto AF-EAM-UV-visible (mg)	“t” crítico	“t” con un 95% de confianza
1	20	19,1	19,9		
4	20	18,8	19,1		
5	20	22,1	19,8	2,77	0,42
6	5	6,3	5,2		
7	10	9,6	10,5		

Tabla 5. Estudio comparativo de la pendiente de la CCS con las pendientes CCAE

Muestra	t (95% de confianza)	T crítico
1	0,02	2,57
2	0,04	2,57
3	0,00	2,57
4	0,03	2,57
5	0,02	2,57

Estudios de precisión. La precisión del método se evaluó a través de la desviación estándar relativa (RSD) realizando los respectivos estudios de repetibilidad (triplicado) con soluciones de muestras y soluciones de estándar con un contenido de ENM de 30 mg L^{-1} . Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que estuvieron en un intervalo entre 0,47 y 0,66 % respectivamente; valores que se encuentran en el intervalo $\pm 2 \%$ que se considera satisfactorio por la farmacopea Estadounidense⁴

Estudios de exactitud:

Estudios de recuperación. Para estimar la exactitud del método a través de estudio de recuperación se utilizaron el mismo grupo de soluciones que sirvieron para los estudios de adición de estándar. Los resultados obtenidos de este estudio se presentan en la tabla 6 donde se observa que los mismos varían entre 89,3 y 103,6 % respectivamente. Exceptuando el valor más bajo, el resto resulta satisfactorio ya que se encuentran dentro del rango de aceptación ($\pm 10\%$) definido por la farmacopea estadounidense para el análisis de la uniformidad de contenido⁴.

Tabla 6. Estudios de recuperación

Muestra	[Analito] mg L ⁻¹ medido	[Analito] mg L ⁻¹ conocido	% Recuperación
1	9,2	10,0	92,3
2	4,9	5,0	98,1
3	10,5	10,0	104,7
4	8,9	10,0	89,3
5	10,4	10,0	103,6

Comparación con un método de referencia validado. Esta sección de trabajo consistió en comparar a través de las diferentes herramientas estadísticas, los resultados de la cuantificación de ENM por el método propuesto con los obtenidos mediante el uso de un método validado basado en la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)¹⁶. Para ello se realizó un estudio de comparación de medias muestrales, mo-

nitoreando el estadístico “*t de Student*”, con un 95 % de confianza. Un total de cinco muestras fueron analizadas por ambos métodos y cada una fue medida tres veces. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Como el valor experimental del estadístico *t* con un 95 % de confianza es menor del valor “crítico, es posible inferir que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos¹⁷, lo que hace que esta nueva propuesta resulte atractiva para ser utilizada en el análisis de este tipo de fármacos.

Análisis de muestras

El método validado se aplicó satisfactoriamente para determinar el contenido de ENM en siete muestras farmacéuticas comercializadas en la ciudad y que declaran contener 5, 10 o 20 mg por cada comprimido. En la tabla 8, se puede observar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de un rango estrecho de la unidad declarada para cada una de las muestras y además se encuentran dentro de los valores aceptados por la farmacopea estadounidense $41 (\pm 10\%)^3$. Acompañando a los resultados de concentración del analito, en la tabla 8, se encuentra su respectivo error absoluto determinado por la propagación de los errores asociados al número de réplicas medidas por muestra ($n=3$, intercepto y pendiente de la estimación lineal).

Tabla 8. Análisis de muestras utilizando el protocolo de análisis.

Muestra	CD (mg)	CE (mg)
1	20,0	(19,9 ± 0,8)
2	10,0	(9,3 ± 0,6)
3	20,0	(20,9 ± 2,4)
4	20,0	(19,1 ± 1,4)
5	20,0	(19,8 ± 1,6)
6	5	(5,2 ± 0,5)
7	10	(10,5 ± 1,1)

*(CE ± error absoluto) para $n=3$

CD: Cantidad declarada (mg), CE: Cantidad encontrada por cada comprimido utilizando AFC-EAM-UV-Visible.

Conclusiones

□ Se desarrolló un método alternativo basado en el acoplamiento análisis en flujo continuo - espectrometría de absorción molecular UV/Vis, para la cuantificación de maleato de enalapril en fármacos antihipertensivos.

□ Mediante el uso del diseño experimental Compuesto central 25-1 + estrella, se logró la optimización simultánea de los parámetros que influyen en el desarrollo de la metodología propuesta para la determinación de este principio activo farmacéutico.

□ El sistema análisis en flujo continuo, permitió la introducción de reactivos patrones y muestras de forma automática, minimizando la manipulación de los mismos por parte del operador.

Esto trajo como consecuencia mejoras en la precisión y exactitud en comparación con los métodos manuales.

□ La metodología planteada ofrece una gran reducción del uso de reactivos orgánicos respecto a la técnica oficial de HPLC con detección de UV/Vis establecida por las farmacopeas internacionales.

□ El procedimiento propuesto permite la cuantificación de la uniformidad de contenido sin ser necesarios tratamientos previos engorrosos, la optimización de variables llevada a cabo proporciona las mejores condiciones posibles para la metodología y la extracción del principio activo de la muestra farmacéutica.

□ Los resultados obtenidos durante el análisis de muestras fueron precisos y exactos, demostrando que el método proporciona una alternativa innovadora para la cuantificación de la uniformidad de contenido del analito respecto a los métodos convencionales, comprobándose que éste puede ser utilizado de forma rutinaria en los análisis de control de calidad en la industria farmacéutica.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), Departamento de Química, Facultad de Ciencias (ULA-Mérida) por permitir el desarrollo de este proyecto.

Referencias

- SH Ahmadi, H Tavakoli, M Amirzadeh, MR Sangi. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and enalapril maleate in pharmaceutical formulations using Fourier transform infrared spectrometry. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **33(4)**, 59-68 (2014).
- AA Patchett, T Harris, EW Tristam, MJ Wyvratt, Wyvratt, MT Wu, D Taub *et al.* A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*, **288**, 280-283 (1980).
- R Toporišič, Amlakar, J Hvala, Prislán, L Zupančič-Kralj. Identification of new impurities of enalapril maleate on oxidation in the presence of magnesium monoperoxyphthalate. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **52(2)** (2010).
- The United States of Pharmaceutical Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 46- NF 41)*. Rockville, (2023).
- CE Daste. Control de Calidad en la Industria Farmacéutica (Bachelor's thesis). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Pontificia Universidad Católica del Ecuador (2015).
- S Lu, K Jiang, F Qin, X Lu, F Li. Simultaneous quantification of enalapril and enalaprilat in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **49(1)**, 163-167 (2009).
- L Logoyda, A Megied, Y Kondratova, O Trofimenko, D Korobko, I Dakhym. Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of enalapril maleate in

- present of their impurities: Application to tablet analysis. **Int. J. Appl. Pharm.**, **10**, 98-102 (2018).
8. A Zoppi, M Linares, M Longhi. Quantitative analysis of enalapril by ¹H NMR spectroscopy in tablets. **J. Pharm. Biomed. Analysis**, **37(3)**, 627-630 (2005).
 9. K Vinay, H Revanasiddappa, P Shantala, K Basavaiah. Simple and sensitive titrimetric and spectrophotometric determination of enalapril maleate in pharmaceuticals using permanganate. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, **5(2)**, 112-125 (2010).
 10. R El Sheikh, A Gouda, N Gouda. Validated spectrophotometric methods for determination of enalapril maleate in pure dosage forms. **Int. J. Pharm. Pharmaceutical Sci.**, **7(7)**, 190-197 (2015).
 11. N Prasad, R Kumar, V Kumar, R Roy. A simple UV Spectrophotometric method for Quantitative Estimation of Enalapril maleate. **Current Research in Pharmaceutical Sciences**, **6(1)**, 21-26 (2016).
 12. V Cerdà. Introducción a los métodos de análisis en flujo. Palma de Mallorca: SCIWARE, S.L. Departament de Química. Universitat de Illes Belears (2006).
 13. E Rothery. VGA-77 Vapor Generation Accessory. Operation Manual, Varian (1989).
 14. M Gallignani, M Valero, C Ayala, M Brunetto, A Sánchez, JL Burguera, M Burguera. Flow analysis-vapor generation-FTIR spectrometric determination of nitrite. **Talanta**, **64**, 1290-12980 (2004)
 15. M Gallignani, C Ayala, R Brunetto, JL Burguera, M Burguera. Flow analysis-hydride generation-Fourier transform infrared spectrometric determination of antimony in pharmaceuticals. **Talanta** **59**, 923-934 (2003).
 16. A Baldeón. Trabajo Especial de Grado. Desarrollo de una metodología para la cuantificación de Maleato de Enalapril en productos farmacéuticos antihipertensivos (tabletas y comprimidos) por Espectroscopia de Absorción Molecular en la región del infrarrojo. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (2023).
 17. JN Miller, JC Miller. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Cuarta ed. Madrid (España): Pearson Educación (2005).