

	TOMO LXXVIII	JULY - DECEMBER	AFINIDAD 2021
	AFINAE 78 (594)	p.174 - 254	
	ISSN 0001 - 9704 ISSN Electronic version 2339-9686		

AFINIDAD

594

*Journal of Chemical
Engineering, theoretical
and applied chemistry*

EDITED BY

AIQS
N.I.F. G-08392128
© AIQS, 2021

DIRECTOR

Joan O. Grimalt

EDITORIAL BOARD

Joan Genescá Llongueras
Antoni Ginebreda Martí
Raquel Otero Rodríguez
Laia Ros Blanco
Jordi Teixido Closa

**DRAFTING, ADMINISTRATION
AND ADVERTISING**

Vía Augusta, 380
08017 Barcelona
Tel. 93 267 20 12
Fax 93 280 42 76
afinidad@aiqs.eu
<http://www.aiqs.eu>

DESIGN AND PRINTING

TORMIQ, S.L.
Major de Sarrià 139
08017 Barcelona
Tel. 93 203 36 98
info@tormiq.com
www.tormiq.com

SP - ISSN 0001 - 9704
D.L.B. 460 - 1958

ISSN electronic version 2339-9686

PERIODICITY

3 issues per year

AFINIDAD

JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING,
THEORETICAL AND APPLIED CHEMISTRY
EDITED BY AIQS

Vía Augusta, 380
Tel. 93 267 20 12 - Fax 93 280 42 76
afinidad@aiqs.eu - www.aiqs.es
08017 Barcelona



SERVICIO DE DOCUMENTACION

Vía Augusta, 390 - 08017 Barcelona
Tel. 93 267 20 00 - Fax 93 205 62 66

BÚSQUEDAS BIBLIOGRÁFICAS RETROSPECTIVAS
DIFUSIÓN SELECTIVA DE LA INFORMACIÓN
SÍNTESIS BIBLIOGRÁFICAS
SUMINISTROS DE DOCUMENTOS ORIGINALES

SUMMARY

AFINIDAD 594

Physical-thermal characterization of the degradation process during the manufacturing of an LLDPE film to produce bags

by R. Ballestar de las Heras, C. Pradas Bello, P. Puig Bosch, F.J. Cañavate, and X. Colom

Caracterización físico-térmica del proceso de degradación durante la transformación de un film de LLDPE destinado a la fabricación de bolsas

Caracterització físic-tèrmica del procés de degradació durant la transformació d'un film de LLDPE per la fabricació de bosses

178

Influence of using socrative in high school to improve the teaching-learning process in chemical formulation and nomenclature

by J. Santos, and L.M. Almagro-Gávira

Influencia del uso de socrative en aulas de secundaria para mejorar el proceso de enseñanza-aprendizaje en formulación y nomenclatura química

Influència de l'ús de Socrative en aules de secundària per millorar el procés d'ensenyament-aprenentatge en formulació i nomenclatura química

185

Characterization and synthesis of polyaniline functionalized SBA-15 for adsorption of phenolic compounds from aqueous solution

by L.J. Cárdenas-Cuevas, L. Giraldo and J.C. Moreno-Piraján

Síntesis y caracterización de SBA-15 funcionalizada con polianilina para la adsorción de compuestos fenólicos desde solución acuosa

Síntesi i caracterització de SBA-15 funcionalitzada amb polianilina per l'adsorció de compostos fenòlics des solució aquosa

191

Use of Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay technique to monitor pesticide residues in horticultural crops

by E. López Dávila, Z. Gil Unday, O. Romero Romero, G. Du Laing, and P. Spanoghe

Uso de la técnica de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas para supervisar los residuos de plaguicidas en cultivos hortícolas

Ús de la tècnica d'Assaig Immunisorbent Lligat a Enzims per supervisar els residus de plaguicides en cultius hortícoles

199

Potential of *Agave cocui* vinasse as a crop for growth of *Saccharomyces cerevisiae*

by E.K. Chirinos León, O. Pérez Ones, G. Barreto Argilagos, P. Navas Yamarte and R. Sánchez Manzanares

Potencialidad de la vinaza de *agave cocui* como medio para el crecimiento de *saccharomyces cerevisiae*

Potencialitat de la vinassa d'Agave cocui com a medi per al creixement de Saccharomyces cerevisiae

210

Effect of imidazolium-based ionic liquids on the asphaltenes average size in crude oil and water-in-oil emulsions

by E.E. Banda-Cruz, A.R. Lara-Hernández, N.V. Gallardo-Rivas, U. Páramo-García, and R.D. Martínez-Orozco.

Efecto de los líquidos iónicos a base imidazol en el tamaño promedio de los agregados de asfaltenos en emulsiones de crudo y agua-crudo

Efecte dels líquids iònics a base d'imidazol en el volum mitjà dels agregats d'asfaltens en emulsions de cru i aigua-cru

219

Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Citrus sinensis*

by K.C. Córdova- Cisneros, A. Sáenz-Galindo, J. A. Ascacio-Valdés, F. Avalos, I. Moggio, and A. Castañeda-Facio

Síntesis de nanopartículas de plata mediante extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis*

Síntesi de nanopartícules de plata mitjançant extractes aquosos de Rosmarinus officinalis i Citrus sinensis

227

Theoretical Insight on Structural Activities and Targets of Kaempferol Glycosides

by K. Anbazhakan, R. Praveena, K.Sadasivam, G. Salgado, W. Cardona, L. Gerli, L. Alvarado-Soto, and R. Ramirez-Tagle

Perspectiva teórica sobre las actividades estructurales y los objetivos de los glucósidos de kaempferol

Perspectiva teòrica sobre les activitats estructurals i els objectius dels glucòsids de Kaempferol

236

Analysis of the capillary effect in the bio-resin infusion processes on natural fiber fabrics

by E.A. Franco-Urquiza, B. Vázquez, and C.A. Escalante-Velázquez

Análisis del efecto de capilaridad en el procesos de infusión de bio-resinas en tejidos de fibra natural

Anàlisi de l'efecte de capil·laritat al processos d'infusió de bio-resines en teixits de fibra natural

240

Evaluation of anthropogenic impacts in sediments from an aquaculture influenced area: the San Pedro river (Spain) by M. Peña-Icart, C. Mendiguchía, M. Villanueva Tagle, M.S. Pomares-Alfonso, C. Moreno

Evaluación del impacto antropogénico en sedimentos de una zona con influencia de acuicultura: Río San Pedro (España)

Avaluació de l'impacte antropogènic en sediments d'una zona amb influència d'aqüicultura: Riu Sant Pere (Espanya)

247

Caracterización físico-térmica del proceso de degradación durante la transformación de un film de LLDPE destinado a la fabricación de bolsas

R. Ballestar de las Heras^{1,3}, C. Pradas Bello¹, P. Puig Bosch², F.J. Cañavate³, X. Colom^{3*}

¹Research Department of Sphere Group Spain, Av. Miguel Servet s/n, Utebo (Zaragoza), 50180. ² Research Department of Dow Chemical Iberica, S.L. (Tarragona) Spain. Autovia Tarragona-Salou s/n Tarragona, 43006. ³Departamento de Ingeniería Química, Universitat Politècnica de Catalunya BarcelonaTECH. ESEIAAT, Colom 1, Terrassa, 08222

Physical-thermal characterization of the degradation process during the manufacturing of an LLDPE film to produce bags

Caracterització físic-tèrmica del procés de degradació durant la transformació d'un film de LLDPE per la fabricació de bosses

RECEIVED: 20 OCTOBER 2020; REVISED: 12 DECEMBER 2020; ACCEPTED: 18 DECEMBER 2020

SUMMARY

The aim of this study is to analyze the behavior of a commercial LLDPE, which is used to make bags, when submitted to a thermo-oxidative degradation process. The samples of LLDPE have undergone 10 cycles of degradation by means of a laboratory test which simulates the industrial process of bag manufacturing. A characterization by means of thermal analysis (DSC and TGA) and chromatography of exclusion of sizes (GPC) has been made. The thermo-oxidative degradation of the samples has been detected in two steps. In the first one, corresponding to the early transformation cycles there is practically no alteration of the molecular structure of the polymer, thanks to the action of antioxidants. In the second step, starting on the 3rd cycle, there is a rupture of polymeric chains and formation of crosslinking. The results show that the antioxidants prevent degradation in the initial stages of the process but this protection is lower in the subsequent cycles.

Keywords: thermo-oxidative degradation, LLDPE, Polyolefines, thermal analysis

RESUMEN

Con este estudio se pretende analizar el comportamiento que presenta un LLDPE comercial, que se utiliza para la fabricación de bolsas, frente al proceso de degradación termo-oxidativa que sufre cada vez que se somete a un ciclo de procesado. La muestra de LLDPE se ha sometido a 10 ciclos mediante un ensayo en laboratorio con el que se pretende simular un

proceso industrial, caracterizando las muestras mediante análisis térmico (DSC y TGA) y cromatografía de exclusión de tamaños (GPC). Se ha observado un comportamiento de degradación termo-oxidativa en dos fases, una primera durante los primeros ciclos de procesado en la que prácticamente no hay alteración de la estructura molecular del polímero gracias a la acción de los antioxidantes. Una segunda fase, a partir del 3º ciclo, en la que hay rotura de cadenas y formación de entrecruzamientos. Esto significa que en los primeros ciclos el polímero no sufre degradación, sino que se consumen los antioxidantes.

Palabras clave: degradación termooxidativa, LLDPE, poliolefinas, análisis térmico

RESUM

Amb aquest estudi es pretén analitzar el comportament que presenta un LLDPE comercial, que s'utilitza per la fabricació de bosses front el procés de degradació termo-oxidativa que pateix el material cada vegada que es sotmet a un cicle de processat. La mostra de LLDPE s'ha sotmès a 10 cicles mitjançant un assaig de laboratori amb el que es pretén simular un procés industrial de fabricació de bosses, caracteritzant els resultats mitjançant anàlisis tèrmica (DSC y TGA) i cromatografia d'exclusió de grandàries (GPC). S'ha observat un comportament de degradació termo-oxi-

*Corresponding author: xavier.colom@upc.edu

dativa en dues fases, una primera durant els primers cicles de transformació en els que pràcticament no hi ha alteració de l'estructura molecular del polímer, gràcies a la acció dels antioxidants. Una segona fase, a partir del 3er cicle, en la que hi ha ruptura de cadenes i formació d'entrecreuaments. Això significa que en los primers cicles el polímer no pateix degradació, degut a que els antioxidants actuen.

Paraules clau: degradació termooxidativa, LLDPE, poliolefines, anàlisi tèrmic

1.- INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el consumo de plástico ha aumentado exponencialmente a un ritmo de producción anual mundial estimado de casi 400 millones de toneladas ¹, por ello es necesario redefinir un nuevo modelo de sociedad que nos permita un método de desarrollo sostenible. El sistema socioeconómico actual se basa en un sistema de economía lineal, que se resume en fabricar, consumir y desechar, lo que implica una generación excesiva de residuos, gasto energético y una notable degradación del ecosistema ². La Unión Europea ha liderado la transición hacia la generación de recursos eficientes desarrollando lo que se denomina economía circular regenerativa. La cual no sólo pretende reducir el impacto negativo, sino generar impactos positivos y regenerativos hacia el ecosistema ³, presentando en 2019 una Directiva del Parlamento Europeo que se refiere a la reducción del impacto de determinados productos plásticos en el medio ambiente, promoviendo enfoques que dan prioridad a los productos y sistemas sostenibles de reutilización y no tóxicos, en lugar de productos de un solo uso, con el objetivo principal de reducir la cantidad de residuos generados ⁴.

Uno de estos enfoques consiste en el aumento del porcentaje de consumo de plástico reciclado, lo que impulsa a transformadores y recicladores a realizar un estudio más exhaustivo de las consecuencias que conlleva su uso. Sería de gran utilidad poder conocer y controlar cómo afectan los procesos térmicos y mecánicos de reciclado que implican una degradación del material, produciendo un cambio físico-químico, afectando a las propiedades físicas y mecánicas del film producido.

Las técnicas de análisis térmico (DSC y TGA) para la caracterización de procesos de degradación termo-oxidativa de distintos termoplásticos han sido utilizadas por distintos grupos de investigación. D'Amato et al. ⁵ han analizado la degradación mediante DSC de distintos polietilenos y han observado que el LLDPE es el más sensible a estos procesos termo-degradativos. Subhi et al. han utilizado TGA, DTGA, y DSC para estudiar el comportamiento de la degradación termo-oxidativa del PS analizando la evolución de la Energía de Activación (E_a) mediante el método propuesto por Coats-Redfern ⁶. Otros autores como Contat-Rodrigo ⁷ y Colom et. ⁸ han analizado el comportamiento del HDPE cargado con aditivos biodegradables o con celulosa y han observado que en ambos casos la presencia de estas cargas acelera

el proceso de degradación los análisis TGA muestran una mayor presencia de residuos sólidos.

Con este estudio se pretende analizar el comportamiento que presenta un LLDPE comercial, que se utiliza para la fabricación de bolsas, frente al proceso de degradación termo-oxidativa que sufre cada vez que se somete a un ciclo de procesado. El análisis de estos 11 (1+10) ciclos servirá de patrón para un estudio posterior y se podrá relacionar con la degradación que sufre en el proceso real de extrusión y reciclado. Esto se consigue mediante la realización de los mismos ensayos para el material que sale de la extrusora tras una única extrusión y así relacionar cuantos ciclos teóricos de laboratorio equivalen a un proceso de extrusión real.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

El material que se ha utilizado es un polietileno lineal de baja densidad LLDPE (Dow 2645.01G) suministrado por Dow Chemical Ibérica. Se trata de un material con una densidad de 0,921 g/cm³ y un MFI (190°C/2,16Kg) de 0,9 g/10min en el que están presentes diferentes antioxidantes, primarios, de la familia de los fenoles y secundarios compuestos principalmente por fosfitos que prolongan el tiempo de vida útil del material y evitan su degradación.

El LLDPE se ha sometido a diez ciclos de procesado en laboratorio, tratando de simular un conjunto de procesos de extrusión y reciclado consecutivos. En un proceso industrial, el material es extrusionado y los rechazos de producción reciclados. Este reciclado se vuelve a incorporar a un nuevo proceso de extrusión para volver a generar nuevas bolsas y así de forma sucesiva.

El procesado del polímero y las diferentes muestras se han realizado utilizando un plastómetro ATS FAAR TWEL VINDEX - IDM. Como temperatura de trabajo en el plastómetro se ha fijado 215° C ya que esta es la temperatura del polímero en la extrusión a escala industrial.

El LLDPE ha sido sometido a ciclos consecutivos de procesado en el plastómetro de tal manera que el material obtenido en el ciclo X-1 ha sido el material utilizado para el ciclo X así hasta un número de ciclos de 10.

El material resultante tras cada ciclo ha sido analizado según las técnicas analíticas que se describen a continuación y sus resultados son los que se exponen en los diferentes apartados de este artículo.

Para el procesado se introducen 4 g de material procedente del ciclo X-1 el horno del plastómetro, sometiéndolo a un empuje de 2,16 Kg, peso seleccionado en función la fluidez del material virgen 0,9 g/10 min.

Cada muestra se deja precalentando en el horno del plastómetro durante seis minutos con el objeto de que todo el material alcance la temperatura de ensayo.

Transcurridos los seis minutos de precalentado, el material que ha fluido por la boquilla del plastómetro se desecha. A partir de ahí se establece un tiempo de corte de un minuto durante los siguientes diez minutos generándose una muestra formada por diez ejemplares. Estos se dejan enfriar, se pesan y se recogen.



Figura 1.- Esquema del plastómetro.

La determinación del valor de **fluidez** se ha realizado en el plastómetro descrito anteriormente, a una temperatura de 215°C y un peso de 2,16 Kg.

Los valores de fluidez calculados mediante el pesaje de los ejemplares obtenidos y se expresan en g/10min. El resultado obtenido para cada muestra de la X_1 a X_{10} , es la media aritmética de los valores obtenidos de 10 ejemplares.

La determinación de la **densidad** se realiza sobre los ejemplares de cada muestra en un densímetro Alfa Mirage MD-300S por método de inmersión siguiendo la norma ISO 1183-1. La diferencia de pesaje fuera y dentro de agua destilada nos permite obtener el valor relativo de densidad como resultado del cociente entre la densidad del polímero y la de referencia, el agua destilada.

Los valores obtenidos de cada muestra X_1 a X_{10} , son la media aritmética de los valores obtenidos de 10 ejemplares de cada muestra.

La caracterización térmica se realiza mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (**DSC**) en un termo-analizador DSC 1 de Mettler Toledo. La versatilidad que aporta la técnica DSC, permite la realización de diferentes tipos de análisis facilitando el conocimiento del nivel de degradación del material sometido a los diferentes ciclos de procesado. Los parámetros térmicos que se han analizado son: temperatura de fusión, grado de cristalinidad, temperatura de descomposición y entalpía de inducción a la oxidación.

El análisis termogravimétrico (**TGA**) de las muestras LLDPE se ha llevado a cabo mediante un equipo TGA/SDTA850e Mettler Toledo. La muestra se ha calentado en un rango de temperatura de 30-600°C a 20 °C/min en atmósfera de aire, determinando la pérdida de masa en función de la temperatura.

El peso molecular del polímero se caracteriza por cromatografía de permeación en gel con triple detector infrarrojo a alta temperatura (PolymerChar 3D-HT-GPC-IR). Se utiliza 1,2,4 triclorobenceno como disolvente, a una velocidad de 1 mililitro/minuto a 145 °C

3.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.1.- Determinación de la fluidez a 215 °C.

Los valores de fluidez a 215°C, así como las barras de error para cada una de las muestras en función de cada uno de los ciclos de procesado se observan en la Figura 2.

Tal como se observa el valor de la fluidez del LLDPE muestra un grado de dispersión significativo. Esto se debe a que la estructura interna del material es muy aleatoria con una gran variabilidad en cuanto a ramificaciones y pesos moleculares. Tras el primer ciclo, las cadenas se reorganizan de manera que el material queda más homogéneo, con un grado de dispersión prácticamente nulo. Inicialmente la fluidez media de la muestra es de 1,2, y hasta el tercer ciclo de procesado, ésta se mantiene prácticamente constante con un valor de 1,3 g/10 min. Esto se debe a la presencia de antioxidantes, ya que durante estos primeros ciclos protegen al polímero de los mecanismos de degradación. Es a partir del cuarto ciclo cuando empieza a decrecer de forma significativa la fluidez hasta valores de 0,8 en el 8º ciclo y amortiguándose ligeramente hasta 0,6 en el 10º que equivale a un decrecimiento del 55%. Sin duda, este comportamiento reológico pone de manifiesto que el material se degrada y que estructuralmente sufre cambios significativos que se observan con este decrecimiento del 55%. Estos cambios en esta segunda fase del proceso de degradación termo-oxidativa son debidos a mecanismos de tipo Norrish I y II que comportan incremento de ramificaciones, rotura de cadenas y formación de entrecruzamientos ⁹⁻¹¹.

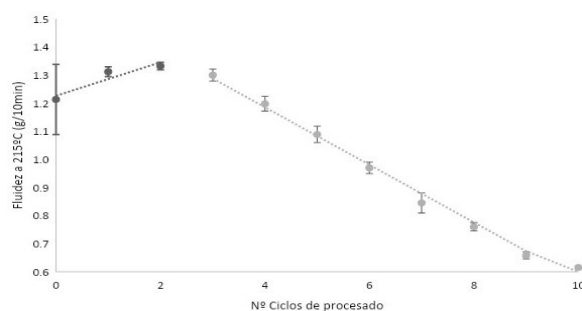


Figura 2. Representación gráfica de los resultados obtenidos de fluidez a 215°C en función de los ciclos de procesado.

3.2.- Densidad

Los valores de densidad obtenidos para cada uno de los ciclos de procesado realizados se muestran en la Figura 3.

Los datos muestran un ligero aumento de la densidad a medida que los ciclos de procesado se van acumulando. Estos valores se corresponden con los propios de la fluidez, a medida que se van degradando las muestras de LLDPE el grado de reticulación aumenta, con un incremento progresivo de la masa del polímero por unidad de volumen ¹². De manera similar a lo que ocurre con los valores de la fluidez, en los primeros ciclos hay una desviación de la tendencia, con un decrecimiento durante los primeros ciclos debido a la presencia de los antioxidantes y a partir del 3 ciclo presenta un crecimiento progresivo hasta el ciclo 10 debido a que empiezan a romperse y reticularse las cadenas.

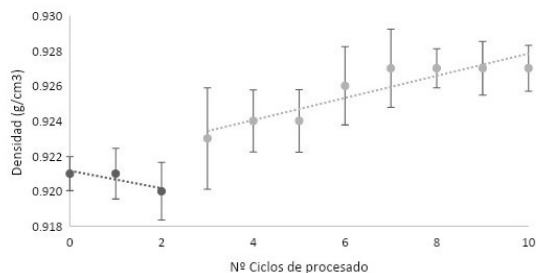


Figura 3. Representación gráfica de los resultados obtenidos de densidad en función de los ciclos de procesamiento.

Comparando la evolución del índice de fluidez y la densidad (Figura 2 y 3) se observa una correlación entre ambas, donde un decremento de la fluidez se corresponde con un aumento de la densidad. Se puede observar un primer grupo con valores de fluidez > 1 , donde hay una correlación más directa entre densidad y fluidez, donde las muestras con mayor fluidez son las que tienen una densidad más baja y un segundo grupo con fluidez < 1 que se corresponden con alta densidad (0,926). El aumento de la fluidez es debido a una mayor facilidad en el movimiento de las cadenas poliméricas, una menor compactación y menor densidad, lo que explica el comportamiento del primer grupo. El segundo grupo el aumento de la reticulación implica mayor compactación, aumento de la densidad y una disminución de la fluidez.

3.3.- Análisis Térmico de las muestras de LLDPE

Calorimetría diferencial de Barrido (DSC)

El ensayo se realiza en atmósfera de aire en presencia de oxígeno y el método consiste en un primer calentamiento para borrar la historia térmica de la muestra hasta 180°C , seguido de un enfriamiento lento con lo que la muestra vuelve a cristalizar, hasta 30°C . En el 2º calentamiento se determina la entalpía y temperatura de fusión, así como la temperatura de inducción a la descomposición térmica y la temperatura máxima de descomposición. Para todas las muestras analizadas se ha obtenido la T_p , T_c y se ha calculado el grado de cristalización de acuerdo con la siguiente ecuación (1):

$$X_{\text{cLLDPE}} = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_0} \cdot 100 \quad (1)$$

donde ΔH_m corresponde a la entalpía de fusión obtenida para cada muestra, ΔH_0 corresponde a la entalpía de fusión del LLDPE 100% cristalino con un valor de 293 J/g .¹³

Tras la segunda fusión, se observa una desviación de la línea base al producirse la transición entre el proceso endotérmico (fusión) y el exotérmico (degradación). El punto en el que se cortan las pendientes ambas curvas corresponde a la temperatura de inducción a la oxidación (T_{ox}), temperatura a la cual comienza el proceso de degradación del polímero debido a la rotura

de los enlaces covalentes, como se puede apreciar en la Figura 4 a.

También podemos apreciar el punto máximo de oxidación, que corresponde al punto de máxima entalpía una vez superada la T_{ox} (H_{max} , T_{max}), que permite el análisis comparativo en función del número de ciclos ya que constituye otro de los puntos de caracterización.

El método isotérmico de calorimetría diferencial de barrido (DSC) consiste en incrementar la temperatura con una velocidad constante de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar la temperatura de ensayo. Temperatura que se mantiene constante durante 2 h en presencia de oxígeno como se muestra en la Figura 4 b.

La energía de activación (E_a), energía mínima que es necesaria aportar al polímero para que comience el proceso de degradación termo-oxidativa, se obtiene a partir de la pendiente de la recta resultante de la representación del $\ln(t_{ind})$ frente a la inversa de la temperatura ($1/T$) según la ecuación (2) como muestra la figura 4 c.^{14,15}

$$t_{ind} = \tau e^{(-E_a/RT)} \rightarrow \ln(t_{ind}) = \ln(\tau) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

donde t_{ind} es el tiempo de inducción, tiempo en que el polímero tarda en oxidarse a una temperatura constante, τ es un parámetro que depende del orden de reacción y de la concentración de antioxidante que presente la muestra, (para las reacciones de 1º orden $\tau=1/A_0$, donde A_0 es una constante relaciona con la rotura efectiva de los enlaces de las macromoléculas), R es la constante universal de los gases ($8,315 \text{ J/K}$ es una constante relacionada de inducción).

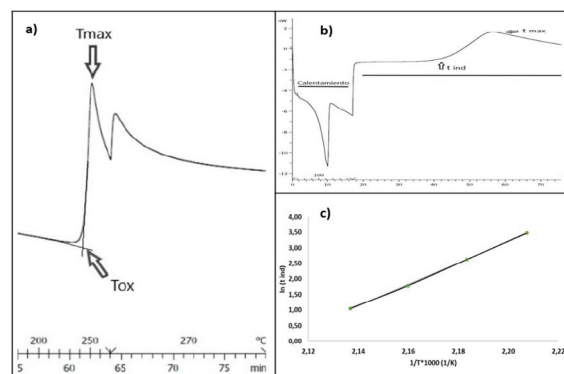


Figura 4. Estudio de oxidación: a) Método dinámico DSC, determinación de T_{ox} y T_{max} . b) Método isotérmico DSC, obtención de t_{ind} . c) Representación gráfica $\ln(t_{ind})$ frente a la inversa de la temperatura ($1/T$).

Nº Ciclo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E_a (KJ/mol)	233,7	271,1	285,8	215,9	194,6	286,9	165,3	235,4	230,7	192,7	150,3
$\ln(\tau)$	55,44	65,86	70,46	53,00	48,18	72,75	40,97	59,65	58,90	48,91	37,96

Tabla 1. Valores obtenidos de la energía de activación y el logaritmo neperiano τ para cada una de las muestras sometidas a distintos ciclos de degradación.

Se observa como el valor de la energía de activación sigue la misma tendencia observada anteriormente. La E_a aumenta y es elevada en los primeros ciclos debido a la presencia de los antioxidantes, pero a partir del tercer ciclo, presenta una tendencia decreciente, eso significa que las muestras necesitan un menor aporte de energía para comenzar a degradarse lo cual se debe a que las muestras están parcialmente degradadas en función de los ciclos a los que se han sometido, generando una ruptura de cadenas y formación de ramificación con un mayor número de puntos sensibles a la oxidación.

Tal como se observa en las figuras 5 y 6, las temperaturas de cristalización y fusión de las muestras en función del número de ciclos presentan valores muy parecidos. Es cierto que se observa una ligera tendencia creciente de la temperatura de fusión y cristalización. Esto es debido al incremento de radicales libres con formación de nuevas ramificaciones, rotura de cadenas y generación de entrecruzamientos que se han ido creando en la estructura del LLDPE a medida que se ha ido degradando.^{10,11}

Así mismo, los núcleos ramificados y los entrecruzamientos dentro de la propia estructura cristalina evitan la movilidad de las cadenas con lo que la T_f y también la T_c aumentan ligeramente.

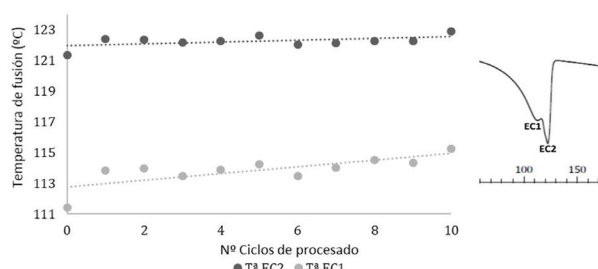


Figura 5. Evolución del doble pico de la temperatura de fusión (T_m) en función de los ciclos de degradación termo-oxidativa y gráfico DSC (2º calentamiento) donde se observa este doble pico de fusión del LLDPE.

Los materiales LLDPE, muestran un gráfico DSC característico, donde se observa un doblete en la zona de fusión, tal como muestra en la figura 5. Este doblete se corresponde con dos estructuras cristalinas parcialmente distintas.

La estructura tipo I (EC1), presenta un mayor número de ramificaciones en la cadena principal, que presenta una menor capacidad de formar enlaces intercadena y por ello la temperatura de fusión es menor, (T_{f1}) alrededor de 112°C, con una cristalinidad próxima al 22 %.

La estructura tipo II (EC2) presenta menos ramificaciones a lo largo de la cadena, lo que permite una mayor capacidad de interacción entre ellas y por ello presenta una temperatura más elevada (T_{f2}) de aproximadamente 122°C y con una cristalinidad del 11%, ya que se encuentra en una menor cantidad.

Pese a que las variaciones de la temperatura son muy pequeñas (Figura 5), se observa un mayor aumento de la temperatura de fusión de la estructura cristalina tipo

I (EC1), que en el caso de la estructura cristalina de tipo II (EC2). Esta diferencia que se observa (pendiente de 0,214 EC1 frente a 0,058 EC2) se debe a que la estructura de tipo I está más ramificada y presenta más carbonos activos formándose radicales, que permiten la reticulación de sus cadenas de forma más efectiva conforme aumenta la degradación de las muestras de LLDPE en función del número de ciclos. También se observa que los puntos de fusión de la muestra virgen presentan valores significativamente bajos si comparamos con los obtenidos para los primeros ciclos de degradación termo-oxidativa $\Delta T_{EC1} = 2,5$ y $\Delta T_{EC2} = 1^\circ\text{C}$ respectivamente. Este incremento es debido a que durante los primeros ciclos de procesamiento hay escisión de cadena con rotura de las ramificaciones, provocando una mayor capacidad de reorganización en la EC1 y un aumento ligero de la T_f .

La Figura 6 muestra la evolución de la temperatura de cristalización (T_c) que aumenta en función de los ciclos de degradación termo-oxidativa. Esto es debido a que, durante el proceso de cristalización, las macromoléculas que han adquirido movilidad debido a la temperatura van posicionándose según sus respectivas conformaciones cristalinas. La presencia de zonas con elevada densidad de entrecruzamiento restringe esta movilidad con lo que la T_c aumenta. Como en todos los análisis precedentes, también se observa que durante los primeros ciclos de procesamiento y debido al predominio de escisión, hay un ligero descenso de T_c . Fenómeno que se corresponde con las propiedades físicas comentadas previamente.¹⁶

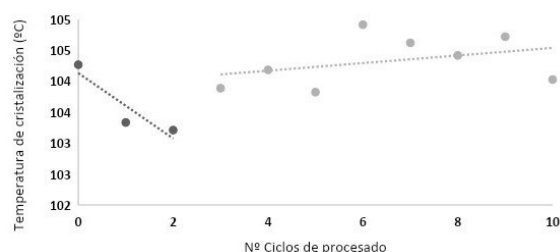


Figura 6. Evolución de la temperatura de cristalización (T_c) en función de los ciclos de degradación termo-oxidativa.

Analizando la entalpía global de cristalización se observa cómo ésta se mantiene estable durante los primeros ciclos (32,20 J/g) y empieza a decrecer a partir del 4º ciclo. Tal como se ha comentado anteriormente, se debe a la presencia de antioxidantes durante los primeros ciclos de degradación y a partir de aquí empieza el proceso de ramificación y entrecruzamiento, entre los cuales, una pequeña parte de la estructura cristalina pasa a formar parte de la parte amorfa del polietileno, disminuyendo así el porcentaje de cristalinidad total.

El porcentaje de cristalinidad X es directamente proporcional a la entalpía de fusión tal y como muestra la ecuación 1. Experimentalmente se determina que la entalpía asociada a la EC1 es mayor que la EC2 de ahí se concluye que X_{c1} es mayor que de X_{c2} .

La Tabla 2 muestra los valores de cristalinidad (%) parcial X_{c1} y X_{c2} y la cristalinidad total ($X_{c\text{ total}}$) obtenidos mediante la técnica de DSC. También se observa un decrecimiento mayor en la EC1 ($\Delta X_{c1} = 1,42\%$) más que en la EC2 ($\Delta X_{c2} = 0,28\%$), esto es debido al mismo razonamiento que se ha ido dilucidando durante toda la discusión de las propiedades térmicas, una estructura más ramificada se degrada más fácilmente, pasando a formar parte de la estructura amorfa, y en consecuencia su grado de cristalinidad disminuye con mayor facilidad.⁹

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X_{cEC1}	21,86	20,01	20,47	20,89	20,59	20,70	20,82	20,74	21,41	20,47	20,46
X_{cEC2}	10,45	11,43	11,31	11,00	11,00	10,67	10,55	10,62	10,79	10,34	10,17
X_{cTOT}	32,57	31,92	32,16	32,12	32,10	31,62	31,10	31,85	32,51	31,51	31,35

Tabla 2. Grado de cristalinidad de las dos estructuras cristalinas del LLDPE en función de los ciclos de procesado

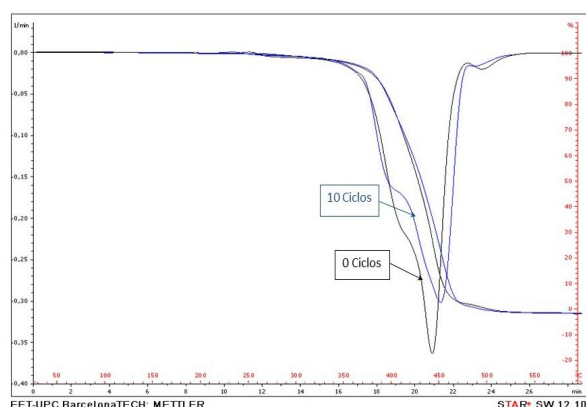


Figura 7.- Termogramas y curvas DTGA de las muestras de 0 y 10 Ciclos

La figura 7 muestra el termograma y el DTGA de las muestras Ciclo 0 (virgen) y Ciclo 10. Ambas presentan 2 temperaturas de descomposición térmica, una primera a 410°C y una segunda a 440-450°C, que se corresponden con los dos tipos de estructuras que se han observado previamente. Mientras que en los termogramas no se observa ninguna diferencia debido a la degradación termo-oxidativa generada por el número de ciclos a los que se ha sometido la muestra, las curvas DTGA sí que presentan diferencias, tanto a nivel de distribución de las estructuras como desplazamiento del pico de la 2ª descomposición térmica. La estructura que se ve más afectada es la dominante que corresponde a la 2ª descomposición térmica, esta se desplaza desde 440°C hasta 450°C. Por un lado, el proceso de degradación termo-oxidativa provoca rotura de cadenas y por otro aumenta los entrecruzamientos, el desplazamiento de la Tdt a temperaturas más altas nos indica que prevalece la formación de entrecruzamientos frente a la rotura de cadenas.

3.4.- Determinación de pesos moleculares mediante GPC

Mediante la cromatografía de permeación de gel (GPC), técnica que permite separar los polímeros en función de su tamaño se han obtenidos los resultados que se muestran en la tabla 4. Estos resultados ponen de manifiesto que el peso molecular promedio en número (M_n), que se corresponde con la cantidad de cadenas de un número de moléculas de LLDPE con una masa definida, se mantiene constante durante todo el proceso de degradación. Por el contrario, el peso molecular promedio en peso (M_w), y el peso molecular promedio en tamaño (M_z), que resulta de la distribución de los cuadrados de los pesos moleculares, sufren una disminución de los mismos en función de los ciclos de procesado. Así mismo, también se observa un decrecimiento del grado de dispersión del mismo. Estos resultados se corresponden con todo lo que se ha comentado referente al comportamiento térmico de este polímero. Durante los primeros ciclos la degradación termo-oxidativa es muy leve y prácticamente no modifica la estructura, pero a partir del 4º ciclo sí que la estructura del polímero se ve perturbada por el proceso de degradación que sufre.

	Mn	Mw	Mz	Mw/Mn
0	27,6	116,4	369,7	4,21
1	27,7	116,8	374,6	4,22
2	27,6	116,3	372,5	4,21
3	27,5	116,8	377,5	4,24
4	27,6	116,5	365,6	4,22
5	27,7	114,4	352,7	4,13
6	27,7	114,1	355,3	4,12
7	27,5	114,1	350,4	4,15
8	27,8	114,9	355,7	4,12
9	27,8	113,4	340,9	4,08
10	27,8	112,8	333,1	4,06

Tabla 3. Resultados de pesos moleculares mediante la técnica GPC (x1000)

El peso molecular promedio en peso (M_w) disminuye, lo que quiere decir que sus cadenas son más cortas, y por tanto se ha producido la escisión de las mismas.¹⁷

Este hecho genera un aumento en el peso molecular promedio en número (M_n), ya que se encuentra a pesos moleculares menores que el M_w , es decir, hay mayor número de moléculas con menor peso molecular.

Por otro lado, el índice de polidispersión (M_w/M_n), muestra la distribución de pesos moleculares mediante la relación en peso y número de las moléculas. Esta también disminuye, lo que indica que las moléculas tienden a ser más similares, con un peso molecular más parecido.¹⁸

4.- CONCLUSIONES

La caracterización físico-térmica de muestras de LLDPE sometidas a distintos ciclos de degradación termo-oxidativa pone de manifiesto una evolución en el proceso de degradación en dos fases diferenciadas.

Una primera fase que abarca los primeros ciclos donde se consumen los antioxidantes sin provocar degradación en el material, ya que prácticamente no modifican ni el grado de cristalinidad, ni el peso molecular medio en peso, ni el grado de dispersión.

Una segunda fase, a partir del 3^{er} ciclo donde la degradación se muestra de forma más significativa. La rotura de las cadenas se acentúa, lo cual se manifiesta en una disminución del grado de cristalinidad, del peso molecular y del grado de dispersión. Asimismo, también se forman algunos entrecruzamientos que afectan a la disminución del valor de fluidez y al aumento de la densidad. Este hecho se ve apoyado con el desplazamiento del pico de descomposición térmica, observado mediante TGA, de las muestras sometida a diez ciclos.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permitirán establecer un marco de referencia de tal manera que al tomar una muestra de polímero reciclado y analizarlo siguiendo las técnicas descritas, los resultados de dichos análisis nos mostrarán "el ciclo" al que pertenece permitiéndonos esta información optimizar su procesamiento y la calidad del producto final.

5.- BIBLIOGRAFÍA

1. World Economic Forum. The world's plastic problem in numbers. <https://www.weforum.org/agenda/2018/08/the-world-of-plastics-in-numbers>
2. Ellen MacArthur Foundation. Towards a Circular Economy -Economic and Business Rationale for an Accelerated Transition. Greener Manag Int 2012:97. <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/es/economia-circular/concepto>
3. Ecoembes. La economía circular en España. <https://www.ecoembes.com/es/ciudadanos/envases-y-proceso-reciclaje/la-economia-circular-en-espana>
4. European Commission. Communication from the commission to the European Parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions. Roadmap to a Resource Efficient Europe. Eur Comm 2019.
5. D'Amato, M.J. "Thermal Degradation Of High Molecular Weight Polyethylene To Obtain Low Molecular Weight Polyethylene Wax" Theses and dissertations. Paper 1310 (2012).
6. Al -Bayaty, S.A.; Jubier, N.J.; Al-Uqaily, R.A.H. "Study of Thermal Decomposition Behavior and Kinetics of Epoxy/Polystyrene Composites by using TGA and DSC" Journal of Xi'an University of Architecture & Technology (2020) 12(3):1331-1341.
7. Contat-Rodrigo, L; Ribes Greus, A. C. "Thermal Analysis of High-Density Polyethylene and Low-Density Polyethylene with Enhanced Biodegradability" Journal of Applied Polymer Science (2002), 86(3):764 -772.
8. Colom, X.; Cañavate, J.; Pages, P.; Saurina, J.; Carrasco, F. "Changes in Crystallinity of the HDPE Matrix in Composites with Cellulosic Fiber Using DSC and FTIR" Journal of Reinforced Plastics and Composites (2000); 19; 818-830.
9. Mendes, A.A.; Cunha, A.M.; Bernardo, C.A. "Study of degradation mechanisms of polyethylene during reprocessing". Polymer Degradation and Stability 96 (2011) 1125-1133)
10. Carrasco, F.; Pagés, P.; Saurina, J.; Colom, X. "Estudio mediante FTIR y DSC de los cambios de cristalinidad del HDPE inducidos por condiciones climáticas drásticas." AFINIDAD (1995) 52(458), 231.
11. Pagés, P.; Carrasco, F.; Saurina, J.; Colom, X. "FTIR and DSC Study of HDPE Structural Changes and Mechanical Properties Variation When Exposed to Weathering Aging During Canadian Winter." Journal of Applied Polymer Science, (1996) 60. 153-159.
12. Boldizar, A.; Jansson, A.; Gevert, T.; Möller, K. "Simulated recycling of post-consumre high density polyethylene material" Polymer Degradation and Stability. 68 (2000) 317-319.
13. Gedde, U.W.; Jansson, J.F. "Determination of thermal oxidation of high density polyethylene pipes were investigated by differential scanning calorimetry." Polymer testing 1 (1980) 303-312.
14. Focke, W. W.; Van der Westhuizen, I. "Oxidation induction time and oxidation onset temperature of polyethylene in air Testing Gimzewski's postulate." Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2010) 99(1):285-293
15. Bharel, R.; Anand, R. C.; Choudhary, V.; Varma, I. K. "Performance evaluation of antioxidants in polyethylene by DSC." Polymer Degradation and Stability 38 (1992) 107-112.
16. Seong Ok Han, Dong Won Lee, Oc Hee Han. "Thermal degradation of crosslinked high density polyethylene." Polymer Degradation and Stability (1999), 63, 237.
17. Mier, J.L.; Artiaga, R.; García, L. "Pesos moleculares. Conformación y configuración." Síntesis de polímeros. Universidad de A Coruña (1997) 11-48.
18. Novotný, Č.; Malachová, K.; Adamus, G.; Kwiecień, M.; Lotti, N.; Soccio, M.; Verney, V.; Fava, F. "Deterioration of irradiation/high-temperature pretreated, linear low-density polyethylene (LLDPE) by *Bacillus amyloliquefaciens*" International Biodegradation & Biodegradation 132 (2018) 259-267

Influencia del uso de socrative en aulas de secundaria para mejorar el proceso de enseñanza-aprendizaje en formulación y nomenclatura química

J. Santos^{1*}, L.M. Almagro-Gávira²

¹Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química. Universidad de Sevilla c/ P. García González, 1, E41012, Sevilla, España.

²Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED). C/Jericó, 10. Sevilla. 41007. España.

Influence of using socrative in high school to improve the teaching-learning process in chemical formulation and nomenclature

Influència de l'ús de Socrative en aules de secundària per millorar el procés d'ensenyament-aprenentatge en formulació i nomenclatura química

RECEIVED: 17 NOVEMBER 2020; REVISED: 6 DECEMBER 2020; ACCEPTED: 22 DECEMBER 2020

ABSTRACT

There is a clear student demotivation in sciences, especially in high school. Because of that, teachers use more and more Communication and Information Technologies. This work is based on evaluating if the use of a mobile application of questionnaires, which is called Socrative[®], improves the motivation and the results of chemical students. Different questionnaires have been carried out in two groups: Socrative group (group S) and control group. The latter followed a traditional methodology. The obtained results suggest that the students of group S learned more and faster to name and formulate chemical compounds. In addition, the potential application of this platform to set them some homework has been proved. Finally, the opinion of the students about the use of this technology was very positive.

Keywords: Socrative, Chemical formulation, Chemical nomenclature, Communication and Information Technologies, Teaching innovation.

RESUMEN

Existe en ciencias una clara desmotivación del alumnado, sobre todo en la enseñanza secundaria obligatoria. Debido a ello, los docentes utilizan cada vez más recursos TIC (Tecnologías de la Información y la Comunicación). Este trabajo de investigación se basa en evaluar si el uso de una aplicación móvil de cuestionarios (Socrative[®]) mejora la motivación y los resultados de los alumnos en Química. Para ello, se

llevaron a cabo diferentes cuestionarios en el grupo que usaba Socrative (grupo S) y el grupo de control (metodología tradicional). Los resultados obtenidos evidencian que los alumnos del grupo S aprendieron más y más rápido a nombrar y formular compuestos. Además, se ha demostrado la potencial aplicación de esta plataforma para mandar deberes a casa. Finalmente, la opinión del alumnado respecto al uso de este sistema en clase fue muy positiva.

Palabras clave: Socrative; Formulació química; Nomenclatura química, Tecnologías de la Información y Comunicación; Innovación docente.

RESUM

Existeix en ciències una clara desmotivació de l'alumnat, sobretot en l'ensenyament secundari obligatori. A causa d'això, els docents utilitzen cada vegada més recursos TIC (Tecnologies de la Informació i la Comunicació). Aquest treball de recerca es basa en avaluar si l'ús d'una aplicació mòbil de qüestionaris (Socrative[®]) millora la motivació i els resultats dels alumnes en Química. Per a això, es van dur a terme diferents qüestionaris en el grup que feia servir Socrative (grup S) i el grup de control (metodologia tradicional). Els resultats obtinguts evidencien que els alumnes del grup S van aprendre més i més ràpid a nomenar i formular compostos. A més, s'ha demostrat la potencial aplicació d'aquesta plataforma per enviar deures a casa.

*Corresponding author: jsantosgarcia@us.es

Finalment, l'opinió de l'alumnat respecte a l'ús d'aquest sistema a classe va ser molt positiva.

Paraules clau: Socrative; formulació química; nomenclatura química, tecnologies de la informació i comunicació; innovació docent.

INTRODUCCIÓN

La forma tradicional de enseñar ciencias es que los alumnos aprenden de los libros y de lecturas, se realizan actividades no interactivas y su motivación parece residir en aprobar exámenes. Esto provoca el principal problema asociado a las asignaturas de ciencias: la escasa motivación del alumnado. Los profesores de Física y Química corroboran que los estudiantes muestran un nulo o insuficiente interés hacia su asignatura; además de que el mayor fracaso escolar es mayor en esta materia en comparación con otras asignaturas. Además, esta indiferencia por las asignaturas relacionadas con la física y la química se ve agravada con los cursos académicos en la Educación Secundaria Obligatoria (ESO) española. Esto puede ser debido al aumento del nivel de complejidad de la Física y Química con los niveles de enseñanza. Esto parece provocar una situación sin solución aparente en la que los alumnos asisten a clase de Física y Química desmotivados, no prestan atención y, por lo tanto, no aprenden. Esto conlleva a que se aburran y aumente su fracaso escolar ¹.

Existen diferentes alternativas metodológicas como son el aprendizaje cooperativo, la Enseñanza de las Ciencias Basada en la Indagación, discusiones en grupo o el uso de las Tecnologías de la Información y Comunicación, para fomentar la participación activa y la motivación de los estudiantes. La motivación de los estudiantes es muy importante debido a su relación con el éxito escolar. Los logros estudiantiles con alta motivación son mayores que los que tienen una motivación media y así sucesivamente. Por lo tanto, es el deber del profesorado motivar a los estudiantes en la medida de sus posibilidades. Impartir contenidos usando alguna TIC puede crear un entorno de trabajo más motivador. Además, esto puede conllevar un ambiente activo de aprendizaje cuyo centro de aprendizaje sea el alumno ². Finalmente, existen diferentes formas de usar TICs en clases de química: por ejemplo, individuales, en grupo o usadas por el profesor.

El uso de TICs en aulas de química puede conllevar diversas ventajas como son ³:

- Desarrollo de la competencia digital
- Observar diferentes fenómenos y procesos, por ejemplo, con videos.
- Relacionar conocimientos teóricos con prácticos
- Conocer su propio aprendizaje

No obstante, el uso de TICs en aula siempre ha sido un tema controvertido. No hay dudas de que haciendo un buen uso de ellas, se puede aumentar la motivación y la interacción de los estudiantes en el aula ⁴. Por otro lado, hay detractores que sugieren que puede provo-

car que los profesores se centren más en el uso de la tecnología que en el proceso de enseñanza sobre la materia específica⁵.

El uso de las TICs en asignaturas en el campo de la química comenzó en los años setenta y ochenta ⁶, y es ahora un campo de constante crecimiento tanto para la enseñanza secundaria como para la enseñanza universitaria. Se ha comprobado que, por ejemplo, la realización de actividades online mediante una plataforma Moodle en la asignatura universitaria de Química Analítica mejoró la participación en el aula, reduciendo el cansancio y aumentando la predisposición al aprendizaje activo en clase ⁷. En el campo del estudio de la nomenclatura orgánica, un grupo de la Universidad de Ottawa (Canadá) diseñó una nueva plataforma online para ayudar al aprendizaje de sus alumnos, donde podían practicar muchos ejercicios de nombre-fórmula con retroalimentación instantánea. Además, esta plataforma gratuita y bilingüe daba ejemplos de compuestos relacionados con la vida cotidiana ⁸. Otros autores destacan que las tareas interactivas usando TICs en clases de química provocaron un aumento de la actividad cognitiva en los estudiantes. Además, resaltaron que el uso de TICs en el aula afectó positivamente a la actitud de los alumnos frente a la asignatura de química ⁹. Por otro lado, se ha señalado que la naturaleza del interfaz de la plataforma digital de aprendizaje puede influenciar la exactitud de las respuestas de los estudiantes ¹⁰.

Una forma de evaluar el proceso de enseñanza-aprendizaje puede ser mediante cuestionarios o exámenes. Actualmente, muchos docentes han empezado a utilizar Sistemas de Respuesta del Público, también denominados Audience Response Systems (ARSs) ¹¹. El uso de estos sistemas durante las clases ofrece diferentes ventajas como: mayor atención en clase, mayor conexión a los temas y una mejora del proceso de retroalimentación por parte del profesor ¹². Por otro lado, los profesores destacan la efectividad de estos sistemas en la evaluación y la facilidad en comparar resultados de los estudiantes ¹³.

Socrative es un tipo de Sistema de Respuesta del Público que está atrayendo la atención para ser usado en entornos educativos (www.socrative.com). Es una aplicación de acceso abierto y totalmente gratuita, que se puede usar en móviles, tablets o mediante ordenadores. Es fácil de usar, su comienzo es rápido y, además, corrige automáticamente las respuestas y recolecta los resultados de cuestionarios en tiempo real ¹⁴. De esta forma, puede aumentar la motivación de los alumnos y facilitar la labor docente reduciendo los tiempos de elaboración y corrección de cuestionarios. Además, tiene otras funciones como realizar juegos o actividades en grupo además de la posibilidad de usarlo para realizar cuestionarios de ideas previas.

El uso de Socrative en *smartphones* (teléfonos inteligentes) está relacionado con el *m-learning* o aprendizaje móvil que defiende la incorporación de los móviles inteligentes solos o combinados con otra TIC para mejorar el aprendizaje, integrando dichos dispositivos como un elemento docente. Ciertos trabajos de investigación realizados por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, UNESCO

(2013)¹⁵ revelan que los teléfonos inteligentes pueden ser una herramienta útil para ayudar a los profesores a emplear eficazmente el tiempo en clase, principalmente en tareas de memorización. Esta puesta en servicio de los dispositivos móviles permite al alumno entender mejor conceptos teóricos y reforzar la competencia social mediante las relaciones interpersonales derivadas de usar el dispositivo móvil para un juego educativo.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar si con el uso de una metodología activa basada en el uso de una aplicación de cuestionarios mejora el aprendizaje y la motivación de los alumnos de secundaria en el campo de la formulación y nomenclatura química.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Socrative (www.socrative.com) es una aplicación gratis y de acceso abierto, que puede ser usada tanto en móviles como en tabletas que usen Android o *Ios*, además de en ordenadores mediante la página web.

Métodos

Población y muestra

Este estudio se llevó a cabo en la asignatura Física y Química de tercer curso de la ESO de un instituto de la provincia de Cádiz (España). Un total de 115 alumnos y alumnas ($N_T=115$) participaron en este proyecto. Los estudiantes se dividen en cuatro grupos A, B, C y D de entre 28 y 30 estudiantes. En tres de esos grupos se ha utilizado la nueva metodología con Socrative (grupo S; $N_S=87$) y siendo el grupo restante el grupo de control (grupo X; $N_X=28$). La edad de los estudiantes está comprendida entre los 14-15 años. Todos los alumnos y alumnas del grupo S disponían de conexión estable a internet y un dispositivo compatible con la aplicación Socrative Student (smartphone o tablet).

Diseño experimental

Para llevar a cabo el estudio se siguieron distintas metodologías a la hora de impartir la docencia sobre nomenclatura y formulación en Química Inorgánica. Concretamente, la parte del temario que se impartió fue la de óxidos metálicos, óxidos no metálicos y compuestos binarios derivados de los halógenos, en todo caso de formulación y nomenclatura inorgánica. La metodología utilizada abarca en todo caso dos horas de docencia repartidas en dos sesiones de una hora. En el grupo de control (grupo X), las sesiones se desarrollan aproximadamente de la siguiente forma:

Primera sesión

- 20 minutos de explicación teórica (metodología expositiva) llevada a cabo por el profesor.
- 20 minutos de ejercicios con puesta en común desarrollados en la pizarra.
- 20 minutos de ejercicios realizados por los estudiantes en parejas, a mano y en folios de forma tradicional.

Segunda sesión

- 20 minutos de corrección de los ejercicios de la sesión anterior por parte del profesor o profesora.
- 20 minutos de ejercicios realizados por los estudiantes en parejas, a mano y en folios de forma tradicional.
- 20 minutos de corrección de los ejercicios y resolución de dudas.

Por el contrario, en el grupo que utiliza Socrative (grupo S):

Primera sesión

- 20 minutos de explicación teórica (metodología expositiva) llevada a cabo por el profesor o profesora.
- 20 minutos de ejercicios con puesta en común desarrollados en la pizarra y en Socrative. En esta etapa se introduce el uso de la aplicación al alumnado.
- 20 minutos de ejercicios realizados por los estudiantes en parejas haciendo uso de la aplicación Socrative, en dispositivos móviles o *tablets*. Mediante esta parte, mediante el uso del proyector de la clase se expone el progreso de los alumnos, es decir, cuanto han avanzado en el cuestionario. De este modo, el profesor puede ver si alguna pareja necesita ayuda adicional.

Segunda sesión

- 20 minutos de corrección de los ejercicios de la sesión anterior por parte del profesor o profesora usando la aplicación Socrative. Se analizan especialmente aquellos compuestos en los que los estudiantes cometieron mayor número de errores exponiendo los resultados de los alumnos en el proyector mediante los porcentajes que se obtienen mediante Socrative.
- 20 minutos de ejercicios realizados por los estudiantes en parejas haciendo uso de la aplicación Socrative, en dispositivos móviles o *tablets*. En este caso se hace seguimiento instantáneo de las estadísticas de los estudiantes en la resolución de ejercicios.
- 20 minutos de corrección de los ejercicios y resolución de dudas usando Socrative.

Finalmente, en ambos grupos se mandaron ejercicios a realizar el siguiente fin de semana en casa, bien a entregar en papel o a través de Socrative dependiendo de si se trata del grupo X o S, respectivamente.

Todos los cuestionarios constaban de 10 cuestiones tipo test con tres respuestas, existiendo una única respuesta correcta: 5 compuestos a nombrar y 5 compuestos a formular. En esta investigación, los estudiantes estaban conectados durante toda la sesión a la plataforma Socrative mediante el móvil por parejas. Usaban las iniciales de la pareja para que el profesor pueda seguir su seguimiento. Este seguimiento puede ser realizado en tiempo real. La aplicación permite hacer el seguimiento por parejas y por preguntas. Los cuestionarios fueron elaborados en el modo "cuestionario guiado por el estudiante con resultados inmediatos" con el

feedback activado. Cuando todos los estudiantes del aula han finalizado el cuestionario, el docente recibe un resumen de las respuestas, tanto de forma general de toda la clase como de casa una de las parejas. De este modo, el profesor puede obtener en tiempo real cuales son las preguntas con más fallos y así actuar en consecuencia.

RESULTADOS

Influencia del uso de Socrative en cuestionarios realizados en el aula

El impacto del uso de Socrative en las aulas mencionadas anteriormente se muestra en la figura 1. La figura 1 muestra los resultados distribuidos en escalas de conocimiento obtenidos en el primer cuestionario sobre formulación y nomenclatura inorgánica realizado con Socrative (grupo S) y en el grupo de control (grupo X).

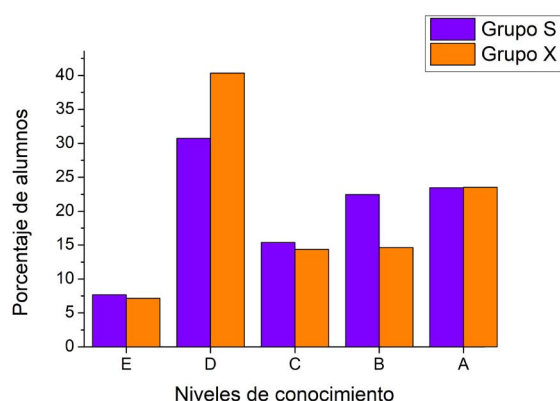


Figura 1. Porcentaje de alumnos distribuidos en escalas de conocimiento del grupo de control y del grupo Socrative sobre el primer cuestionario de formulación y nomenclatura inorgánica.

Primero, cabe destacar las similitudes en las escalas de conocimiento que son extremos (escalón A y escalón E). Los porcentajes de alumnos son muy similares en estas escalas. Sin embargo, existe una diferencia llamativa respecto a las escalas D y B. Existe un aumento del porcentaje de alumnos que consiguieron puntuaciones entre 7 y 8.99 en el grupo S, respecto al grupo de control. Lo cual ha conllevado una disminución en el escalón de conocimiento D (3-4.99 de puntuación). Por otro lado, el porcentaje de alumnos con puntuaciones menores de 5 son 38.45 % en el grupo S y 47.50 % en el grupo X. Esto puede ser indicativo de una mayor motivación y concentración de los alumnos al usar una herramienta TIC que al usar simplemente papel y bolígrafo, lo cual ya ha sido sugerido en otro estudio en aulas universitarias ¹⁶.

La comparación entre las puntuaciones obtenidas distribuidas en escalas de conocimiento entre el primer y segundo cuestionario de nomenclatura y formulación inorgánica en el grupo S se muestra en la figura 2A.

Es llamativo la disminución del porcentaje de estudiantes de los niveles D y E (puntuaciones menores de 5), que han pasado de ser un 38% en el primer cuestionario

a un 7% en el segundo. Esto ha conllevado una subida en el porcentaje de alumnos en los niveles A, B y C; especialmente en el nivel B (puntuaciones entre 7 y 8.99).

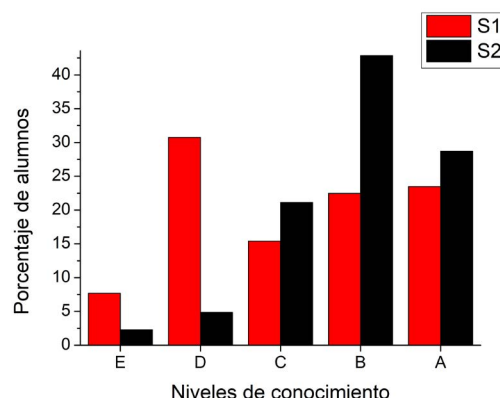


Figura 2A. Comparación de los resultados obtenidos expresados en escalas de conocimiento por los alumnos entre el primer y segundo cuestionario en el grupo Socrative.

Este hecho apunta a que los estudiantes han adquirido conocimientos después de detectar sus errores en el primer cuestionario. Para realizar un mejor análisis de estos resultados, se muestra a continuación la figura 2B que expone la comparación análoga en el caso del grupo de control (grupo X). Los resultados también parecen haber mejorado ya que han pasado de un 47% a un 25% de puntuaciones por debajo de cinco. Sin embargo, comparando este 25% con el 7% del grupo S, parece haber una clara diferencia. El porcentaje de alumnos con puntuación menor de cinco en el grupo que utiliza la aplicación Socrative fue sustancialmente menor que en el grupo de control (ejercicios tradicionales). Estos resultados van en línea con los obtenidos por Dervan en 2014 que indicaron que el uso de Socrative ayudó a entender conceptos del curso en clases de tecnología ¹⁷.

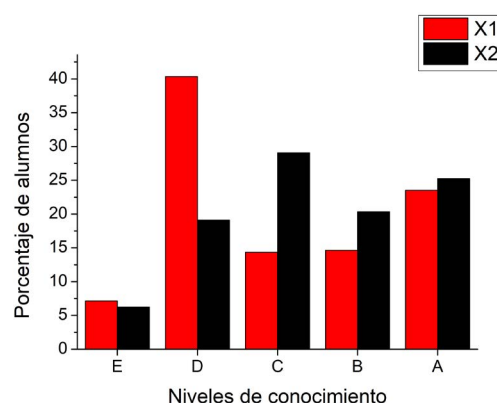


Figura 2B. Comparación de los resultados obtenidos expresados en escalas de conocimiento por los alumnos entre el primer y segundo cuestionario en el grupo de control (grupo X).

Para profundizar en estos resultados, se muestra la figura 3 donde se pueden observar las variaciones en los distintos niveles de conocimiento entre cuestionarios para el grupo S y grupo X. Aunque existe una

reducción en los niveles E y D (notas inferiores a cinco) de ambos grupos, la disminución es más acusada en el grupo S. Este hecho apunta que el uso de Socrative provoca una mejora en la adquisición de conocimientos sobre formulación y nomenclatura inorgánica. Por otro lado, cabe resaltar que el aumento del porcentaje de alumnos se produjo sobre todo en el nivel C para el grupo X, mientras que para el grupo S se produjo mayoritariamente en el B. Los dos grupos mostraron un aumento del porcentaje de alumnos en el nivel A pero más llamativo en el grupo S. Todos estos hechos sugieren que la metodología usando Socrative en el aula favorece el aprendizaje de los alumnos de 3º de la ESO en formulación y nomenclatura inorgánica. Este hecho ya fue señalado en aulas universitarias en clases de Química General ¹⁸.

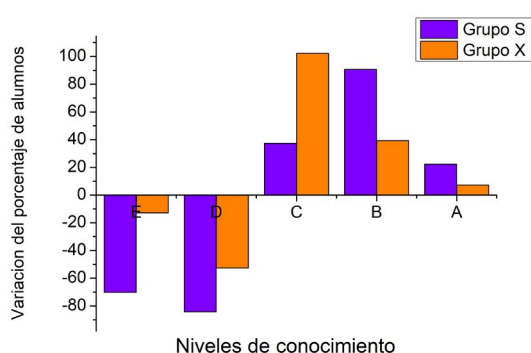


Figura 3. Variación del porcentaje de alumnos en los distintos niveles de conocimiento entre el cuestionario 1 y 2 para los grupos S y X.

Es importante mencionar que la percepción del docente en las aulas con metodología Socrative fue más positiva respecto a las actitudes y ambiente de la clase. Los alumnos de los grupos S mostraron mayor nivel de participación en clase y el clima en el aula era distendido como si "jugaran". Muchos alumnos preguntaron cuando volverían a usar la aplicación.

3.2. Influencia del uso de Socrative para realizar deberes en casa.

Una vez analizados los resultados obtenidos con las sesiones diseñadas con y sin Socrative, esta investigación se centra en el uso de Socrative para realizar deberes en casa en la figura 4. Primero, es importante mencionar que el porcentaje de alumnos que realizaron el cuestionario sobre formulación y nomenclatura inorgánica en casa usando la aplicación Socrative fue del 82.15%, mientras que fueron el 57.14% de los alumnos del grupo X que debían realizar el mismo ejercicio, pero en papel. Esta información se obtiene indirectamente de la escala N en la figura 4, que es el porcentaje de alumnos que no realizaron el cuestionario en casa. Este dato es especialmente interesante ya que tanto los alumnos del grupo S como los del grupo X mostraban continuamente faltas de responsabilidad al no traer los deberes realizados a clase. Se percibe entonces un importante aumento de participación y motivación al usar esta

herramienta TIC en casa. Además, el profesor pudo ver instantáneamente quien había realizado los deberes. Además, esta aplicación permite cerrar la tarea en el momento que se desee. Por otro lado, cabe comentar que durante este cuestionario los alumnos podían mirar los apuntes o el libro de química. La figura 4 muestra los resultados obtenidos por los alumnos del grupo Socrative y del grupo de control en los cuestionarios realizados en casa divididos en escala de conocimiento. Los resultados de puntuaciones menores de cinco fueron muy similares, aunque hay un mayor número de alumnos que llegaron a escalas de conocimiento A y B (puntuaciones superiores a 7) en el grupo S. De todos modos, al no haber una participación similar estos resultados no son fácilmente comparables.

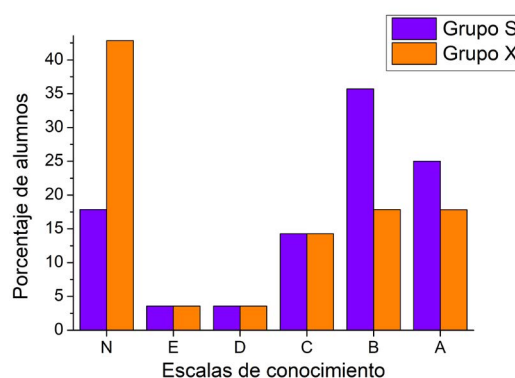


Figura 4. Porcentaje de alumnos divididos en escalas de conocimiento obtenidas en el cuestionario mandado como deberes a casa. La escala N significa cuestionario no realizado.

3.3. Opinión del alumnado.

Como ya se explicó en el marco metodológico, después de finalizar todos los cuestionarios se pasó una encuesta de satisfacción a los alumnos que podían puntuar los diferentes ítems desde 1 (Totalmente en desacuerdo) hasta 4 (Totalmente de acuerdo). A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la encuesta de satisfacción llevada a cabo por los alumnos del grupo S.

Ítem	Puntuación				Media
	1	2	3	4	
1	5	20	32	30	3,00
2	75	12	0	0	1,14
3	0	0	10	77	3,89
4	0	4	20	63	3,68
5	0	0	3	84	3,97
6	6	40	31	10	2,52

Analizando los resultados y teniendo en cuenta la definición de cada ítem visto en el apartado del marco metodológico, se pueden extraer varias conclusiones. Primero, al 71% de los alumnos la nomenclatura y formulación inorgánica les parecía aburrida. El 100% de los alumnos calificaron la aplicación como fácil de usar, igualmente pensaban que aprendían más al tener en el instante que se equivocaban la respuesta correcta. Casi un 95% de los alumnos consideraron que les gusta usar las *tablets* o móviles en clase y les gustaría usarlos

en otras asignaturas. Sin embargo, no parece haber una tendencia específica en el último ítem que es sobre el uso de la aplicación al realizar exámenes en vez de lápiz y papel. Los alumnos parecen tener cierta reticencia con esto, aunque no al usarlo en clase normalmente para su aprendizaje.

La fiabilidad de la encuesta de satisfacción se determinó mediante el parámetro alfa de Cronbach's ¹⁹. El valor del parámetro es 0.84, así que el cuestionario puede considerarse como fiable ya que debe estar entre 0.8 y 1 según las recomendaciones de Mallery y George (2000) ²⁰.

CONCLUSIONES

Se ha evaluado si el proceso de aprendizaje de un tema poco atractivo para el alumnado como es la formulación y nomenclatura de química inorgánica mejora al usar un recurso TIC, específicamente la aplicación móvil de cuestionarios llamada Socrative mediante una metodología reproducible y extrapolable. Se ha conseguido obtener resultados concluyentes respecto a que el uso de Socrative en el aula ha mejorado las puntuaciones en pruebas de nomenclatura y formulación inorgánica en los alumnos de tercero de la ESO. Además, se ha conseguido trabajar en un ambiente más distendido y con mayor participación del alumnado en las clases donde se usaba Socrative con relaciones profesor-alumno más cercanas. Por otro lado, se ha demostrado la utilidad de esta aplicación para mandar deberes a casa, mostrando un mayor nivel de alumnos con las tareas realizadas mediante la aplicación que usando el método tradicional de papel y lápiz. Finalmente, se ha obtenido de manera fiable la opinión de los alumnos respecto al uso de la aplicación para poder aplicar esta metodología a otros contenidos de la asignatura Física y Química.

REFERENCIAS

1. Evans, D. A.; Fitch, D. M.; Smith, T. E.; Cee, V. J. Application of Complex Aldol Reactions to the Total Synthesis of Phorboxazole B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10033-10046
2. Furió Más, C. J. La motivación de los estudiantes y la enseñanza de la Química. Una cuestión controvertida. *Educ. Quím.* **2006**, 17, 222-227.
3. Lutfi, A.; Hidayah, R. Activating Student to Learn Chemistry using Chemmy Card 6-1 Game as an Instructional Medium in IUPAC Nomenclature of Inorganic Compounds. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2018**, 953, 012198.
4. Ianos, M. G.; Oproiu, G. C. In *The 14th International Scientific Conference eLearning and Software for Education*; Bucharest (Romania), October 55-64, 2018; National Defence University, Bucharest, 2018.
5. Reynolds, D.; Treharne, D.; Tripp, H. ICT—the hopes and the reality. *Br. J. Educ. Technol.* **2003**, 34, 151-167.
6. Akbiyik, C. ¿Puede la informática afectiva llevar a un uso más efectivo de las Tecnologías de la Información y de la Comunicación (TIC) en la Educación? *Rev. Educ.* **2010**, 352, 179-202.
7. Wiegiers, K. E.; Smith, S. The use of computer-based chemistry lessons in the organic laboratory course. *J. Chem. Educ.* **1980**, 57, 454-458.
8. Martín-Fernández, B.; Sánchez-Paniagua López, M.; Hervás Pérez, J. P.; Rodríguez Rodríguez, E. (2016). Use of new technologies in University teaching of Analytical Chemistry. *Prof. Rev. Curr. Form. Prof.* **2016**, 20, 140-154.
9. Flynn, A. B.; Caron, J.; Laroche, J.; Daviau-Duguay, M.; Marcoux, C.; Richard, G. Nomenclature101.com: A Free, Student-Driven Organic Chemistry Nomenclature Learning Tool. *J. Chem. Educ.* **2014**, 91, 1855-1859.
10. Sadykov, T.; Čtrnáctová, H. *Books of abstracts*, Project-based Education and Other Activating Strategies in Science Education XVI, Prague, Czech Republic. November 8-9, 2018; Charles University, 2018.
11. Goodman, S. G.; Seymour, T. L.; Anderson, B. R. Achieving the performance benefits of hands-on experience when using digital devices: A representational approach. *Comput. Hum. Behav.* **2016**, 59, 58-66.
12. Cain, J.; Black, E. P.; Rohr, J. An audience response system strategy to improve student motivation, attention, and feedback. *Am. J. Pharm. Educ.* **2009**, 73, 21.
13. Kay, R. H.; LeSage, A. Examining the benefits and challenges of using audience response systems: A review of the literature. *Comput. Educ.* **2009**, 53, 819-827.
14. Beatty, I. D.; Gerace, W. J.; Leonard, W. J.; Dufresne, R. J. Designing effective questions for classroom response system teaching. *Am. J. Phys.* **2006**, 74, 31-39.
15. Pintado, A. B.; de Cerio, J. M. D. Socrative: A tool to dinamize the classroom. *Work. Pap. Operat. Manag.* **2017**, 8, 72-75.
16. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Directrices para las políticas de aprendizaje móvil, UNESCO. 2013. <http://goo.gl/JpsVCz>
17. Kaya, A.; Balta, N. Taking advantages of technologies: using the Socrative in English language teaching classes. *Intern. Journ. Soc. Sci. Ed. Stud.* **2016**, 2, 4-12.
18. Dervan, P. Increasing in-class student engagement using Socrative (an online Student Response System). *Irel. Journ. Teach. Learn. High. Educ.* **2014**, 6, 1-3.
19. Santos, J.; Parody, L.; Ceballos, M.; Alfaro, M. C., & Trujillo-Cayado, L. A. Effectiveness of mobile devices as audience response systems in the chemistry laboratory classroom. *Comput. Appl. Eng. Educ.* **2019**, 27, 572-579.
20. Cronbach, L. J. Coefficient alpha and the internal structure of tests. *Psychometrika*. **1951**, 16, 297-334.
21. Mallery, P.; George, D. *SPSS for windows step by step*. Allyn & Bacon, Inc: Boston, 2000.

Síntesis y caracterización de SBA-15 funcionalizada con polianilina para la adsorción de compuestos fenólicos desde solución acuosa

L.J. Cárdenas-Cuevas¹, L.Giraldo¹, J.C. Moreno-Piraján^{2*}

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

²Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación en Sólidos Porosos y Calorimetría, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Characterization and synthesis of polyaniline functionalized SBA-15 for adsorption of phenolic compounds from aqueous solution

Síntesi i caracterització de SBA-15 funcionalitzada amb polianilina per l'adsorció de compostos fenòlics des solució aquosa

RECEIVED: 3 FEBRUARY 2020; REVISED: 14 DECEMBER 2020; ACCEPTED: 10 FEBRUARY 2021

SUMMARY

SBA-15 was synthesized and functionalized with polyaniline (SBA-15 / PA), it was prepared using aniline and ammonium persulfate as modifying agent and oxidant. The solids obtained were characterized by N₂ physical adsorption at 77 K, thermogravimetric analysis (TGA), a total acidity and basicity through a modified Boehm's method and the point of zero charge pH (pHpzc). immersion calorimetry and were used as adsorbents of phenol, p-chlorophenol (PCF) and p-nitrophenol (PNF) for solutions of 100 mg L⁻¹. SBA-15 / PA presented a surface area of 215,3 m² g⁻¹ and the polyaniline functionalized process was confirmed by obtained values in the mass loss. Adsorption in aqueous solution of phenolic pollutants improves favorably after the polyaniline modification, with adsorption capacities between 69, 5 and 128,7 mg g⁻¹. Moreover, an enthalpy study of immersion in water, benzene and phenol, pcf and pnf solutions of 100 mg L⁻¹ was performed, presenting enthalpic values between -15 and -48 J g⁻¹, where is evident a greater interaction of the solutions and solvents with the SBA-15. Finally, enthalpy of immersion study with the phenols was carried out, where a correlation between the energetic values with the adsorption capacity and its textural properties.

Keywords: SBA-15, phenol, p-chlorophenol, p-nitrophenol, functionalization, adsorption, immersion calorimetry.

RESUMEN

Se sintetizó SBA-15 y luego se funcionalizó con polianilina (SBA-15/PA), se preparó usando anilina y persulfato de amonio como agente modificador y oxidante. Los sólidos obtenidos se caracterizaron por adsorción física de N₂ a 77 K, análisis termogravimétrico (TGA), acidez y basicidad total mediante el método Boehm modificado, pH en el punto de carga cero, calorimetría de inmersión y se usaron como adsorbentes en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-clorofenol (PCF) y p-nitrofenol (PNF). La SBA-15/PA presentó un área superficial de 215,3 m² g⁻¹ y los datos obtenidos en la pérdida de masa verifican su funcionalización con polianilina. La adsorción de los contaminantes fenólicos en solución acuosa mejora favorablemente después de la modificación de la sílice con polianilina, con capacidades de adsorción entre 69,5 y 128,7 mg g⁻¹. Así mismo se realizó un estudio de entalpía de inmersión en agua, benceno y las soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, pcf y pnf presentándose valores entálpicos entre -15 y -48 J g⁻¹, donde es evidente una mayor interacción de las soluciones y solventes con la SBA-15. Finalmente se correlacionan los valores energéticos con la capacidad de adsorción y sus propiedades texturales.

Palabras clave: SBA-15, fenol, p-clorofenol, p-nitrofenol, funcionalización, adsorción, calorimetría de inmersión.

*Corresponding author: jumoreno@uniandes.edu.co

RESUM

Es va sintetitzar SBA-15 i després es va funcionalitzar amb polianilina (SBA-15/PA). Es va preparar fent servir anilina i persulfat d'amoni com a agent modificador i oxidant. Els sòlids obtinguts es van caracteritzar per adsorció física de N_2 a 77 K, anàlisi termogravimètrica (TGA), acidesa i basicitat total mitjançant el mètode Boehm modificat, pH en el punt de càrrega zero, calorimetria d'immersió i es van usar com adsorbents en solucions de 100 mg L^{-1} de fenol, p-clorofenol (PFC) i p-nitrofenol (PNF). La SBA-15/PA va presentar un àrea superficial de 215,3 $m^2 g^{-1}$ i les dades obtingudes en la pèrdua de massa verifiquen la seva funcionalització amb polianilina. L'adsorció dels contaminants fenòlics en solució aquosa millora favorablement després de la modificació de la sílice amb polianilina, amb capacitats d'adsorció entre 69,5 i 128,7 mg g^{-1} . Així mateix es va realitzar un estudi d'entalpia d'immersió en aigua, benzè i les solucions de 100 mg L^{-1} de fenol, PFC i PNF presentant valors entàlpics entre -15 i -48 J g^{-1} , on és evident una major interacció de les solucions i solvents amb SBA-15. Finalment, es correlacionen els valors energètics amb la capacitat d'adsorció i les seves propietats texturals.

Paraules clau: SBA-15, fenol, p-clorofenol, p-nitrofenol, funcionalització, adsorció, calorimetria d'immersió

INTRODUCCIÓN

La inadecuada disposició de desechos industrials en fonts hídriques ha incrementat la contaminació en els últims anys. El fenol i els seus derivats com p-clorofenol i p-nitrofenol són considerats contaminants prioritaris en aigua, nocius per als organismes, dels quals els efectes en la salut se observen a concentracions molt baixes degut a la seva alta toxicitat¹.

Aquests compostos fenòlics són utilitzats en diverses indústries i poden formar-se com a subproductes en la degradació de alguns plaguicides i contaminants. El fenol s'emplica en indústries com la química i farmacèutica, petroquímica, en fabricació de resines i tintes, fàbriques de cel·lulosa i paper entre altres.²

El p-clorofenol és un dels compostos fenòlics comuns, els seus principals usos són la producció de clofibrat, pesticides i biocides, fabricació de paper, productes farmacèutics, refinació de petroli, fabricació de plàstics, resines, tèxtils, ferro i acer.³

Els nitrofenols se cataloguen com extremadament tòxics i cancerígens per als éssers humans i per a tota l'ecosistema aquàtic per la seva difícil biodegradació, especialment el 4-nitrofenol que s'utilitza en la producció de pesticides, fungicides, medicaments, pigments, petroquímics, plàstics, cuir, acer i productes farmacèutics.⁴

Eliminar el fenol i els seus derivats de l'aigua és important perquè és un recurs vital i indispensable per a tots els ecosistemes i els éssers humans, per la qual cosa en els últims anys s'han utilitzat diferents tipus de mètodes de tractament químic i físic, com:

ozonització⁵, oxidació⁶, coagulació⁷, floculació⁸, intercanvi iònic⁹, filtració¹⁰ i adsorció. Aquesta última tècnica és econòmica, eficient i viable en l'eliminació de compostos des de solució aquosa emprant sòlids porosos amb diferents característiques.¹¹

La preparació de materials amb matriu de sílice com SBA-15 han anat augmentant la seva importància degut a les seves característiques tals com: estructura mesoporosa regular, àrees superficials específiques, estabilitat tèrmica i mecànica, distribució i mida de poro uniforme, així com també diferents possibilitats de funcionalització que li permeten el seu ús potencial en la remoció de contaminants orgànics en solució aquosa.¹²

Funcionalitzar la sílice permet l'augment de la capacitat d'adsorció al modificar les condicions en la superfície química i produeix un augment dels llocs actius i de la selectivitat, a més de canvis estructurals.¹³ La polianilina és un polímer conductor que s'ha utilitzat per modificar les superfícies de materials mesoporosos per tenir característiques com fàcil síntesi i baix cost del monòmer d'anilina.¹⁴

En aquest treball es sintetitza SBA-15 i es funcionalitza amb polianilina donat que s'ha demostrat que els seus grups amino tenen la capacitat d'interactuar a través de enllaços d'hidrogen i interaccions π - π , convertint-se en una matriu interessant per crear llocs d'afinitat amb molècules solubles en aigua com els fenols. Els sòlids van ser caracteritzats per isoterms de Nitrògen a 77 K, anàlisi termogravimètric i calorimetria d'immersió en aigua, bencè i solucions de 100 mg L^{-1} de fenol, p-clorofenol i p-nitrofenol utilitzats per al procés d'adsorció. Es proposa que la presència de la polianilina modifiqui les propietats texturals i químiques de la SBA-15, millorant la adsorció dels fenols des de fase líquida. Per altra banda, mitjançant la determinació de l'entalpia d'immersió es avalua la capacitat d'adsorció relacionant la interacció energètica sòlid-solució.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis SBA-15

La síntesi de SBA-15 es va acabar d'acord amb el mètode reportat per Zhao et al.¹⁵ Inicialment es pesen i dissolven 18 g de pluronic 123 i 135 g d'aigua. Es deixa en repòs i es agita durant 24 hores. Aquesta solució es lleva a bany de Maria a 37 °C, s'afegeix lentament una solució de HCl i després 42 mL de TEOS (tetraetilortosilicat). Finalment es deixa en agitació per 20 hores, es filtra amb abunda aigua, es seca a 70 °C per 24 hores i es calcina a 540 °C per 6 hores.

Modificació de SBA-15

La modificació de la SBA-15 obtinguda amb polianilina es realitza segons el reportat en la literatura per Weng et al.¹⁶ Es prepara una solució de 42,9 mL de HCl de 0,55 M i 1,95 mL d'anilina, s'afegeix 2 g de SBA-15. Es agita durant 30 minuts en un bany d'aigua-hiela a 0 °C, s'afegeix gota a gota una solució de persulfat d'amoni (4,45 g APS en 19,5 mL d'aigua) i es deixa

en reposo por 3 horas. Posteriormente se filtra y se lava tres veces con agua, acetona y solución de ácido clorhídrico a 0,55 M. Finalmente se seca a 70 °C por 24 horas, el sólido obtenido se denomina SBA-15/PA.

Caracterización textural y química de SBA-15 Y SBA-15/PA

El área superficial y volumen de poro se determinan pesando aproximadamente 100mg de la muestra y se desgasifica a 250 °C durante 24 horas, seguido por la fisisorción de N₂ a 77 K en un equipo automático Autosorb IQ. Mediante la aplicación de los modelos BET se determinan las superficies específicas de las muestras.

Análisis de descomposición térmica

Se lleva a cabo en el equipo TG-DTA STA 7200. Inicialmente se pesan 80 mg de la muestra en un crisol de alúmina, el cual inicia su calentamiento a una velocidad de 10 °C min⁻¹ y un flujo de gas de 100 mL·min⁻¹, hasta una temperatura final de 800 °C. Los datos obtenidos se analizan como pérdida de peso de la muestra frente a la temperatura controlada en atmósfera de Nitrógeno.

Acidez y basicidad total

La acidez y basicidad total se determinan mediante el método propuesto por Boehm¹⁷ modificado. Se pone en contacto 0,1 g de la muestra con 50 mL de NaOH y HCl 0,05 M. Se deja en agitación constante durante cinco días. Posteriormente se titulan alícuotas de 10 mL de las soluciones con ácido o base previamente estandarizados con un titulador automático CG 840B Schott.

Punto de carga cero

La determinación del punto de carga cero (pH pcc) se realizó mediante el método de titulación de masas. Se pesan cantidades entre 0,1 y 0,6 g de las muestras y se adicionan 10 mL de una solución de NaCl 0,1 M. Se dejan en agitación constante durante 48 horas, posteriormente se mide el pH de cada solución con un pHmetro CG 840B Schott.

Determinación de la entalpía de inmersión

Se determina las entalpías de inmersión de la SBA-15 y SBA-15/PA en benceno, agua y soluciones de 100 mg·L⁻¹ de cada adsorbato (fenol, PCF y PNF) mediante el uso de un microcalorímetro de conducción de calor. Para las determinaciones se toma 100 mg de muestra y se depositan en una ampollita de vidrio que se acopla en el interior de la celda del equipo. Se colocan 8 mL del líquido en una celda de acero inoxidable, se estabiliza la temperatura y se comienza el registro térmico por medio de una señal de potencial eléctrico de salida de los sensores, luego se realiza la inmersión de la muestra en el líquido, se registran los cambios térmicos resultantes y por último se realiza la calibración eléctrica.

Isotermas de adsorción

Se pesan 20 mg de los sólidos y se ponen en contacto con 40 mL de las respectivas soluciones (fenol, p-nitrofenol y p-clorofenol que se preparan en un rango de concentraciones entre 20 y 150 mg·L⁻¹). Se dejan en agitación por 58 horas hasta alcanzar el equilibrio. Las muestras se filtran y se determinan las concentraciones de fenol, p-nitrofenol y p-clorofenol en el espectrofotómetro uv-vis Milton Roy Co. Spectronic Genesys SN a 271, 412 y 288 nm respectivamente. Las absorbancias

obtenidas por espectrofotometría UV-VIS para calcular la concentración de equilibrio C_e (mg·L⁻¹) con base en una curva de calibración y las cantidades adsorbidas en el adsorbente en equilibrio Q_e (mg·g⁻¹) son determinadas de acuerdo con la ecuación 1.

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{W} \quad (1)$$

Donde V es el volumen de la solución (L), y W es el peso del adsorbente (g).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran las isotermas de nitrógeno a 77 K obtenidas para la SBA-15 y la SBA-15/PA, las muestras presentaron isotermas tipo IV(a) de acuerdo con la clasificación actualizada de la IUPAC¹⁹, su comportamiento inicial se adapta a una isoterma de tipo II y se atribuye a la adsorción en monocapa, sin embargo, a presiones relativas medias para la SBA-15 (p/p* = 0,42) se inicia la condensación capilar y se generan bucles de histéresis tipo H1, características asociadas a sólidos mesoporosos con canales de poros cilíndricos, para el caso de la SBA-15/PA el punto de inflexión de la isoterma cambia a un punto más bajo de presión relativa (p/p* = 0,32).²⁰ La incorporación de polianilina al sólido produce bloqueos en los poros de la sílice y explica la disminución en la cantidad de nitrógeno adsorbido, este comportamiento se debe a la limitación en la difusión de las moléculas de nitrógeno que generan los grupos superficiales de la polianilina situados en las aberturas de los poros.²¹ Algunos sólidos no cierran el ciclo de histéresis ni aun a presiones bajas, tal como lo describe Everett en su trabajo²² y es un proceso que se conoce como histéresis a presiones bajas y se ha observado en arcillas, zeolitas y carbones. Este proceso puede tener su explicación en la distorsión de la estructura del sólido que ocurre con la desorción y por tanto se obtiene un cambio en la porosidad del sólido que se estudia. Everett y col.²³ generan una explicación termodinámica para la histéresis a baja presión, estableciendo que si para un sistema sólido-adsorbato en un punto de la adsorción se produce un cambio en la estructura que modifique el sólido se producirá un valor de desorción diferente a la cantidad que se adsorbió cuando el sólido tenía la estructura inicial. Para el caso particular de la SBA-15 un punto común en las curvas adsorción-desorción alrededor de la presión relativa de 0,4 y al continuar con la desorción a menores presiones se observan cantidades desorbidas por debajo de las que se adsorbieron.

Los parámetros texturales área superficial B.E.T., volumen de microporo (V_o), volumen de mesoporo (V_{meso}), volumen total y diámetro de poro se calcularon a partir de los datos experimentales de la isoterma de adsorción de N₂ y se muestran en la Tabla 1.

El diámetro de poro de la SBA-15 y SBA-15/PA es de 6,08 y 5,28 nm respectivamente, mostrando que son de característica mesoporosa; los valores de volumen de microporo, volumen de mesoporo, volumen total y diámetro de poro de la SBA-15/PA se reducen con respecto a la SBA-15 después de la modificación. El valor

de área superficial para la SBA-15 es de 654,5 m²/g y después de la modificación de la superficie el valor se reduce a 215,3 m²/g, estos resultados pueden atribuirse a la existencia de un bloqueo parcial con polianilina en el interior de los poros y superficie externa de la SBA-15.²⁴

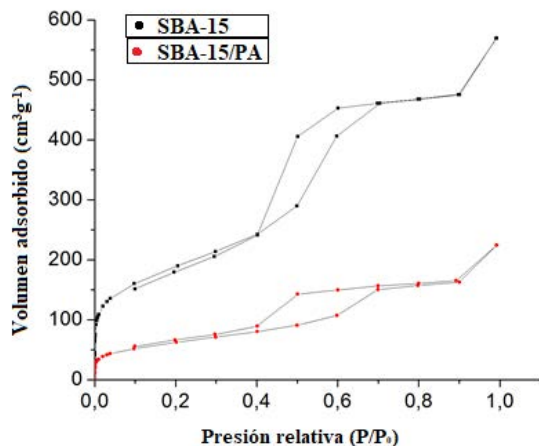


Figura 1. Isotermas de adsorción de nitrógeno a 77 K de SBA-15 y SBA-15/PA

Tabla 1. Parámetros texturales de SBA-15 y SBA-15/PA determinados a partir de las isotermas de N₂ a 77K.

Muestra	Área superficial BET(m ² g ⁻¹)	V _o (cm ³ g ⁻¹)	V meso (cm ³ g ⁻¹)	V total (cm ³ g ⁻¹)	Diámetro promedio de poro (nm)
SBA-15	654,5	0,22	0,61	0,84	6,08
SBA-15/PA	215,3	0,07	0,26	0,33	5,28

Termogravimetrías

El análisis termogravimétrico determina la pérdida de masa de los materiales y su campo de estabilidad térmica. La Figura 2 permite comparar los termogramas de la SBA-15 y su modificación durante el aumento de temperatura. La curva a) SBA-15 demuestra que es más estable en el proceso térmico que la curva b) SBA-15/PA, sin embargo esta también puede ser considerada térmicamente estable. En la SBA-15 se exhibe una primera pérdida de masa del 6,2% que ocurre en un rango de temperatura entre 50 °C y 150 °C, atribuida principalmente a la termodesorción de agua adsorbida físicamente en la superficie de la sílice.²⁵ Por encima de 150 °C se identificó una pérdida de peso pequeña que corresponde a la liberación de agua formada a partir de la condensación de silanoles y demuestra que la SBA-15 posee una buena estabilidad térmica gracias a la eliminación del tensioactivo en el proceso de calcinación.²⁶

La SBA-15/PA exhibe una mayor pérdida de peso, esto se debe a la eliminación de las cadenas de polianilina presentes en la muestra funcionalizada. La primera pérdida de masa alrededor de los 100 °C, se atribuye a la degradación de la molécula de agua y ácido clorhídrico que están unidas a la polianilina, teniendo una pérdida del 8,9% de masa. La segunda pérdida se encuentra en un rango de 320 °C a 700 °C, donde hay una degradación de

las cadenas de polianilina tanto en la superficie como en el interior de los poros, se observan tres mínimos, los dos primeros hacen referencia a la pérdida de un polímero de alto peso con un porcentaje de pérdida del 7,6 % y el tercer mínimo hace referencia a un polímero de menor peso molecular con un porcentaje de pérdida del 6,1.²⁷

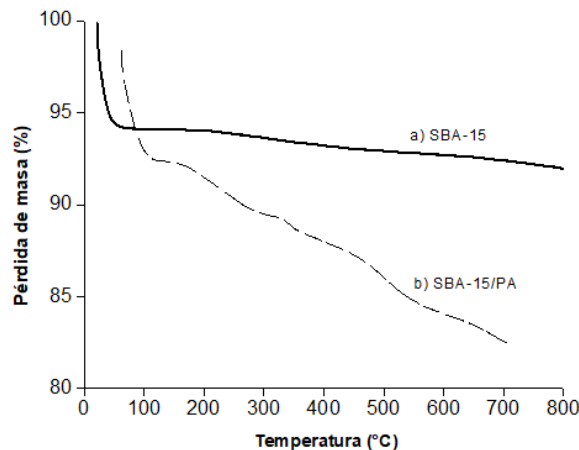


Figura 2. TGA a) SBA-15 y b) SBA-15/PA

Acidez y basicidad total y punto de carga cero

Mediante el uso de la metodología propuesta por Boehm se determina el carácter ácido-base de la superficie de las sílices dependiendo de la cantidad de sitios ácidos o básicos que esta contenga, en la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la acidez, basicidad y punto de carga cero para la SBA-15 y SBA-15/PA. La SBA-15 presenta un total de grupos ácidos de 0,026 meq g⁻¹ y un pH en el punto de carga cero de 6,5. De acuerdo con estos valores, la acidez de la superficie se relaciona con la desprotonación de los silanoles, después de su modificación se evidencia la disminución en la cantidad de sitios ácidos a 0,011 meq g⁻¹ y en el pH_{pcc} a 3,0 siendo estos valores atribuidos a la disminución de grupos silanoles presentes en la superficie de SBA-15. El pH en el punto de carga cero de las dos muestras es ácido de tal forma que si los sólidos se ponen en contacto con soluciones cuyo pH sea menor que el pH_{pcc}, la carga de su superficie será en promedio positiva.²⁸

Tabla 2. Acidez, basicidad y pH en punto de carga cero de la SBA-15 y su modificación

Muestra	Sitios ácidos (meq g ⁻¹)	Sitios básicos (meq g ⁻¹)	pH pcc
SBA-15	0.026	0.010	6,5
SBA-15/PA	0.011	0.006	3,0

Caracterización calorimétrica de SBA-15 y SBA-15/PA

La entalpía de inmersión es un parámetro termodinámico, que se relaciona con la energía de interacción, y que permite su correlación con la estructura del poro y la química superficial del sólido. La Tabla 3 muestra los valores obtenidos en las determinaciones entálpicas de la inmersión de las SBA-15 en agua y benceno, se evidencia que todos los procesos son de carácter exotérmico y que son mayores las entalpías de inmersión para

la SBA-15. Este resultado se debe a la interacción que tiene el solvente con los grupos químicos superficiales tanto de la SBA-15 como en la SBA-15/PA.

Las Figuras 3-5 muestran las curvas de potencial eléctrico en función del tiempo en el proceso de inmersión de la SBA-15 y la SBA-15/PA en benceno, agua y soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-cloro fenol y p-nitro fenol, para evaluar la interacción entre la sílice, los solventes y las soluciones utilizadas, esta información permite establecer la magnitud de la interacción sólido-líquido.

Tabla 3. Entalpías de inmersión de la SBA-15 y su modificación en agua y benceno

Muestra	$-\Delta H_{Exp.}$ Agua (J g ⁻¹)	$-\Delta H_{Exp.}$ Benceno (J g ⁻¹)	Factor hidrofóbico
SBA-15	31,2	28,1	0,9
SBA-15/PA	20,4	15,1	0,7

Las entalpías de inmersión en benceno y agua son de carácter exotérmico, las entalpías en benceno son menores con valores de -15,1 y -28,1 J g⁻¹ y mayores para la inmersión de los sólidos en agua, porque en este solvente se produce una mayor interacción con los grupos -OH de la superficie.

La Figura 3 muestra una comparación entre los termogramas de la calorimetría de inmersión en agua y benceno, se puede evaluar la polaridad de la superficie de las sílices, con base en que la proporción de hidrofobicidad e hidrofiliidad de una superficie es estimada a partir de la relación de las entalpías de inmersión en un líquido no polar y uno polar, como el agua y el benceno. De esta manera, como las entalpías en agua de la SBA-15 y SBA-15/PA son mayores que las entalpías en benceno, las superficies se consideran hidrofílicas. Es por ello que el mojado de la superficie más la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos silanoles de la SBA-15 generan un valor de entalpía mayor de -31,2 J g⁻¹ y al reducirse la cantidad de grupos silanoles en la SBA-15/PA por medio del apantallamiento de las moléculas de polianilina localizadas en los sitios polares de la superficie de la sílice disminuyen la entalpía de inmersión en agua a -20,4 J g⁻¹.²⁹

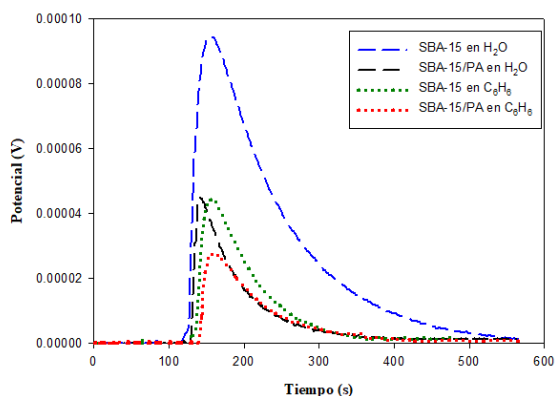


Figura 3. Termograma de inmersión de la SBA-15 y su modificación en agua y benceno

Teniendo en cuenta los valores de las Tablas 1 y 2 se puede observar una relación directa entre la entalpía de inmersión en benceno y el área superficial de las sílices, este proceso refleja las interacciones no específicas entre el sólido y el líquido, siendo mayor el valor de la entalpía de inmersión de la SBA-15, dado que al presentar un espacio más amplio para el ingreso de las moléculas se genera mayor interacción del adsorbato con la estructura porosa. El valor de la entalpía de inmersión para la SBA-15/PA decrece a -15,1 J g⁻¹, esto demuestra que existe un bloqueo en la porosidad por la fijación de los grupos funcionales en la superficie.³⁰ coincidiendo con los valores de factor hidrofóbico, fh en la tabla 3 que se obtienen de la relación entre la entalpía de inmersión de la muestra en benceno y el respectivo valor de la entalpía de inmersión en agua. De esta forma a medida que aumenta el factor hidrofóbico la entalpía de inmersión en benceno también aumenta. Otra de las características de las sílices que puede relacionarse es el pH en el punto de carga cero, pH pcc, que establece la carga de la superficie de los materiales, y se relaciona con la química superficial, que a su vez afecta las interacciones energéticas que se presentan entre el sólido y el líquido de inmersión; por esto corresponde con la entalpía de inmersión en benceno y se obtiene un comportamiento lineal, a medida que aumenta el valor de la entalpía de inmersión el pH en el punto de carga cero también lo hace, siendo 28,1 Jg⁻¹ el valor de la entalpía de inmersión de la SBA-15 y el pH pcc 6,5 y para la SBA-15/PA decrece a 15,1 Jg⁻¹ también lo hace su pH pcc a 3,0.

El grado y la naturaleza de la interacción en la interfase sólido-líquido en procesos como la adsorción, puede ser determinada por medio de la entalpía de inmersión, debido a que para algunas moléculas que se encuentran en solución, su valor puede variar según las interacciones específicas entre el líquido de inmersión y la superficie del sólido.

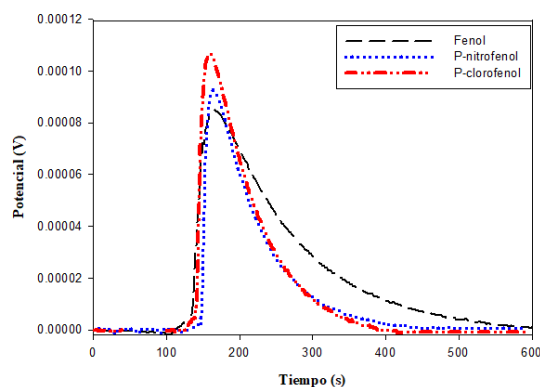


Figura 4. Termogramas de inmersión de la SBA-15 en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-nitrofenol y p-clorofenol.

Las entalpías de inmersión de la SBA-15 en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-clorofenol y p-nitrofenol se muestran en la Tabla 4 y se encuentran en un rango de -38,5 y -48 J g⁻¹, siendo mayores que las de SBA-15/PA con valores entre -18,5 y -31,7 J g⁻¹. Las Figuras 4 y 5 muestran que el efecto térmico obtenido entre las

soluciones y la SBA-15 es mayor, y corresponde a la suma de varias interacciones como el mojado de la superficie del sólido por el solvente, la interacción del solvente (agua) con los grupos silanoles de la superficie y la interacción de los solutos con los grupos silanoles de la superficie.

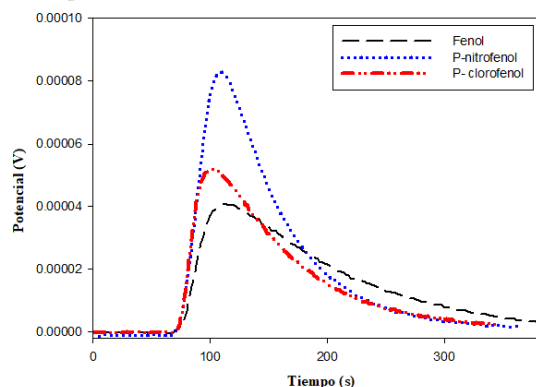


Figura 5. Termogramas de inmersión de la SBA-15/PA en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-nitrofenol y p-clorofenol.

En la SBA-15/PA se presenta un efecto térmico menor en comparación de la SBA-15, correlacionado con un efecto endotérmico que se calcula por medio de la ley de Hess con la entalpía en solución y también en agua, dado que la entalpía de interacción da positiva afecta la entalpía global, en este caso el acceso de las moléculas de los adsorbatos en solución a la superficie se logra mediante un consumo energético que debe obtener del sistema general para que la interacción adsorbato-adsorbente pueda ocurrir, algunos autores³¹ atribuyen dicho efecto al desplazamiento de moléculas de agua de la superficie. Sin embargo, sigue exhibiendo una entalpía exotérmica asociada con la sumatoria de los procesos de las interacciones entre la solución y la superficie del sólido.³²

Tabla 4. Entalpías de inmersión de SBA-15 y SBA-15/PA en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-nitrofenol y p-clorofenol y cantidad adsorbida (Qe)

	-ΔHExp. Solución Fenol (J g ⁻¹)	Qe (mg g ⁻¹)	-ΔHExp. Solución p-nitrofenol (J g ⁻¹)	Qe (mg g ⁻¹)	-ΔHExp. Solución p-clorofenol (J g ⁻¹)	Qe (mg g ⁻¹)
SBA-15	41,0	73,6	38,5	68,2	48,0	64,7
SBA-15/ PA	18,5	128,7	33,7	69,5	24,2	79,4

Determinación de isothermas de adsorción desde solución acuosa

La eficacia de los adsorbentes se evalúa mediante la adsorción de equilibrio (Qe) de fenol, p-clorofenol y p-nitrofenol en función de la concentración de equilibrio (Ce).

Las isothermas de los fenoles en SBA-15 y SBA-15/PA se muestran en las Figuras 6 y 7. En la Tabla 4 se observa que el orden de adsorción en términos de la cantidad adsorbida (mg g⁻¹) es mayor en la SBA-15/PA (128,7, 79,4 y 69,5 mg g⁻¹ para fenol, PCF y PNF respectivamente) que

en la SBA-15 (73,6, 68,2 y 64,7 mg g⁻¹ para fenol, PNF y PCF respectivamente) y una relación en la disminución de las entalpías de inmersión en la SBA-15 modificada con polianilina a medida que aumenta la capacidad de adsorción como lo muestra la figura 8 puesto que al funcionalizar la superficie disminuye el contenido de OH, disminuyendo los valores de entalpía y aumentando la capacidad de adsorción a causa de mayores interacciones con el soluto. El mecanismo de adsorción de contaminantes orgánicos en materiales inorgánicos generalmente son dados por interacciones electrostáticas, intercambio iónico, interacción ion-dipolo, puentes de hidrógeno, complejos donador-aceptor de electrones e interacciones hidrofóbicas.³³

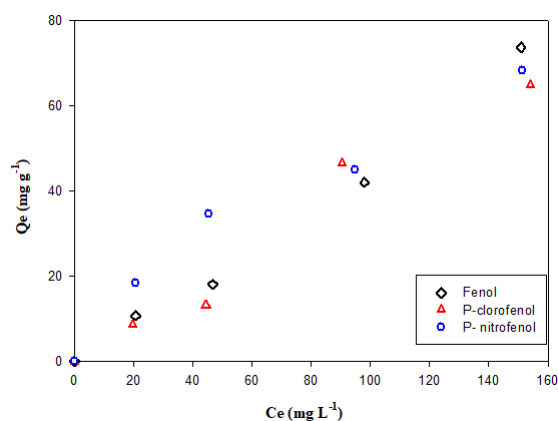


Figura 6. Isothermas en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-clorofenol y p-nitrofenol sobre SBA-15

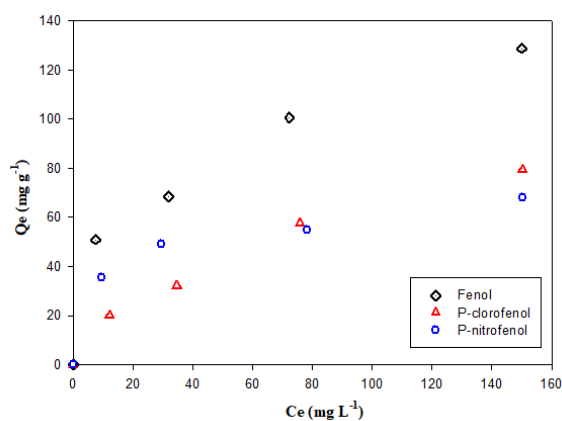


Figura 7. Isothermas en soluciones de 100 mg L⁻¹ de fenol, p-clorofenol y p-nitrofenol sobre SBA-15/PA

La mayor capacidad de adsorción en la sílice funcionalizada puede explicarse debido a la hidrofobicidad creada por los monómeros de la polianilina, al tener electrones libres genera una mayor interacción con los fenoles adsorbidos, además los grupos amino de la polianilina pueden interactuar con los grupos hidroxilo y nitro de los fenoles a través de enlaces de hidrógeno. En el caso del fenol y PCF con mayores capacidades de adsorción puede corresponder a su característica de ser ácidos débiles por lo que tienen interacciones ácidas y alcalinas con los grupos amino de la polianilina. En el caso del PNF la adsorción en las dos sílices tiene una

variación mínima puesto que sus interacciones son similares, lo cual se corrobora con los valores obtenidos para la entalpía de inmersión.³⁴

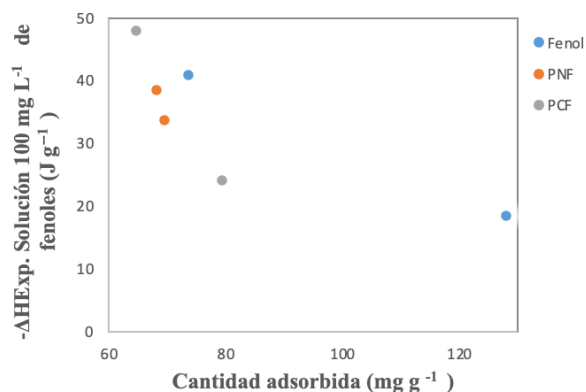


Figura 8. Entalpías de inmersión de la SBA-15 y SBA-15/PA en soluciones acuosas de 100 mgL⁻¹ de fenol, PNF y PCF en función de la cantidad adsorbida

CONCLUSIONES

Se modifica la SBA-15 con polianilina presentando diferentes características texturales, como la disminución del área superficial BET de 654,5 a 215,3 m²g⁻¹ para la SBA-15 y SBA-15/PA respectivamente, sin embargo los sólidos anteriores presentaron el mismo tipo de isoterma tipo IV(a). Los resultados termogravimétricos muestran la degradación de las cadenas de polianilina tanto en la superficie como en el interior de los poros de la SBA-15/PA. La caracterización entálpica de las SBA-15 y SBA-15/PA en benceno muestra un aumento en los valores de la entalpía de inmersión con el aumento en los valores del área superficial BET y el pH en el punto de carga cero. El fenol y p-clorofenol presentan mayores valores de adsorción y menores en las entalpías de inmersión en la SBA-15/PA, en tanto que el p-nitrofenol se adsorbe y tiene valores entálpicos casi en la misma cantidad en las dos sílices.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Convenio Marco entre la Universidad de los Andes y la Universidad Nacional de Colombia, y al Acta de Acuerdo entre los departamentos de Química de las dos universidades.

REFERENCIAS

1. Tolosana-Moranchel, A.; Anderson, J. A.; Casas, J. A.; Faraldos, M.; Bahamonde, A. Defining the Role of Substituents on Adsorption and Photocatalytic Degradation of Phenolic Compounds. *J. Environ. Chem. Eng.* **2017**, 5 (5), 4612–4620.

2. Auwal, A.; Hossen, J. Removal of Phenol From Aqueous Solution Using Tamarind Seed Powder As Adsorbent. *IOSR J. Environ. Sci.* **2018**, 12 (3), 41–48.
3. Wang, X.; Li, H.; Huang, J. Adsorption of P-Chlorophenol on Three Amino-Modified Hyper-Cross-Linked Resins. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 505, 585–592.
4. Chen, J.; Sun, X.; Lin, L.; Dong, X.; He, Y. Adsorption Removal of O-Nitrophenol and p-Nitrophenol from Wastewater by Metal–organic Framework Cr-BDC. *Chinese J. Chem. Eng.* **2017**, 25 (6), 775–781.
5. Biglari, H.; Afsharnia, M.; Alipour, V.; Khosravi, R.; Sharafi, K.; Mahvi, A. H. A Review and Investigation of the Effect of Nanophotocatalytic Ozonation Process for Phenolic Compound Removal from Real Effluent of Pulp and Paper Industry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, 24 (4), 4105–4116.
6. Shmychkova, O.; Luk'yanenko, T.; Yakubenko, A.; Amadelli, R.; Velichenko, A. Electrooxidation of Some Phenolic Compounds at Bi-Doped PbO₂. *Appl. Catal. B Environ.* **2015**, 162, 346–351.
7. Hernández-Francisco, E.; Peral, J.; Blanco-Jerez, L. M. Removal of Phenolic Compounds from Oil Refinery Wastewater by Electrocoagulation and Fenton/Photo-Fenton Processes. *J. Water Process Eng.* **2017**, 19 (February), 96–100.
8. Cavalcante, P. R. M.; Melo, R. P. F.; Castro Dantas, T. N.; Dantas Neto, A. A.; Barros Neto, E. L.; Moura, M. C. P. A. Removal of Phenol from Aqueous Medium Using Micellar Solubilization Followed by Ionic Flocculation. *J. Environ. Chem. Eng.* **2018**, 6 (2), 2778–2784.
9. Víctor-Ortega, M. D.; Ochando-Pulido, J. M.; Martínez-Ferez, A. Performance and Modeling of Continuous Ion Exchange Processes for Phenols Recovery from Olive Mill Wastewater. *Process Saf. Environ. Prot.* **2016**, 100, 242–251.
10. Zagklis, D. P.; Vavouraki, A. I.; Kornaros, M. E.; Paraskeva, C. A. Purification of Olive Mill Wastewater Phenols through Membrane Filtration and Resin Adsorption/Desorption. *J. Hazard. Mater.* **2015**, 285, 69–76.
11. Gao, X.; Dai, Y.; Zhang, Y.; Fu, F. Effective Adsorption of Phenolic Compound from Aqueous Solutions on Activated Semi Coke. *J. Phys. Chem. Solids* **2017**, 102, 142–150.
12. Qin, Q.; Liu, K.; Fu, D.; Gao, H. Effect of Chlorine Content of Chlorophenols on Their Adsorption by Mesoporous SBA-15. *J. Environ. Sci. (China)* **2012**, 24 (8), 1411–1417.
13. Toufaily, J.; Koubaissy, B.; Kafrouny, L.; Hamad, H.; Magnoux, P.; Ghannam, L.; Karout, A.; Hazimeh, H.; Nemra, G.; Hamieh, M.; et al. Functionalization of SBA-15 Materials for the Adsorption of Phenols from Aqueous Solution. *Cent. Eur. J. Eng.* **2013**, 3 (1), 126–134.
14. Aghajani, K.; Tayebi, H. A. Synthesis of SBA-15 / PANi Mesoporous Composite for Adsorption of Reactive Dye from Aqueous Media : RBF and MLP Networks Predicting Models. **2017**, 18 (3), 465–475.
15. Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Triblock

- Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* (80-). **1998**, 279 (5350), 548–552.
16. Weng, S.; Lin, Z.; Zhang, Y.; Chen, L.; Zhou, J. Facile Synthesis of SBA-15/Polyaniline Nanocomposites with High Electrochemical Activity under Neutral and Acidic Conditions. *React. Funct. Polym.* **2009**, 69 (2), 130–136.
 17. Boehm, H. P. Chemical Identification of Surface Groups. *Adv. Catal.* **1966**, 16, 179–274.
 18. Babić, B. M.; Milonjić, S. K.; Polovina, M. J.; Kaludierović, B. V. Point of Zero Charge and Intrinsic Equilibrium Constants of Activated Carbon Cloth. *Carbon N. Y.* **1999**, 37 (3), 477–481.
 19. Thommes, M.; Kaneko, K.; Neimark, A. V.; Olivier, J. P.; Rodriguez-Reinoso, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. S. W. Physisorption of Gases, with Special Reference to the Evaluation of Surface Area and Pore Size Distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2015**, 87 (9–10), 1051–1069.
 20. Zhai, Q.-Z.; Li, X.-D. Efficient Removal of Cadmium(II) with SBA-15 Nanoporous Silica: Studies on Equilibrium, Isotherm, Kinetics and Thermodynamics. *Appl. Water Sci.* **2019**, 9 (6), 143.
 21. Takamori, D. Y.; Bizeto, M. A.; Fantini, M. C. de A.; Rubinger, C. P. L.; Faez, R.; Martins, T. S. Polyaniline Inclusion into Ordered Mesoporous Silica Matrices: Synthesis, Characterization and Electrical Transport Mechanism. *Microporous Mesoporous Mater.* **2019**, 274, 212–219.
 22. Everett, D. H. The Solid-Gas Interface, Vol. 1. *Phys. Bull.* **1968**.
 23. Bailey, A.; Cadenhead, D. A.; Davies, D. H.; Everett, D. H.; Miles, A. J. Low Pressure Hysteresis in the Adsorption of Organic Vapours by Porous Carbons. *Trans. Faraday Soc.* **1971**.
 24. Boukoussa, B.; Hakiki, A.; Nunes-Beltrao, A. P.; Hamacha, R.; Azzouz, A. Assessment of the Intrinsic Interactions of Nanocomposite Polyaniline/SBA-15 with Carbon Dioxide: Correlation between the Hydrophilic Character and Surface Basicity. *J. CO₂ Util.* **2018**, 26 (March), 171–178.
 25. Freitas, L. B. de O.; Bravo, I. J. G.; Macedo, W. A. de A.; de Sousa, E. M. B. Mesoporous Silica Materials Functionalized with Folic Acid: Preparation, Characterization and Release Profile Study with Methotrexate. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2016**.
 26. Rahmat, N.; Sadon, N.; Yusof, M. A. Thermogravimetric Analysis (TGA) Profile at Different Calcination Conditions for Synthesis of PTES-SBA-15. *Am. J. Appl. Sci.* **2017**.
 27. Hu, Z.; Zu, L.; Jiang, Y.; Lian, H.; Liu, Y.; Wang, X.; Cui, X. High Performance Nanocomposite Electrodes of Mesoporous Silica Platelet-Polyaniline Synthesized via Impregnation Polymerization. *Polym. Compos.* **2017**.
 28. Santos, S. M. L.; Cecilia, J. A.; Vilarrasa-García, E.; Silva Junior, I. J.; Rodríguez-Castellón, E.; Azevedo, D. C. S. The Effect of Structure Modifying Agents in the SBA-15 for Its Application in the Biomolecules Adsorption. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, 232, 53–64.
 29. Rodríguez-Estupiñán, P.; Giraldo, L.; Moreno-Piraján, J. C. Calorimetric Study of Amino-Functionalised SBA-15. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2015**, 121 (1), 127–134.
 30. Vargas, D. P.; Giraldo, L.; Moreno-Piraján, J. C. Characterisation of Granular Activated Carbon Prepared by Activation with CaCl₂ by Means of Gas Adsorption and Immersion Calorimetry. *Adsorption* **2016**, 22 (4–6), 717–723.
 31. Moreno-Piraján, J. C.; Giraldo, L. Calorimetric Study of Mesoporous Solids at Room Temperature. *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, 156, 45–50.
 32. Rodríguez Estupiñán, P.; Giraldo Gutiérrez, L.; Moreno Piraján, J. Relación Entre Entalpías de Inmersión de Carbones Activados Modificados En Su Química Superficial En Diferentes Líquidos y Sus Características Fisicoquímicas. *Afinidad Rev. química teórica y Apl.* **2015**, 72 (570), 114–119.
 33. Qin, Q.; Ma, J.; Fu, D. Adsorption of Nitrobenzene and Benzoic Acid from Aqueous Solution by All-Silica Zeolite Beta. In *Advanced Materials Research*; 2011.
 34. Anbia, M.; Amirmahmoodi, S. Adsorption of Phenolic Compounds from Aqueous Solutions Using Functionalized SBA-15 as a Nano-Sorbent. *Sci. Iran.* **2011**, 18 (3 C), 446–452.

Use of Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay technique to monitor pesticide residues in horticultural crops

E. López Dávila^{1-2*}, z. Gil Unday¹, O. Romero Romero^{1,4}, G. Du Laing², P. Spanoghe³

¹Sancti Spiritus University, Study Centre of Energy and Industrial Process, Sancti Spiritus, Cuba. ²Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Department of Applied Analytical and Physical Chemistry, Coupure Links 653, 9000, Ghent, Belgium. ³Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Department of Crop Protection, Coupure Links 653, 9000, Ghent, Belgium. ⁴School of Technology, SRH - Hochschule Berlin, Ernst-Reuter-Platz 10, 10587, Berlin, Germany

Uso de la técnica de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas para supervisar los residuos de plaguicidas en cultivos hortícolas

Ús de la tècnica d'Assaig Immunosorbent Lligat a Enzims per supervisar els residus de plaguicides en cultius hortícoles

RECEIVED: 13 FEBRUARY 2020; REVISED: 9 DECEMBER 2020; ACCEPTED: 17 DECEMBER 2020

ABSTRACT

Organophosphates, carbamates (OP/Cs), and pyrethroids are among the most commonly used pesticides worldwide. These pesticides are highly toxic to insects but also other animals, including humans. The increasing public concern in recent years about possible health risks due to pesticide residues has deeply modified the strategies for crop protection. This study was conducted to assess ELISA as a rapid, economical, and safe analytical procedure as an alternative prior to chromatographic techniques for monitoring the residues of the target pesticides in horticultural crops. The study fulfilled its purpose. With the use of ELISA, more samples (higher than 50%) were quantified with OP/Cs, and pyrethroid residues compared to the chromatography techniques that mostly detected them. The developed ELISA exhibited accuracy (114% recovery with a 3% coefficient of variation for OP/Cs and 115% recovery with a 4.0% coefficient of variation for pyrethroids) and they are ideally suited as a fast, high-throughput, and low-cost (around 100 times lower) screening test for OP/C and pyrethroids residue prior to chromatographic analysis. Lineal relationships (slope 1.0089 with R^2 0.9983 for carbaryl [OP], and slope 1.1088 with R^2 0.9986 for cypermethrin) between the quantified values obtained by the chromatographic techniques with the ELISA test values were observed.

Keyword: organophosphate, carbamate, pyrethroid, ELISA

RESUMEN

Organofosforados, carbamatos (OP/Cs) y piretroides se encuentran entre los plaguicidas más utilizados en todo el mundo. Estos plaguicidas son muy tóxicos para los insectos, pero también para otros animales, incluidos humanos. La creciente preocupación en los últimos años por los posibles riesgos para la salud debido a residuos de plaguicidas ha modificado profundamente las estrategias de protección de los cultivos. El estudio evalúa a ELISA como alternativa analítica rápida, económica y segura frente a técnicas cromatográficas para la monitorización de residuos de plaguicidas en cultivos hortícolas. El estudio cumplió su objetivo. Con el uso de ELISA, se cuantificaron más muestras (50% mayor) con residuos de OP/Cs, y piretroides en comparación con las técnicas cromatográficas que mayoritariamente los detectaron. ELISA desarrollado mostró precisión (114% de recuperación y 3% coeficiente de variación para los OP/Cs y 115% de recuperación con 4,0% coeficiente de variación por piretroides) y es ideal como prueba de control rápida, de alto rendimiento y bajo coste (100 veces menor) para los residuos de OP / Cs y piretroides frente al análisis cromatográfico.

Se observaron relaciones lineales (pendiente 1,0089; R^2 0,9983 por carbarilo [OP], y pendiente 1,1088; R^2 0,9986 por cipermetrin entre valores cuantificados por las técnicas cromatográficas con los valores de la prueba ELISA.

*Corresponding author: edelbis86@gmail.com

Palabras clave: Organofosforado, carbamato, piretroides, ELISA

RESUM

Organofosforats, carbamats (OP / Cs) i piretroides es troben entre els plaguicides més utilitzats a tot el món. Aquests plaguicides són molt tòxics per als insectes, però també per a altres animals, inclosos humans. La creixent preocupació en els últims anys pels possibles riscos per a la salut a causa de residus de plaguicides ha modificat profundament les estratègies de protecció dels cultius. L'estudi avalua l'ELISA com a alternativa analítica ràpida, econòmica i segura davant tècniques cromatogràfiques per al monitoratge de residus de plaguicides en cultius hortícoles. L'estudi va complir el seu objectiu. Amb l'ús d'ELISA, es van quantificar més mostres (50% més gran) amb residus d'OP / Cs, i piretroides en comparació a les tècniques cromatogràfiques que majoritàriament els van detectar. L'ELISA desenvolupat va mostrar precisió (114% de recuperació i 3% coeficient de variació per als OP / Cs i 115% de recuperació amb 4,0% coeficient de variació per piretroides) i és ideal com a prova de control ràpida, d'alt rendiment i baix cost (100 vegades menor) per als residus d'OP / Cs i piretroides enfront de l'anàlisi cromatogràfica. Es van observar relacions lineals (pendent 1,0089; R2 0,9983 per carbaril [OP], i pendent 1,1088; R2 0,9986 per cipermetrín entre valors quantificats per les tècniques cromatogràfiques amb els valors de la prova ELISA.

Paraules clau: Organofosforat, carbamat, piretroides, ELISA

INTRODUCTION

Fruit and vegetables can be carriers of pesticide residues if they are treated with pesticides. To lower the residue good agricultural practices and respecting the ALARA principle are recommended. Pesticide applicators should take care of insecticides with action on the central nervous system (organophosphates, carbamates, pyrethroids, among others) ^{1,2}. Organophosphates, carbamates (OP/Cs), and pyrethroids are among the most commonly used pesticides worldwide due to their broad biological activity and low bioaccumulation potential ³. However, these pesticides are toxic not only to insects but also to other animals, such as amphibians, birds, and mammals, including humans. Some of this pesticide affects the human nerve impulse transmission-inducing neurologic toxicity, the chronic neurodevelopmental disorder, possible dysfunction of the immune, reproductive, and endocrine system or cancer ³⁻⁵.

Exposure to OP/Cs and pyrethroids can occur through the ingestion of contaminated food or water, contact with skin, and inhalation. Symptoms of exposure include headache; dizziness; nausea; increased nasal, ocular, and bronchial secretions; vomiting, and others. The increasing public concern in recent years about

possible health risks due to pesticide residues in food has deeply modified the strategy for crop protection, with emphasis on food quality and safety. The widespread concern for the health of society led to the strict regulation of maximum limits for pesticide residues in food commodities, potable and drinking water, soil, and general environmental media ^{3,5,6}.

Cuba is not an exception to the use of OP, CPs, and pyrethroids, being these the families of insecticides more used in the control of plagues and diseases ^{7,8}. As a result, some journalists reported and the public expressed concerns about possible health risks due to pesticide residues, mainly in fresh crops (e.g. vegetables: tomato, sweet pepper, and cucumber). Since that, the government, together with the phytosanitary and human sanitary department, started to search for an analytical procedure to control and monitor pesticide residues ^{9,10}.

Over the years, technicians and researchers have relied on several analytical methods, such as gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) for the detection, separation, and quantification of pesticide residues in different matrices ³. However, it is not always convenient to use such detection tools due to their high cost, expensive instruments, long analysis duration, complex sample pretreatment, and the requirement of skilled labor ¹¹. A group of authors (Dhull et al., 2014; Ge et al., 2014; Wang et al., 2014 and Xu et al., 2014) cited by Kumar ⁵, declare that fortunately, the need for simplified and portable detection techniques can be met through the use of biosensors, immunosensors, chemosensors, or electrochemical sensors.

The enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) has taken on new importance for pesticide analysis over the past decades ³. ELISA is commonly used for the detection of pesticides, biological toxins, pathogen, and drug residues ¹¹. Sassolas et al., 2012 cited by Kumar ⁵, also mention that ELISA techniques offer remarkable advantages over chromatographic techniques. ELISA has been proved to be a low cost, sensitive tool suitable for high throughput analysis, which has been extensively designed to monitor food contamination ¹², mainly in terms of fast response, specificity, low detection limits, and most attractively, cost-effectiveness ^{5,13}. ELISA allows us to easily automate the analysis of a massive number of samples and does not require time-consuming procedures and sophisticated equipment. Watanabe ¹⁴, refers to its applicability as an analytical method for a simple and quick inspection of pesticide residues in agricultural products before shipment, and Yan ¹⁵ emphasizes its benefits to protect ecosystems and prevent diseases. Moreover, the colorimetric detection of enzyme activity of immune reagents makes this assay highly sensitive ¹⁶.

The enzyme inhibition-based colorimetric detection of OP/Cs in pesticides has not been popularized until recently ^{17,18}. A colorimetric approach is ideal for consumers, as it is more visual and intuitive than chromatographic or spectroscopic methods. The color of sample solutions can be observed with the naked eye for qualitative determination or analyzed through digital images for quantification ¹⁹. On the other hand,

the magnetic enzyme-linked immunosorbent assay has attracted interest ¹¹. Sullivan et al., 2007 cited by Kumar ⁵, show the feasibility of detecting chlorpyrifos using a commercial magnetic particle-based ELISA kit.

Taking into account that there is no previous history in Cuba of using the ELISA test to monitor and control pesticide residues, the results obtained in this study could serve as a basis for the integration of ELISA in pesticide residue monitoring procedures in Cuba. The study

intends to evaluate the suitability (rapid, low cost, easy and safe analytical procedure) of the ELISA technique (Abraxis ELISA kits) for the monitoring and control of residues of organophosphates, carbamates, and pyrethroids insecticides in vegetables locally grown in Cuba, prior to chromatographic techniques (gas chromatography or liquid chromatography).

MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample collection

Thirty-four samples from three agricultural areas in Sancti Spíritus (Banao, Cabaiguán, and La Quinta) were collected during March 2019. The samples consisted of tomatoes (19), cucumber (5), and sweet pepper (10). Samples were blended and centrifuged at 10 000 rpm for 5 min. The subsample volume for the ELISA assay was taken from the clear upper layer, as well as a subsample for analysis with gas chromatography with Electron Capture Detector (GC-ECD) for the pyrethroids and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) for the OP/Cs. The ELISA tests were performed two days after collection in the Laboratories of the Centre for Energy and Industrial Process Studies of the University of Sancti Spíritus, Cuba. Subsamples to be analyzed with the chromatographic technique were kept frozen at -20 °C until analysis in the Laboratory of Crop Protection Chemistry of Ghent University.

2.2 Materials and instruments

The analytical chromatography grade OP/Cs and pyrethroid standards were purchased from Sigma-Aldrich (Belgium). Sigma-Aldrich also supplied sodium hydrogencitrate sesquihydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot \frac{1}{2}H_2O$) 99 %, sodium chloride (NaCl) > 99 %, sodium citrate tribasic dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) > 99 %, and the highest analytical purity pesticides standards needed in the study. Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) came from Merck (Belgium). HPLC grade acetonitrile (ACN) was supplied by VWR (BDH PROLABO, Belgium) and n-hexane > 99 % assay was obtained from Chem-Lab (Belgium).

2.3 ELISA

Abraxis Life Technologies™ provides field and lab-based ELISA testing kits for several pesticides tested in various matrices listed in the National Environmental Methods Index. Numerous articles prove the utility of Abraxis pesticide kits, especially for the analysis of glyphosate ^{20–23}. For OP/C, a colorimetric assay ELISA screen kit (Microtiter Plate: 96 Test) was purchased. The

analysis of pyrethroid was performed using the Abraxis Pyrethroid Assay kit (paramagnetic particles attached with antibodies specific to pyrethroids) (100 Tests). The analysis was developed following the corresponding procedure explained in each test kit. Each procedure provides a table with the respective detection limits of some OP/C and pyrethroids. A Vortex-Genie 2 (VWR International; Edmonton) was used and a magnetic separator rack was supplied by Abraxis. The final reading was performed with a spectrophotometer (Rayleigh VIS723G, China) at 405 and 450 nm.

2.5 ELISA control

Four-point calibration curves (0.75, 2.5, 5.0 and 15 $\mu g\ l^{-1}$) were used. The average values (3 determinations) of each permethrin (pyrethroid) calibration sample in water (control) and the matrices were tested (tomato; cucumber and sweet pepper). A midrange standard (positive control: 3.0 $\mu g\ l^{-1}$) was developed to check the accuracy of the curve. The Abraxis Pyrethroid Assay has an estimated minimum detectable concentration, based on a 90% B/Bo of 0.75 $\mu g\ l^{-1}$ (for permethrin), which was more than adequate according to the level expected in the fresh produce (10.0 $\mu g\ l^{-1}$). In the end, a statistical correspondence between the calibration curves of the studied matrices and the water control curve will be evaluated. The slopes of the calibration curves of the matrices must be between the confidence limits (upper and lower) of the slope of the control curve, for n-2 degrees of freedom and a probability of 95 %. The correspondence between the mean values, the coefficient of variation, and the recovery of the positive control in each calibration curve will be also evaluated.

The estimated minimum limit of detection based on a 20 % inhibition of the color developed for OP/C in 50% methanol is 0.3 $\mu g\ l^{-1}$ for azinphos-methyl. For the positive control, in the food safety assessments, diazinon at 5.0 $\mu g\ l^{-1}$ was used. When samples showed a percent inhibition lower than 20%, they were regarded as negative, and vice versa. With the relation between the absorbance values obtained for the negative control and the positive control, a linear calculation was performed to predict the OP/C values of the analyzed samples. As the OP/C ELISA test is a semi-quantitative method, the positive samples were analyzed by chromatography to quantify and confirm the pyrethroids and OP/Cs concentration concentrations obtained in the ELISA tests. The accuracy of ELISA results developed for OP/C will be evaluated through the correspondence (average concentration, recovery, standard deviation, coefficient of variation) between the value of positive ELISA control in the matrices concerning the concentration used (diazinon at 5.0 $\mu g\ l^{-1}$).

2.4 Comparative analysis

The QuEChERS method was used as a simple analytical extraction method for the detection of multiple pesticide residues in fruit, vegetables, and other matrices ²⁴. Besides, tomato, sweet pepper, and cucumber blank samples were spiked at 15 $\mu g\ l^{-1}$ of permethrin and 5 $\mu g\ l^{-1}$ diazinon (positive controls of the Abraxis kits) to confirm the kit performance. Extracts were analy-

zed by GC–ECD using Agilent Technologies 6890N, and a Waters ACQUITY UPLC-MS/MS. A detailed description of the analytical method and equipment conditions is described below.

A detailed description of the analytical method

Ten grams of vegetables of a homogenous made sample were weighed in standard centrifuge tubes (50 ml), and then 15 ml of acetonitrile (ACN) was added and shaken. The following salts were added to each sample to remove co-extracted contaminants: 1.5 g NaCl, 1.5 g C₆H₅Na₃O₇ 2H₂O, 0.750 g C₆H₆Na₂O₇ 1/2H₂O, and 6.0 g MgSO₄. Samples were mixed and then separated shaking for 5 minutes by 300 rpm and centrifuged 5 min at 10 000 rpm. The solvent exchange is different for the LC-MS/MS and GC-ECD samples. For the LC-MS/MS samples 1 ml of the upper layer was sampled and added to a volumetric flask of 10 ml. 9 ml Milli-Q water was added to obtain a total volume of 10 ml. A subsample of +/- 1.5 ml was pipetted in an LC-MS/MS vial. For the GC-ECD samples, 5 ml of the upper layer was sampled to an evaporation bowl. The solvent (ACN) was evaporated in the Rotary evaporator and 5 ml of n-hexane was added to the bowls to recover the analyte. A subsample of +/- 1.5 ml was pipetted in a GC-ECD vial.

Ultra-performance liquid chromatography operating conditions

A Waters ACQUITY UPLC™, equipped with a quaternary pump and triple quadrupole system with electrospray ionization (Waters Xevo® TQD) to perform sample analyses was used. The separation column, an Acquity UPLC BEH C18, 130Å (1.7 µm 2.1 mm 50 mm) was kept at 40°C. 10 µl per sample was automatically injected. The mobile phase components were (A) Milli-Q water with 0.1 % formic acid and (B) ACN with 0.1 % formic acid. A flow rate of 0.4 mL min⁻¹ of 98 % mobile phase A for 0.25 min was used as a gradient set. From 0.25 min to 7 min, a linear gradient was used to 98 % mobile phase B, held for 1 min. Then a linear gradient was used to 98 % mobile phase A and held for 1 min. The capillary needle was maintained at +2 kV, curtain gas (N₂) at 7 bars, and temperature 500 °C. The AIs were monitored and quantified using multiple reactions monitoring (MRM). Two different m/z transitions were selected for each analyte. The MS/MS-transitions, ionization mode, cone voltage, and collision energy are given in table 1.

Gas chromatography with electron capture detection

An Agilent Technologies 6890N gas chromatograph equipped with an Agilent Technologies 7683 Series autosampler injector, coupled to an electron capture detector (GC-ECD) was used. Separation was performed on a HP-5MS (5 % phenyl methyl siloxane) capillary column (30 m 0.25 mm 0.25 µm). As operating conditions, the column was initially set at a temperature of 60 °C and then the oven temperature was increased at a rate of 20 °C min⁻¹ to 150 °C. Furthermore, it was increased at a rate of 15 °C min⁻¹ to 250 °C, held for

2 min at 250 °C, followed by an increase at a rate of 30 °C min⁻¹ to 270 °C and held constant for 10 min at 270 °C. Thereafter, it was increased at a rate of 30 °C min⁻¹ to 280 °C and finally, it was held at 280 °C for 11 min. Injector and detector temperatures were maintained at 200 °C and 250 °C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.1 mL min⁻¹ and the injections were made in the split mode with a split ratio of 52.7:1.

Table 1 MS/MS-transitions, ionization mode, cone voltage, and collision energy of the active ingredients tested

Pesticide	Pesticide ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	Ionization mode (/)	Cone voltage (eV)	Collision energy (eV)	Residence time (ms)
methomyl	163	88	ES+	20	10	0.017
	163	106	ES+	20	10	0.017
acephate	184.1	125.1	ES+	11	18	0.052
	184.1	143	ES+	11	8	0.052
pyrimethanil	200	82	ES+	45	24	0.015
	200	107	ES+	45	24	0.015
methiocarb	226	121	ES+	22	22	0.015
	226	169	ES+	22	10	0.015
pirimicarb	239.1	72	ES+	28	72	0.017
	239.1	182.1	ES+	28	15	0.017
fenpropimorph	304.2	57.2	ES+	50	30	0.015
	304.2	147.2	ES+	50	28	0.015
thiodicarb	355	87.9	ES+	20	16	0.015
	355	107.9	ES+	20	16	0.015
prochloraz	376	70.1	ES+	16	34	0.015
	376	307.1	ES+	16	16	0.015
difenoconazole	406	111.1	ES+	40	60	0.015
	406	251.1	ES+	40	25	0.015
carbaryl	202	117	ES+	22	28	0.08
	202	145	ES+	22	22	0.08
ametryn	228.1	68.1	ES+	32	36	0.013
	228.1	186.1	ES+	32	18	0.013
thiametoxam	292	132	ES+	22	22	0.038
	292	211.2	ES+	22	12	0.038
malathion	331	99	ES+	20	24	0.013
	331	127	ES+	20	12	0.013
dimethomorph	388.1	165	ES+	35	30	0.013
	388.1	300.9	ES+	35	20	0.013
dimethoate	230.1	125	ES+	18	20	0.012
	230.1	199	ES+	18	10	0.012
metalaxyl	280.1	192.1	ES+	20	17	0.012
	280.1	220.1	ES+	20	13	0.012
tebuconazole	308	70.1	ES+	40	22	0.015
	308	125	ES+	40	40	0.015
chlorpyrifos	349.9	97	ES+	30	32	0.037
	349.9	198	ES+	30	20	0.037
azoxystrobin	404	329	ES+	22	30	0.015
	404	372	ES+	22	15	0.015
carbendazim	192.1	132.1	ES+	27	28	0.08
	192.1	16.1	ES+	27	18	0.08
imidacloprid	256.1	175.1	ES+	34	20	0.038
	256.1	209.1	ES+	34	15	0.038
parathion	291.9	110	ES+	30	33	0.017
	291.9	236	ES+	30	14	0.017
diazinon	305	96	ES+	31	35	0.017
	305	169	ES+	31	22	0.017
propiconazole	342	69	ES+	40	22	0.017
	342	159	ES+	40	34	0.017
profenofos	372.9	127.9	ES+	36	40	0.017
	372.9	302.6	ES+	36	20	0.017
methamidophos	142	93.9	ES+	28	13	0.163
	142	124.9	ES+	28	13	0.163

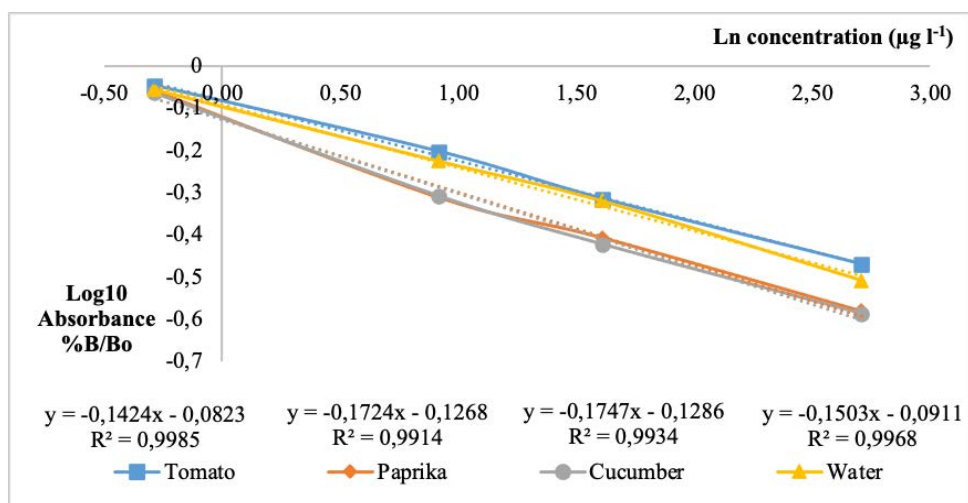


Figure 1 Calibration curves in water and matrixes of the study performed during the ELISA kit pyrethroid test

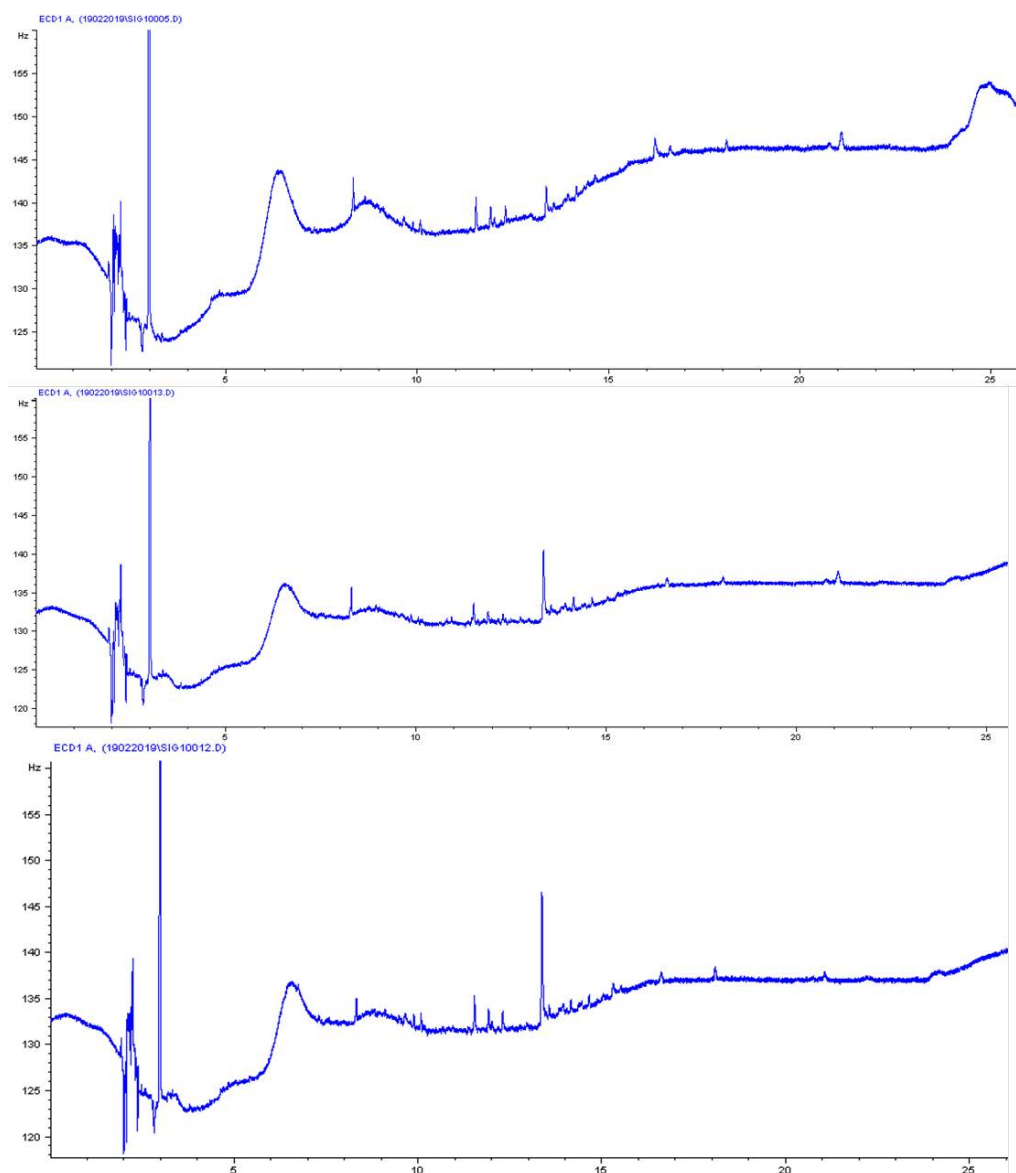


Figure 2 GC-ECD Chromatograms from tomato, sweet pepper, and cucumber spiked at 15.0 ppb of permethrin (retention times of the isomers 20.8 and 21.1 minutes).

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 ELISA test for pyrethroids

Figure 1 shows the calibration curves for permethrin developed in water (control) and in the tested matrices (tomato; cucumber and sweet pepper) using the pyrethroid ELISA kit. As the kit method recommends, clean vegetable juices dilutions (1:1 in methanol) to be used as reference instead of clear water for the spectrophotometric measurements.

A statistical correspondence between the calibration curves from the matrixes and the control curve in water was found. The slope from the pepper, cucumber, and tomato calibration curves was between the confidence limits (upper: -0.12311 and lower: -0.17749) of the control slope curve, for $n-2$ degrees of freedom to the desired probability of 95 %. Good statistical correspondence was also confirmed when the average values obtained ($3.46 \mu\text{g l}^{-1}$) from the positive control evaluated ($3.0 \mu\text{g l}^{-1}$) in each calibration curve ($n=4$) showed a 4.0 % of the coefficient of variation and a 115 % of the recovery. Xu ²³, also studied four ELISA kits brands to analyze organophosphates, carbamates, and pyrethroids. Their best results were obtained with the kits provided by Abraxis, with recovery percentage and coefficient of variation very similar to the values obtained in the present study. Figure 1 shows the percentages of inhibition of absorbance with respect to the negative control from 0.75 to $15.0 \mu\text{g l}^{-1}$ of permethrin in the evaluated matrixes. Based on those results, calibration curves from each matrix were used for the calculation of the corresponding concentration in the evaluated samples.

3.2 Comparison of results from ELISA with GC-ECD and UPLC-MS/MS

The accuracy of the ELISA results for pyrethroids could not be evaluated by GC-ECD. The GC-ECD equipment used has a limit of quantification (LOQ) (considered in this study as the low point in the calibration curve) for permethrin of $100.0 \mu\text{g l}^{-1}$, around seven times higher than the spiked concentration evaluated ($15.0 \mu\text{g l}^{-1}$) in the ELISA test. Figure 2 shows the chromatograms from the evaluated vegetables in the ELISA test at the spiked concentration of $15.0 \mu\text{g l}^{-1}$.

As it can be seen in figure 2, the chromatography can detect permethrin (20.8 and 21.1 min of retention times), but the relation signal area/noise value is not enough to quantify it; the low area's values obtained cannot be used to quantify it through the equation of the calibration curve. From the group of synthetic pyrethroids that are analyzed in the laboratory, permethrin is one of the least sensitive (ten times less than cypermethrin, bifenthrin, and others). In an Agilent report it is also mentioned that, from the group of pyrethroids analyzed by GC-ECD, permethrin is the active ingredient with the highest response factor (injected concentration/peak area) ²⁵. With the use of these ELISA values lower than the LOQ of the GC-ECD can be quantified. This test can help in the monitoring and control of pyrethroid residues in the vegetables studied.

Permethrin is widely used for hygienic control in sanitary in Cuba and together with other pyrethroids

in phytosanitary control. Sometimes these pesticides are used incorrectly. They reach water bodies and/or remain as residue in certain crops ²⁶⁻²⁸. Unlike in the EU, where the use of permethrin is not allowed, in Cuba permethrin and other pyrethroids can still be used. If Cuba is considering the export of some of these vegetables or fruits, to Europe, it should meet the EU Maximum residual levels (MRL) which fix permethrin at concentrations below the $50.0 \mu\text{g l}^{-1}$. For this aim, ELISA can play an important role.

The accuracy of ELISA results developed for OP/Cs was evaluated by UPLC-MS/MS. Table 2 shows the results of the positive ELISA control analysis in the matrixes evaluated by liquid chromatography. Percentages of inhibition were obtained in the ELISA tests, which could be verified by chromatography. An average concentration of $5.69 \mu\text{g l}^{-1}$ among the matrixes evaluated, a 114 % recovery, and a 3 % coefficient of variation with respect to the concentration used may be obtained with the ELISA test. Similar results (recoveries of 97-116% with coefficients of variation of 4-10%), also from local vegetables (Chinese cabbage, cucumber, tomato, carrots), were reported in studies from China and India ^{17,18,23}. The authors also outlined in the studies, the benefits of ELISA tests in terms of cost-effectiveness, simple operation, rapid response, and lower limits of quantification and detection than chromatography techniques ^{17,18,23}. In this way, the accuracy of the ELISA test for OP/C could be proved. The inhibition percentages above were used as referents to decide to analyze these samples with LC-MS/MS.

3.3 Screened samples

As can be observed in table 3, with the use of ELISA a higher amount of samples with OP/Cs and pyrethroids residues were detected compared to the chromatography techniques. Luo et al. (2017) also mention that the immunoassay was capable to detect ethyl carbamates in a large number of samples. A small signal was obtained in the chromatograms of several samples at the retention time thiodicarb, methiocarb, acephate, dimethoate, oxamyl, and cypermethrin, but the ratio between signal/noise was quantitatively low to consider them as a real signal. In the brochure of the Abraxis kit for OP/Cs, it is indicated that the Limit of Detection Pattern Sensitivity for some pesticide residue like chlorpyrifos (methyl and ethyl), dichlorvos, diazinon, and others are between 0.4 to $0.6 \mu\text{g l}^{-1}$. Pyrethroids showed the following sensibility: cypermethrin $4.75 \mu\text{g l}^{-1}$, λ -cyhalothrin $9.2 \mu\text{g l}^{-1}$ and bifenthrin $13.5 \mu\text{g l}^{-1}$. Although these values can be detected, they are below the LOQ of the chromatographic technique used in this study. All detected values were below their MRL.

Figure 3 shows the relationship between quantified values obtained by chromatographic techniques and the ELISA values in table 3. As can be seen in Figure 3, linear relationships were found between those values. Carbaryl values show a slope of 1.0089 with an R^2 of 0.9983, and cypermethrin shows a slope of 1.1088 with an R^2 of 0.9986. Additionally, a satisfactory Pearson correlation $r=0.999$ ($p<0.001$) was found. Other authors also obtained well-correlated results between ELISA

Table 2 Average recovery values of the OP/C positive controls evaluated by LC-MS/MS

Matrices	Positive control spiked ($\mu\text{g l}^{-1}$)	ELISA inhibition (%) at 405 nm	LC values ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Mean	Recovery (%)	S.D	CoV
Cucumber	5.00	80 %	5.91	5.69	114 %	0.0002	3 %
Sweet pepper		78 %	5.62				
Tomato		74 %	5.54				

LC: liquid chromatography, S.D: standard deviation, CoV: coefficient of variation.

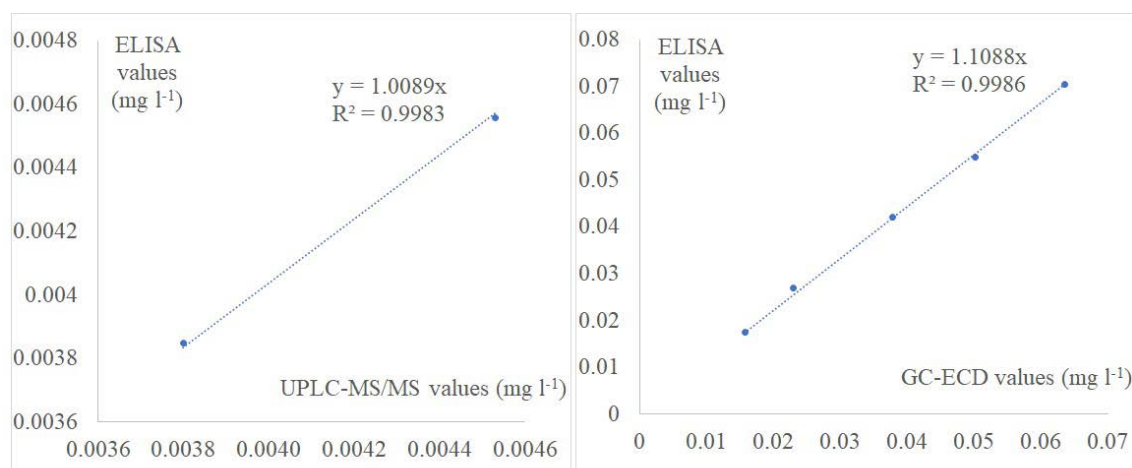


Figure 3 Figure 2: Analysis of the linear relationship for the cross quantified values between ELISA test and their chromatographs results

and chromatographic techniques in their sample analysis, suggesting good accuracy and reproducibility of the ELISA methods ^{12,29,30}

After this result, ELISA receives important attention, especially for residues of OP/Cs and pyrethroids, several of which are prohibited or of restricted use, mainly in the EU, where they received a default MRLs value. Thus, the developed ELISA exhibited good accuracy, is ideally suited as a fast, high-throughput, and low-cost screening test for OP/C and pyrethroids residues prior to chromatographic analysis to monitor and control the level of such residues.

3.4 General pesticide residue detected

Table 4 shows the rest of the pesticide residues detected by chromatography in the analyzed samples. As can be observed, residues of 13 different active ingredients (AIs) were detected. Fungicide was the most common group with nine AIs measured in the samples. Three of them were triazoles. Leyva Morales ³¹, also identify fungicides as the group with the highest frequency of use in northwestern Mexico; and Wahid ³², cite fungicides as the second pesticide group imported after herbicides in Suriname. Additionally, EFSA ³³ reported in the 2015 annual report of pesticides in food, fungicides as the most frequent pesticides with concentrations equal to or greater than the LOQ found. Two insecticides (neonicotinoids) and two herbicides completed the list of the residues detected.

For seven of the samples analyzed, the AI residues belonged to the same mode of action (neonicotinoids and triazoles) were found. Farmers should be alert-

ed to the hazard and risk of developing resistance to pests and diseases if AIs with the same mode of action are used on the same crop in one season. ^{1,2,34}. From 13 of the AIs detected in the collected samples, seven (fenpropimorph, chlorothalonil, thiamethoxam, carbendazim, propiconazole, ametryn, and alachlor) are forbidden for use in the EU. If the carbamate and organophosphates from Table 3 are also included, the number increases to 11 ³⁵.

The present study also likes to alert the local authorities to the risk that is being incurred due to the absence of MRL values in the Cuban norm ³⁶ for 14 of the 19 AIs detected. This hinders their control and monitoring. Among the AIs detected without Cuban values of MRLs, are those banned from use in the EU: acephate, ametryn, fenpropimorph, thiamethoxam, carbendazim, propiconazole, dimethoate, and alachlor. Alachlor had a value even higher than the EU MRL.

Although the presence of prohibited AI residues in the EU persists, with respect to previous studies in journals reviewed, the number of these has decreased. In samples of vegetables collected in the period 2016 - 2018, residues of endosulfan, methamidophos, parathion and parathion methyl, thiodicarb, permethrin, and lindane were additionally found. It is important to note that the current list of authorized pesticides in Cuba dates from 2016 to ³⁷ and concerning the previous list ³⁸ lindane, methamidophos, parathion, and methyl parathion are not authorized for use. Therefore, the presence of the residues mentioned in the samples collected between 2016 and 2018 meant a violation of the established laws and/or due to possible illegal activities. Positive is the

Table 3 Organophosphate, carbamate, and pyrethroids residues detected in the screened samples by ELISA test and checked by chromatography

Samples	Chromatographic				ELISA (mg l ⁻¹)	Chromatographic		ELISA (mg l ⁻¹)
	carbamate (Cs)	organophosphate (OP)				pyrethroid		
	carbaryl (mg l ⁻¹)	profenofos (mg l ⁻¹)	acephate (mg l ⁻¹)	dimethoate (mg l ⁻¹)		cypermethrin (mg l ⁻¹)	tau-fluvalinate (mg l ⁻¹)	
Sweet pepper	0.0038				0.0038		<LOQ	0.0019
Cucumber		<LOQ		<LOQ	0.0049			0.0026
Cucumber		<LOQ		<LOQ	0.0034			0.0042
Tomato					0.0025			
Tomato			<LOQ	<LOQ	0.0034	<LOQ		0.0089
Tomato				<LOQ	0.0052	<LOQ		0.0053
Tomato			<LOQ	<LOQ	0.0030			
Tomato			<LOQ	<LOQ	0.0035			
Tomato			<LOQ		0.0030			
Tomato				<LOQ	0.0027			
Tomato					0.0023			
Tomato				<LOQ	0.0025			
Tomato			<LOQ		0.0026			
Tomato				<LOQ	0.0043			
Sweet pepper		<LOQ			0.0027			
Sweet pepper	0.0045			<LOQ	0.0046		<LOQ	0.0102
Sweet pepper		<LOQ			0.0030			
Cucumber		<LOQ			0.0025			
Cucumber						<LOQ		0.0145
Cucumber				<LOQ	0.0024	0.0158		0.0174
Sweet pepper						0.0379		0.0422
Sweet pepper						0.0230		0.0270
Sweet pepper						0.0502		0.0550
Sweet pepper						0.0636		0.0705
EU/Cuban MRL (mg kg ⁻¹)								
Tomato								
Cucumber	0.01/5.0	10.00/10.0	0.01/-	0.01/-		0.50/0.2	0.10/-	
Sweet peppers	0.01/-	0.01/-	0.01/-	0.01/-		0.20/0.07	0.05/-	
	0.01/5.0	0.01/5.0	0.01/-	0.01/0.5		0.50/0.1	0.01/-	

Table 4 Pesticide residues detected by GC-ECD and UPLC-MS/MS in the collected samples

sample #	fenpropi-morph	imidaclo-prid	chlorotha-lonil	difenocon-azole	thiameth-oxam	carben-dazim	propicon-azole	azoxys-trobin	pyrimeth-anil	tebucon-azole	ametryn	alachlor	prochloraz
Sweet pepper	<LOQ	0.0190				0.0135		0.0022		0.0019			
Cucumber		0.0017			0.0099								
Cucumber		0.0019		<LOQ	0.0125								
tomato	<LOQ		0.018			<LOQ							
Tomato	<LOQ				<LOQ								
Tomato			0.036						0.0054				
Tomato	<LOQ		0.105										
Tomato	<LOQ	<LOQ											
Tomato	<LOQ		0.099										
Tomato	<LOQ								<LOQ				
Tomato	<LOQ		<LOQ										
Tomato	<LOQ		0.024			<LOQ		<LOQ					
Tomato			<LOQ										
Tomato	<LOQ	<LOQ											
Tomato	0.0025	<LOQ											
Tomato	<LOQ		0.015										
Sweet pepper		0.0208				0.0183		0.0027		0.0022			0.0012
Sweet pepper		0.0021		<LOQ	0.0103								
Sweet pepper		<LOQ			0.0034								
Sweet pepper	<LOQ	0.0022		0.0017	0.0102								
Cucumber		0.0025									<LOQ	0.018	
Cucumber	<LOQ												
Sweet pepper		0.0202		0.0054			0.0054						
Sweet pepper		0.0203		0.0036			0.0039						
Sweet pepper		0.0203		0.0054			0.0055						
Sweet pepper		0.0193		0.0061			0.0074						
EU/Cuban MRL (mg kg ⁻¹)													
Tomato	0.01/-	0.5/0.5	6.0/5.0	2.0/0.5	0.2/-	0.3/-	3.0/-	3.0/3.0	1.0/0.7	0.9/0.2	0.01/-	0.01/-	0.05/-
Cucumber	0.01/-	1.0/1.0	5.0/5.0	0.3/-	0.5/-	0.1/-	0.01/-	1.0/1.0	0.8/-	0.6/0.2	0.01/-	0.01/-	0.05/-
Sweet peppers	0.01/-	1.0/1.0	0.01/7.0	0.9/-	0.7/-	0.1/-	0.01/-	3.0/3.0	2.0/-	0.6/0.5	0.01/-	0.01/-	0.05/-

fact that the group of AIs (mainly OP/Cs) already banned in several countries, mainly in the EU and the United States, still existing in the current list of authorized pesticides in Cuba, are gradually decreasing from one list to another. That is part of a program for the reduction of synthetic pesticides with high toxicity, promoted by the government of Cuba in support of national and international environmental laws. It aims to guarantee food safety without compromising human health and environmental protection ^{27,39–42}.

CONCLUSION

The study achieved its aim, with the use of Abraxis ELISA kits, it was possible to detect the presence of the residue of certain groups of compounds of interest like organophosphates, carbamates, and pyrethroids in the collected samples. ELISA proved to be a reliable low-cost analytical procedure for fast detection, control, and monitoring of the presence of pesticide residues in tomatoes, peppers, and cucumbers, before chromatographic techniques (gas or liquid chromatography). The ELISA kits tested showed the capacity for quantification at values below the detection limit of the chromatographic techniques used. However, further analysis to determine specific active ingredients and their quantity if it is needed can be continuing done by chromatographic techniques, where a general screen can be also obtained. More than half of the total residues detected in the collected samples indicated the use of synthetic pesticides which are nowadays banned in the EU. In the context of Cuban agriculture, ELISA can be well used as a tool to evaluate the use of pesticides, since carbamates, organophosphates, and pyrethroids are still used. Monitoring and control actions would mainly focus on guaranteeing that the crops to be exported will meet international residue limits, as well as on ensuring that the population does not ingest highly toxic pesticide residues.

FUNDING SOURCES

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

1. Sparks, T. C.; Nauen, R. IRAC: Mode of Action Classification and Insecticide Resistance Management. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *121*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>.
2. IRAC. IRAC Mode of Action Classification Scheme. Version 9.3 <https://www.irac-online.org/documents/moa-classification/>.
3. Ouertani, R.; El Atrache, L. L.; Ben Hamida, N. Chemometrically Assisted Optimization and Validation of Reversed Phase Liquid Chromatography Method for the Analysis of Carbamates Pesticides. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2016**, *154*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2016.03.016>.
4. Chen, D.; Wang, J.; Xu, Y.; Zhang, L. A Thin Film Electro-Acoustic Enzyme Biosensor Allowing the Detection of Trace Organophosphorus Pesticides. *Anal. Biochem.* **2012**, *429* (1), 42–44. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.002>.
5. Kumar, P.; Kim, K.; Deep, A. Recent Advancements in Sensing Techniques Based on Functional Materials for Organophosphate Pesticides. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *70*, 469–481. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.066>.
6. Zhang, W.; Mohamed Asiri, A.; Liu, D.; Du, D.; Lin, Y. Nanomaterial-Based Biosensors for Environmental and Biological Monitoring of Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *54*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.007>.
7. Lopez Davila, E.; Ramos Torres, L.; Houbraken, M.; Du Laing, G.; Romero Romero, O.; Spanoghe, P. Cuba Pesticides Knowledge and Practical Use. *Cienc. Tecnol. Agropecu.* **2020**, *21* (1), e1282. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1282.
8. López Dávila, E.; Houbraken, M.; De Rop, J.; Wumbei, A.; Du Laing, G.; Romero Romero, O.; Spanoghe, P. Pesticides Residues in Tobacco Smoke: Risk Assessment Study. *Environ. Monit. Assess.* **2020**, *192* (9). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08578-7>.
9. National Assembly of the Popular Power of Cuba. *Law No. 81 of the Environment*, Edición ex.; Asamblea Nacional del Poder Popular: Havana, Cuba, 1997; Vol. XCV, p 47.
10. Vázquez, L.; Pérez, N. El Control Biológico Integrado Al Manejo Territorial de Plagas de Insectos En Cuba. *Agroecología* **2017**, *12* (1), 39–46.
11. Li, L.; Lin, Z.; Peng, A.; Zhong, H.; Chen, X.; Huang, Z. Biomimetic ELISA Detection of Malachite Green Based on Magnetic Molecularly Imprinted Polymers. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1035*, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.015>.
12. Luo, L.; Lei, H.; Yang, J.; Liu, G.; Sun, Y.; Bai, W.; Wang, H.; Shen, Y.; Chen, S.; Xu, Z. Development of an Indirect ELISA for the Determination of Ethyl Carbamate in Chinese Rice Wine. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *950* (483), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.008>.
13. Koch, P. L.; Stier, J. C.; Senseman, S. A.; Sobek, S.; Kerns, J. P. Modification of a Commercially-Available ELISA Kit to Determine Chlorothalonil and Iprodione Concentration on Golf Course Turfgrass. *Crop Prot.* **2013**, *54*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.07.017>.
14. Watanabe, E.; Seike, N.; Motoki, Y.; Inao, K.; Otani, T. Ecotoxicology and Environmental Safety Potential Application of Immunoassays for Simple, Rapid and Quantitative Detections of Phytoavailable Neonicotinoid Insecticides in Cropland Soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *132*, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.023>.
15. Yan, X.; Li, H.; Hu, T.; Su, X. A Novel Fluorimetric Sensing Platform for Highly Sensitive Detection of Organophosphorus Pesticides by Using Egg White-

- Encapsulated Gold Nanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.058>.
16. Vdovenko, M. M.; Stepanova, A. S.; Eremin, S. A.; Cuong, N. Van; Uskova, N. A.; Yu, I. Quantification of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Oranges and Mandarins by Chemiluminescent ELISA. *Food Chem.* **2013**, *141*, 865–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.060>.
 17. Han, T.; Wang, G. Peroxidase-like Activity of Acetylcholine-Based Colorimetric Detection of Acetylcholinesterase Activity and an Organophosphorus Inhibitor. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 2613–2618. <https://doi.org/10.1039/c8tb02616e>.
 18. Rajangam, B.; Daniel, D. K.; Krastanov, A. I. Progress in Enzyme Inhibition Based Detection of Pesticides. *Eng. Life Sci.* **2018**, *18* (1), 4–19. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700028>.
 19. Meng, X.; Schultz, C. W.; Cui, C.; Li, X.; Yu, H. On-Site Chip-Based Colorimetric Quantitation of Organophosphorus Pesticides Using an Office Scanner. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *215*, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.011>.
 20. Lee, A.; Jobsz, N.; Thomas, D. Glyphosate Levels in American Food Products Meet Government Safety Levels yet Exceed Concentrations Associated with Negative Biological Effects. **2019**, *2* (17), 1–6.
 21. McMurry, S. T.; Belden, J. B.; Smith, L. M.; Morrison, S. A.; Daniel, D. W.; Euliss, B. R.; Euliss, N. H.; Kensinger, B. J.; Tangen, B. A. Land Use Effects on Pesticides in Sediments of Prairie Pothole Wetlands in North and South Dakota. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.209>.
 22. Paravani, E. V.; Sasal, M. C.; Sione, S. M. J.; Gabioud, E. A.; Oszust, J. D.; Wilson, M. G.; Demonte, L. D.; Repetti, M. R. Determinación de La Concentración de Glifosato En Agua Mediante La Técnica de Inmunoabsorción Ligada a Enzimas (ELISA). *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2016**, *32* (4), 399–406. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.04.03>.
 23. Xu, T.; Wang, J.; Wang, X.; Slawacki, R.; Rubio, F.; Li, J.; Li, Q. X. Comparison of Four Commercial Enzymatic Assay Kits for the Analysis of Organophosphate and Carbamate Insecticides in Vegetables. *Food Control* **2012**, *27* (1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.002>.
 24. Xiu-ping, Z.; Lin, M.; Lan-qi, H.; Jian-bo, C.; Li, Z. The Optimization and Establishment of QuE-ChERS-UPLC – MS / MS Method for Simultaneously Detecting Various Kinds of Pesticides Residues in Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1060* (May), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.008>.
 25. Tu, C. *Analysis of Organochlorine and Pyrethroid Pesticides with Agilent 6820 Gas Chromatograph / Micro-Electron Capture Detector*; Shanghai, 2004. <https://doi.org/5989-1333EN>.
 26. Camero, Y. C.; Contreras, N. H.; Sautié, M. I. C.; Santana, Y. Forma de Aplicación y Efectividad de La Permetrina 1 %, Utilizada Por Convivientes Con Escolares , Para El Control de La Pediculosis Capitis En Los Niños. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2008**, *60* (2), 162–170.
 27. Hernández Contreras, N.; Chang Camero, Y.; Santana Suárez, Y.; Machado Martínez, E.; Martínez Izquierdo, A. M.; Pui Vazquez, L. de la C. Uso Deliberado de Diversos Productos Para El Control de Pediculus Capitis (De Geer , 1778), Por Padres o Tutores de Niños de Escuelas Primarias. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2010**, *62* (2), 119–124.
 28. Hernández, R.; Sisinnio, A.; Llanes, M. N. Residualidad de Insecticidas En Arroz. *Oryza Sativa L. Fitosanidad* **2003**, *7* (2), 59–61.
 29. Dohnal, V.; Dvůrák, V.; Malír, F.; Ostry, V.; Roubal, T. A Comparison of ELISA and HPLC Methods for Determination of Ochratoxin A in Human Blood Serum in the Czech Republic. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.010>.
 30. Guan, Y.; Wu, X.; Meng, H. Indirect Competitive ELISA Based on Monoclonal Antibody for the Detection of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural in Milk , Compared with HPLC. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96* (8), 4885–4890. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6550>.
 31. Leyva Morales, J. B.; García de la Parra, L. M.; Bastidas Bastidas, P. de J.; Astorga Rodríguez, J. E.; Bejarano Trujillo, Jorge Cruz Hernández, A.; Martínez Rodríguez, I. E.; Betancourt Lozano, M. Uso de Plaguicidas En Un Valle Agrícola Tecnificado En El Noroeste de México. *Rev. Int. Contam. Ambie* **2014**, *30* (3), 247–261.
 32. Wahid, F. A.; Wickliffe, J.; Wilson, M.; Van Sauers, A.; Bond, N.; Hawkins, W.; Mans, D.; Lichtveld, M. Presence of Pesticide Residues on Produce Cultivated in Suriname. *Environ. Monit. Assess.* **2017**, *189* (6), 22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10661-017-6009-0>.
 33. EFSA. The 2015 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA J.* **2017**, *15* (4), 134. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4791>.
 34. FRAC. *FRAC Code List © 2018: Fungicides Sorted by Mode of Action (Including FRAC Code Numbering)*; 2018.
 35. European Commission. EU - Pesticides database <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (accessed Aug 9, 2019).
 36. Cuban National Bureau of Standards. *NC 902: 2012. Pesticides in Foods — General Sanitary Requirements*; Oficina Nacional de Normalización: Cuba, 2012.
 37. Registro Central de Plaguicidas. *Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados. Republica de Cuba*; (Minagri), M. de la A., Ed.; Ministerio de la Agricultura (Minagri): La Habana, Cuba, 2016.
 38. Registro Central de Plaguicidas. *Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados. Republica de Cuba*; Cuba, 2008; p 422.
 39. Hernández Núñez, J.; Pérez-Consuegra, N. Tendencias En El Uso de Plaguicidas En Batabanó , Provincia Mayabeque. *Agric. Orgánica* **2012**, *18* (1), 30–33.

40. Llanes Mendoza, O. L.; Gómez Hernández, M. M.; Pérez Brito, D.; León Marrero, O. Intoxicación Aguda Masiva Por Endosulfan. Inusual Emergencia Médica. *Rev Cub Med Int Emerg* **2006**, 5 (4), 554–560.
41. Pérez, N.; Infante, C.; Rosquete, C.; Ramos, A.; González, C. Disminuyendo La Relevancia de Los Plaguicidas. Alternativas a Su Uso. *Agroecología* **2010**, 5, 79–87.
42. Rosquete Pérez, C. Evaluación de Impacto de La Supresión de Endosulfán En El Agroecosistema Güira de Melena, Artemisa, Cuba, Universidad Agraria de La Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez,” 2011.

Potencialidad de la vinaza de *agave cocui* como medio para el crecimiento de *saccharomyces cerevisiae*

E.K. Chirinos León^{1*}, O. Pérez Ones², G. Barreto Argilagos³, P. Navas Yamarte⁴ y R. Sánchez Manzanares⁵

¹Departamento de Química, Universidad Politécnica Territorial "Alonso Gamero", UPTAG. Av. Libertador, Parque "Los Orumos", Coro, Falcón, Venezuela. ²Grupo de Análisis de Procesos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría", Cujae. Ave. 114, No. 11901 e/ Ciclovía y Rotonda. Marianao, La Habana, Cuba. ³Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Aplicadas, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz", Camagüey, Cuba. ⁴Laboratorio de Investigación y Apoyo Docente (LIADSA), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", UNEFM, Coro, Falcón, Venezuela. ⁵Área de Ingeniería Ambiental, Universidad del Estado Falcón, UDEFA, Coro, Falcón, Venezuela.

Potential of Agave cocui vinasse as a crop for growth of Saccharomyces cerevisiae

Potencialitat de la vinassa d'Agave cocui com a medi per al creixement de Saccharomyces cerevisiae

RECEIVED: 15 JUNE 2020; REVISED: 11 NOVEMBER 2020; ACCEPTED: 8 DECEMBER 2020

SUMMARY

The present work evaluated the use of *Agave cocui* vinasse as a culture medium for the growth of *Saccharomyces cerevisiae*, for obtaining Pecayero cocuy. The experimental approach used to measure the effect of culture media and yeast strains on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, where the response variable, the optical density (OD), was based on five levels set for the crop medium factor (0, 10, 20, 30 and 40% vinasse); represents zero SDB reference medium; three levels for factor strain (ATCC 49-21, and Sc.VINAZA UNEFM-16) with two replicates, for a total of 45 experimental units. A statistical analysis comparing several samples was used, using the statistical program Statgraphics Centurion XV, thereby allowing for more significant factors on the response variable. The growth of different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, is favored among medium MSB and 40% vinasse, that provides the requirements for growth of these organisms. The differences between the phases of latency for each strain in different media show that the Sc. VINAZA performed better in most ways.

Keywords: vinasse, *Agave cocui*, culture medium, *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

El presente trabajo evalúa el uso de vinaza de *Agave cocui* como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en la obtención del cocuy pecayero. La metodología experimental utilizada para medir el efecto de los medios de cultivo y cepas de levadura, sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la variable respuesta la densidad óptica (DO), se basó en establecer cinco niveles para el factor medio de cultivo (0, 10, 20, 30 y 40 % vinaza); el cero representa el medio de referencia SDB; tres niveles para el factor cepa (ATCC 49-21, UNEFM-16 y Sc.VINAZA) con dos réplicas, para un total de 45 unidades experimentales. Se utilizó un análisis estadístico de comparación de varias muestras, a través del programa estadístico Statgraphics Centurion XV, que permitió establecer los factores de mayor significancia sobre la variable respuesta. El crecimiento de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido en medio MSB y medio de vinaza al 40%, que aporta los requerimientos necesarios para el crecimiento de estos microorganismos. Las diferencias entre las fases de latencia para cada cepa en los distintos medios, demuestran que la Sc. VINAZA tuvo un mejor desempeño en la mayoría de los medios.

Palabras claves: vinaza, *Agave cocui*, medios de cultivo, *Saccharomyces cerevisiae*.

*Corresponding author: echirinosborges@gmail.com

RESUM

El present treball avalua l'ús de vinassa d'*Agave cocui* com a mitjà de cultiu per al creixement de *Saccharomyces cerevisiae*, en l'obtenció de l'cocuy pecayero. La metodologia experimental utilitzada per mesurar l'efecte dels medis de cultiu i soques de llevat, sobre el creixement de *Saccharomyces cerevisiae*, sent la variable resposta la densitat òptica (DO), es va basar en establir cinc nivells per al factor-medi de cultiu (0, 10, 20, 30 i 40% vinassa); el zero representa el mitjà de referència SDB; tres nivells per al factor soca (ATCC 49-21, UNEFM-16 i Sc.VINAZA) amb dues rèpliques, per a un total de 45 unitats experimentals. Es va utilitzar una anàlisi estadística de comparació de diverses mostres, a través del programa estadístic Statgraphics Centurion XV, que va permetre establir els factors de major significança sobre la variable resposta. El creixement de diferents soques de *Saccharomyces cerevisiae* es veu afavorit en un medi MSB i un medi de vinassa a 40%, que aporta els requeriments necessaris per al creixement d'aquests microorganismes. Les diferències entre les fases de latència per a cada soca en els diferents medis, demostren que la Sc. Vinassa va tenir un millor acompliment en la majoria dels medis.

Paraules clau: vinassa, *Agave cocui*, medis de cultiu, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de etanol, para aplicaciones industriales o bebidas alcohólicas, ha aumentado significativamente. En 2018, la cifra mundial llegó a 112 billones de litros producidos, el 67 % obtenida por fermentación y destilación¹, lo que representa un crecimiento del 7 %, en comparación con el 2017. Existe un número importante de pequeñas y medianas industrias a nivel mundial que producen etanol a partir de la fermentación de distintas materias primas (maíz, caña, uva, cebada, trigo y agave). En esta actividad, generan cantidades considerables (en una destilería tradicional se encuentra entre 6-15 L/L de etanol obtenido) de residuos líquidos (vinazas). Las características de las vinazas varían de acuerdo con la materia prima empleada, la localización y el tipo de proceso de fermentación adoptado².

El licor de cocuy pecayero es una bebida alcohólica que en el año 2001 recibió por el Servicio Autónomo de Propiedad Intelectual (SAPI) la denominación de origen, la cual sólo es producida a escala artesanal. De acuerdo con el número de productores registrados se calcula que actualmente se producen unos 50 000 L/año, por lo cual, los niveles de vinaza son de 600 000 L/año³, es decir, aproximadamente 12 L de vinaza / L de licor producido.

Según la caracterización físico-química, este desecho constituye un contaminante potencial de las aguas y los suelos donde se vierte, debido a sus bajos valores de pH (4,06) y elevada demanda química de oxígeno (DQO) 70 806 mg/L⁴, que superan los permitidos para

desechos líquidos vertidos directa o indirectamente a cuerpos de agua y que no deben exceder los 350 mg/L⁵.

Siendo la vinaza el principal effluente contaminante del proceso productivo de cocuy pecayero, es de gran interés revisar las diferentes opciones que existen en cuanto a la reutilización de dicho effluente.

Algunos estudios realizados, principalmente en vinazas de caña y de tequila, han propuesto diferentes alternativas de aprovechamiento entre las que destacan la fertirrigación⁶, para sustituir total o parcialmente otros fertilizantes, la digestión anaerobia para la producción de biogás^{7,8}, el compostaje^{9,10}, la concentración por evaporación hasta un 60 % para la combustión en calderas especiales para producir energía¹¹, la producción de levadura torula¹² y la recirculación al proceso de fermentación como sustituto del agua^{13,14}.

El presente estudio tuvo como propósito evaluar el uso de la vinaza de *Agave cocui*, como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que posee un alto contenido de micro y macro nutrientes que pueden favorecer el crecimiento de esta levadura. Esta alternativa puede aumentar la eficiencia de la conversión de jugo a mosto de *Agave cocui*, además de ser el punto de partida para la posible recirculación del desecho y para su reutilización en la obtención de proteína unicelular, producto usado para el engorde de animales, lo cual representa un valor agregado del proceso productivo a través de la posible comercialización del producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas

Se emplearon tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*): ATCC 49-21, proveniente del Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Zulia (Sc. de Champán); UNEFM-16, cedida por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", aislada en estudios anteriores del mosto de *Agave cocui*¹⁵ y *S. cerevisiae*, aislada de la vinaza de *Agave cocui* en el LIADSA-UNEFM codificada con el código Sc. VINAZA. Estas cepas fueron purificadas y aisladas a 30 °C, en *Sabouraud Dextrosa Broth* (SDB) y caldo de Papa Dextrosa (CPD) con 1,5 % v/v cloranfenicol (suspensión oral 125 mg/5 mL).

2.2 Medios de cultivo

Se utilizaron cinco medios de cultivo. El SDB, que es un medio de uso general para evaluar crecimiento de levaduras¹⁶, se le modificó su pH original hasta un valor de 4,5, constituyó el control positivo. A partir de este medio base se diseñaron otros cuatro a los que se incorporó vinaza de *Agave cocui* (10, 20, 30 y 40 % v/v) con 2 % (p/v) de dextrosa; en los mismos se sustituyó un 50 % de la dextrosa y la totalidad de la peptona por vinaza. Se estableció 40 % como porcentaje máximo, atendiendo al criterio de Romero y col.¹⁷ y Campos y Chirinos¹⁸, quienes refieren que altas concentraciones de vinaza de *Agave cocui* tienden a limitar el uso del desecho.

Los ajustes de pH se realizaron acorde a lo sugerido por Barreto¹⁶. Todos los medios, una vez preparados, se esterilizaron en autoclave, como se establece para medios convencionales. Luego se verificó que el pH (en los que incluían vinaza) se mantuviera en el valor establecido.

2.3 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la vinaza de *Agave cocui*

En primer lugar, es importante mencionar que en el proceso artesanal de producción de cocuy pecayero, se generan dos tipos de vinaza, la vinaza tipo I (sin adición de azúcar al jugo de *Agave* durante el proceso de fermentación) y la vinaza tipo II (con adición de azúcar al jugo de *Agave* durante el proceso de fermentación). La población estuvo compuesta por los 25 alambiques, cuya vinaza representa aproximadamente un volumen de 175 litros por cada destilación¹⁹.

Como criterio de inclusión se utilizó la vinaza de *Agave cocui* tipo II. Se seleccionaron al azar siete alambiques (7, 8, 12, 13, 14, 18 y 20) mediante la técnica de números aleatorios de la hoja de cálculo Excel. De cada alambique se tomó una muestra; se les midió *in situ*: pH (pHmetro de campo marca HANNA, $1-4 \pm 0,01$); conductividad eléctrica (conductímetro de campo HANNA $19,99 \text{ mS/cm}-1999 \text{ }\mu\text{S/cm} \pm 0,01$); °Brix (refractómetro de campo marca ATC $\pm 0,2$ °Brix) y temperatura (termómetro digital DeltaTRAK de -50 a $200 \pm 0,1^\circ\text{C}$).

Posteriormente, apoyados en Statgraphics Centurion XV, por medio del análisis de varianza del factor alambique, para cada una de las variables evaluadas, se realizó la comparación de las muestras para establecer si existen o no diferencias significativas entre las medias de cada respuesta en los alambiques seleccionados y validar el empleo de una muestra compuesta, preparada con los volúmenes tomados de los diferentes puntos de muestreo.

Las mediciones para la caracterización fisicoquímica de muestras de vinaza de *Agave cocui* se analizaron por triplicado. A su vez se realizaron observaciones microscópicas directas (campo claro) para verificar la presencia de hongos y bacterias, empleando un microscopio SIEMS-10 con una amplificación máxima de 400X.

El aislamiento y cultivo consistió en diluciones decimales (1.10^{-1} , 1.10^{-2} , 1.10^{-3} , 1.10^{-4}) de muestras de vinaza que se extendieron sobre *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA), mediante el empleo de espátulas de Drigalsky¹⁶. Cada dilución contó con dos réplicas. Todas las placas se incubaron a 30°C ²⁰ durante 72 h para la observación de las características macroscópicas de las colonias formadas. Solo se contemplaron aquellas placas correspondientes a diluciones en las que se apreciaron colonias independientes bien definidas. A todas las colonias de hongos (mohos o levaduras) se les determinó su diámetro, textura, color, producción de pigmentos y si los mismos difundían al medio de cultivo, necesario para su caracterización macroscópica. En las correspondientes a bacterias se estableció su diámetro, tipo de bordes, color y textura (lisa o rugosa).

La caracterización microscópica consistió en realizar frescos con lactofenol, a partir de las colonias con feno-

tipo fúngico, para establecer en el caso de los mohos: el tipo de micelio (septado o aseptado) y la presencia de hifas reproductoras; para las levaduras: la forma de las células, la presencia de pseudomicelio o de yemas. Todos los aislamientos con fenotipo levaduriforme se pasaron en paralelo a agar *Corn Meal* y agar Gorodkova para inducir la producción de ascosporas, aspecto que luego se confirmó mediante el método de Bartholomew y Mittler¹⁶.

Para evaluar la capacidad fermentativa, la levadura se sembró en ocho tubos de fermentación con tubos Durham en su interior. El medio empleado para la fermentación fue caldo cerebro-corazón de Merck 25 g, extracto de levaduras 5 g, glucosa 10 g, azul de bromotimol 0,05 g.L-1, a pH 7. Todos los tubos se incubaron a 30°C durante 72 h.

2.4 Potencialidad de la vinaza como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Para confirmar las potencialidades de la vinaza como medio de cultivo se utilizaron tres cepas de esta especie a las que, previo al ensayo, se les realizó pases por el medio en el que se evaluaría su crecimiento.

Mediante el empleo de una cámara de Neubauer se realizaron los recuentos pertinentes para garantizar que en cada medio se inoculaba con un número de unidades formadoras de colonias de levadura/mL equivalente. De esta forma, cada una de las cinco variantes de medio de cultivo se sembró con cada una de las tres cepas. A partir del propio instante de la inoculación se realizó la primera medición de DO, mediante el empleo de un turbidímetro digital, con precisión de 0,01 y a una longitud de onda 660 nm. Las lecturas se repitieron cada una hora durante las primeras 12 h y cada 12 h durante un período de cinco días, para un total de 990 mediciones. Se emplearon cinco controles para medio de cultivo, consistente en el propio medio sin sembrar y que actuaron como el correspondiente blanco para las mediciones de DO. La temperatura se estableció como variable control, el sistema experimental fue colocado en la incubadora a 150 min^{-1} y 30°C ²¹.

Para medir el efecto de los medios de cultivo y cepas de levadura, sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la variable respuesta la DO, se establecen cinco niveles para el factor medio de cultivo (0, 10, 20, 30 y 40 % vinaza); el cero representa el medio de SDB; tres niveles para el factor cepa con dos réplicas, para un total de 45 unidades experimentales. El volumen de la unidad experimental fue de 20 mL, el 10 % de este, representó el inóculo añadido.

Se construyeron a través de Excel, las curvas de crecimiento de las cepas, que permiten comparar su cinética de crecimiento en los diferentes medios de cultivo. Se utilizó un análisis estadístico de comparación de varias muestras de los datos de DO, obtenidos por cada medio de cultivo y tipo de cepa, solo para el tiempo donde fue alcanzada la fase estacionaria de forma similar por los distintos tipos de cepa. Fue necesario en primer lugar, determinar si estos se ajustaban a una distribución normal, de ser así, se aplicaría un análisis de varianza simple por cada factor, en caso contrario, se emplearía

la prueba de Kruskal-Wallis, como criterio comparativo. Se empleó Statgraphics Centurion XV, para una probabilidad del 95 %, lo que permitió establecer los factores de mayor significancia sobre la variable respuesta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la vinaza de *Agave cocui*

A partir de los parámetros fisicoquímicos de la vinaza recolectada, se realizó la comparación de las muestras y se estableció que no existen diferencias significativas entre las medias de cada respuesta para los siete alambiques seleccionados, puesto que el valor-P (razón-F) $\geq 0,05$ (Tabla 1). Esto valida el empleo de una muestra compuesta de vinaza en la caracterización y su uso en la fase experimental.

Tabla 1. Comparación de muestras para los diferentes parámetros analizados por alambique

Parámetro	Razón-F	Valor-P
°Brix	0,83	0,5638
Conductividad eléctrica (mS/cm)	2,61	0,0651
Temperatura (°C)	0,86	0,5464
pH	2,68	0,0600

Las características fisicoquímicas analizadas de la muestra compuesta y su comparación con los límites permisibles estipulados (LPN)⁵ se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la vinaza de *Agave cocui*

Parámetro	Promedio*	Desviación estándar	LPN
Azúcares totales, AT (%)	0,35	$\pm 0,02$	-
Sólidos totales, ST (mg/L)	7 500	± 35	-
Sólidos suspendidos, SS (mg/L)	3 950	± 40	80
DQO (mg/L)	17 960	$\pm 1 692$	350
Fósforo (mg/L)	0,10	$\pm 0,01$	10
Nitrógeno total (mg/L)	650	± 40	40
pH	3,68	$\pm 0,01$	6-9
Conductividad eléctrica (mS/cm)	4,23	$\pm 0,01$	-
Sulfatos (mg/L)	442,20	$\pm 5,86$	1000
Carbono orgánico total (%)	2,41	$\pm 0,03$	-

*El valor señalado es el promedio de los triplicados de cada parámetro analizado

La composición de la vinaza es variable de acuerdo con el tipo de cocuy que se produzca. En el caso de cocuy tipo II se agrega azúcar comercial en la etapa de fermentación. El porcentaje de AT (0,35 %) es indicativo de que parte del azúcar usado para la fermentación no es metabolizada por los microorganismos, lo que provoca una posible inhibición por sustrato y se refleja en los altos tiempos de fermentación (5-8 días) y los bajos rendimientos de etanol en el proceso artesanal (5,5-7,85 %). Los ST de la vinaza de *Agave cocui* son menores a los reportados para las vinazas tequileras

(39 910 mg/L), probablemente por alguna práctica operacional distinta²². Los SS, además de que superan el valor establecido⁵, representan un 50 % de los ST del efluente, justificando la posibilidad de emplear un pretratamiento (filtrados, tanque ecualizador, tanques de sedimentación-floculación) donde se removería parte importante de la carga orgánica del desecho para facilitar su tratamiento o reutilización.

Comparativamente tanto la vinaza tequilera como la del *Agave cocui* poseen características semejantes en cuanto los parámetros fisicoquímicos. El intervalo para la DQO es muy amplio, fundamentalmente por el tiempo de reposo en el alambique, tipo de bebida (pura o con azúcar adicionada), tratamiento preliminar a la muestra (tiempo de decantación y tamaño del tamiz en el filtrado) y tiempo de conservación de la muestra desde su recolección directa en el campo hasta el momento de la medición.

En el caso de la vinaza de *Agave cocui*, el valor promedio de DQO fue de 17 960 mg/L, menor que los reportados para tequilas y tequilas 100 %, 55 214 mg/L y 66 257 mg/L respectivamente²². Considerando que es vinaza tipo II, la cantidad de fibra es menor, por lo que produce una menor DQO. Sin embargo, dicho resultado excede el valor máximo permisible estipulado en la norma venezolana de descargas a cuerpos de agua y/o suelos (350 mg/L).

El valor experimental promedio de pH (3,68) de la muestra confirma lo reportado por otros autores^{19,22}, característica común de vinazas obtenidas de diferentes materias primas. La presencia de sales en la vinaza, reflejada en el alto valor de conductividad, está asociada al tipo de agua utilizada para la elaboración de la bebida y los suelos donde se cultiva la planta de *Agave*. Según López y Morales²³, provienen de fuentes naturales de la zona, y sin ningún tratamiento previo, es decir, son aguas de alto tenor salino. Se observaron concentraciones promedio de sulfatos (442,20 mg/L) por debajo del valor máximo aceptable (1 000 mg/L). El sulfato es un ión permanente y no tóxico; sin embargo, las altas concentraciones del mismo pueden desequilibrar el ciclo natural del sulfuro²⁴. El contenido de carbono orgánico total está íntimamente relacionado con la materia orgánica presente y puede favorecer el crecimiento de los microorganismos, siempre y cuando sea de fácil degradación.

3.2 Caracterización microbiológica

La caracterización de los microorganismos a partir de sus características macroscópicas y microscópicas, posibilita inferir los posibles usos biotecnológicos que se den a este desecho. Las observaciones directas al microscopio óptico mostraron la existencia de restos de mohos y abundantes levaduras; este hallazgo motivó la realización de siembras en SDA que permitieron precisar el predominio de hongos levaduriformes en relación a los filamentosos; se encontraron escasas bacterias. Las principales características de estos hallazgos se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales características de la microbiota presente en la vinaza

Características macroscópicas	Características microscópicas	Tipo de microorganismo
Colonias pequeñas, blancas y cremosas	Micelio unicelular, de forma ovoide, sin yemas ni pseudomicelio	Levaduras
Colonias pequeñas blancas de textura aterciopelada.	Micelio vegetativo septado, sin fíbulas; hifas conidióforas cortas terminadas en una cabeza conidial cubierta de conidiosporas.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Colonias pequeñas, de bordes regulares, aspecto cremoso y color beige.	Bacilos gramnegativos rectos, aislados o agrupados en parejas	Bacterias
Colonias de aspecto terroso, blancas con partes amarillas y negras; al pasar los días se tornan negras. Producen pigmentos amarillos que difunden al medio de cultivo.	Micelio vegetativo septado, sin presencia de fíbulas; abundantes hifas conidióforas transparentes con conidiosporas negras en torno a la cabeza conidial.	<i>Aspergillus niger</i>
Colonias de aspecto terroso, color verde oliva, con zonas amarillas hacia el centro.	Micelio vegetativo septado, sin fíbulas; hifas conidióforas transparentes con conidiosporas verde oscuro en torno a la cabeza conidial.	<i>Aspergillus flavus</i>

Aunque la diversidad microbiana en la muestra pueda parecer excesiva y, en extremo heterogénea, realmente en el caso de los mohos, representantes a los que se pudo identificar de forma más precisa, se trata de especies muy frecuentes en la microbiota epifítica y en los suelos; algo también extensible a las levaduras, máxime cuando las características de ese medio les son favorables¹⁶. En su mayoría muestran similitudes con lo descrito para *Saccharomyces cerevisiae*. Las bacterias gramnegativas pueden acceder por igual vía. Vale aclarar que, el medio SDA, utilizado para este estudio, limita el crecimiento de este tipo de microorganismos, por lo que puede inferirse que la presencia bacteriana en este tipo de producto puede ser aún mayor¹⁶.

3.3 Verificación de género y especie de levaduras aisladas de la vinaza

Todos los aislamientos compatibles con levadura muestran características macroscópicas y microscópicas coincidentes con las descritas para *S. cerevisiae*. La siembra en agar *Corn Meal* y agar Gorodkova para inducir la producción de ascosporas, puso de manifiesto la presencia de las mismas, un rasgo que, aunque no exclusivo de *Saccharomyces*, apunta a favor de este género²⁵. Igualmente, la prueba de FUBA, (medio de cultivo harina de maíz con 1 % tween 80); para la promover la formación de pseudomicelio, resultó negativa, otro elemento coincidente con *S. cerevisiae*. Al verificar la capacidad fermentativa de la levadura aislada de la vinaza de *A. cocui*, se constató que, transcurridas las primeras 24 h, había abundante producción de dióxido de carbono en seis de los ocho tubos utilizados (75 %).

3.4 Potencialidad de la vinaza como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

A partir de estos resultados se analizó la cinética de crecimiento de las diferentes cepas de levaduras en cada medio de cultivo (ver la Figura 1).

Se puede evidenciar la existencia predominante de dos de las cuatro fases características de crecimiento de microorganismos, como lo son la fase exponencial y la fase estacionaria. La fase de crecimiento inicia en la hora cero y la estacionaria a las 12 h. La fase de muerte no es

visualizada ya que este crecimiento se midió a través de un método indirecto. Se realizó la pre-adaptación de las cepas en los diferentes medios, antes de su inoculación, esto con la finalidad de poder observar la fase de latencia, esta fue de aproximadamente una hora, luego iniciaron su crecimiento exponencial.

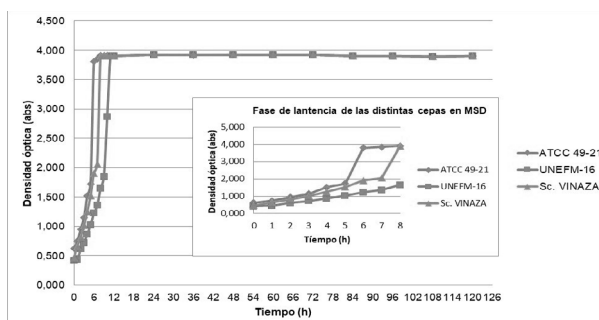


Figura 1. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio SDB

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Pérez y Matallana²⁶; pues es común no encontrar fase de latencia para crecimientos en caldos nutritivos a temperatura óptima. Entre las dos y 12 h, se presenta un crecimiento exponencial que define la cinética de crecimiento de las cepas de levadura en este medio; se puede inferir que durante este tiempo todos los microorganismos están vivos. La fase de latencia final comienza entre las 12 y 120 h, en esta fase las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* crecen y mueren a la misma velocidad, por lo tanto, la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte, manteniéndose constante el valor de la DO.

Comparando el crecimiento de las distintas cepas en este medio, la cepa ATCC 49-21, es una levadura que se emplea en la industria del etanol, por lo tanto, presenta gran capacidad de crecimiento, producción de etanol; y tolerancia elevada al mismo, cuando se crece en sistemas discontinuos en los que están presentes sustratos ricos en carbohidratos, como sucede con el medio SDB. Graficando el logaritmo neperiano de la DO contra el tiempo (ver Figura 2) se puede comprobar que el comportamiento de las cepas en este medio sigue

una cinética de primer orden, propio de bacterias y levaduras cuando se les evalúa en condiciones como las analizadas.

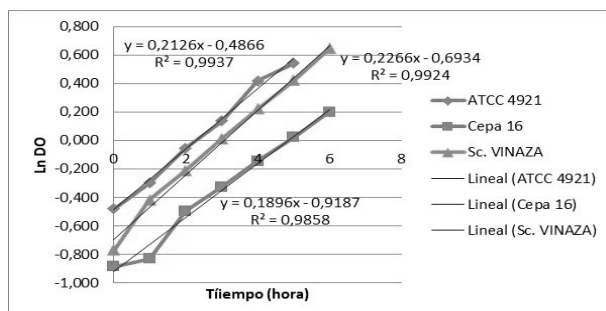


Figura 2. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio SDB

A partir del ajuste lineal obtenido, se observa que el mayor lo tiene la ATCC 49-21, seguida por la Sc. VINAZA y la UNEFM-16. Se puede establecer que poseen un comportamiento similar, es decir, una velocidad específica de crecimiento similar en este medio y que su proceso de metabolización de carbohidratos y nutrientes están en función del tiempo. Este resultado demuestra la existencia de potencialidades muy semejantes en las cepas analizadas no solo en lo referente a su capacidad para metabolizar las fuentes carbonadas orgánicas presentes en el medio donde se crecen, también, una tolerancia compatible frente a los factores adversos que se van concentrando en ese sistema cerrado, uno de ellos el propio etanol¹⁶.

Al realizar un estudio análogo, pero utilizando como sustrato el medio de cultivo elaborado con vinaza al 10 %, se pudo constatar en la Figura 3 un crecimiento muy superior en el caso de la cepa Sc. VINAZA; la UNEFM-16 superó ligeramente a ATCC 49-21.

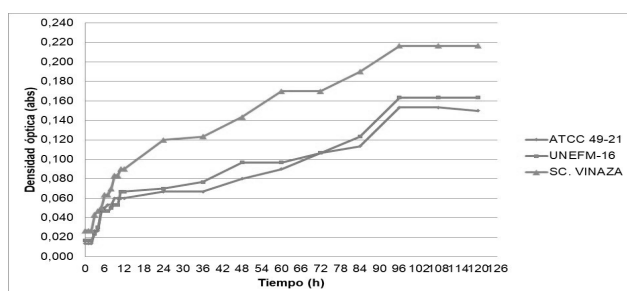


Figura 3. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza Agave cocui 10 %

La fase de adaptación es mayor, aproximadamente cuatro horas. El crecimiento es difuso en comparación con el medio Sabouraud dextrosa y se evidenciaron algunas fases de diauxia; en esta fase la levadura es selectiva para uno de los sustratos, usándolo hasta agotarlo y una vez que esto sucede, comienza a metabolizar el otro, promoviendo su crecimiento; esto es producto de los diferentes sustratos del medio que pueden ser utilizados como fuente de carbono. No se presenta una marcada fase exponencial, por lo tanto, no se puede establecer la cinética por la cual se rigen.

La ATCC 49-21, fue más susceptible en sustratos complejos como la vinaza, considerando que su crecimiento normalmente es promovido en medios ricos en carbohidratos, pudiéndose inferir que este sustrato no es de fácil metabolización para una levadura que está acostumbrada a crecer en sustratos ricos de fuentes de glucosa; mientras que la Sc. VINAZA fue aislada de la vinaza y es capaz de crecer bajo limitaciones de carbohidratos libres²¹, obtuvieron datos similares para *Saccharomyces boulardii*, la levadura de referencia usada en la evaluación de melaza de caña como sustrato.

La baja concentración de inóculo, permitió llevar un seguimiento del crecimiento de las levaduras en este medio, por lo que las absorbancias iniciales son bajas; en microbiología predictiva lo que interesa modelar es la fase de latencia, aceleración y logarítmica a partir de muy bajas concentraciones microbianas iniciales²⁷.

En la Figura 4 se muestra el crecimiento de las tres cepas de levadura empleadas en la investigación en medio al que se ha incrementado la concentración de vinaza (medio de *Agave cocui* al 20%).

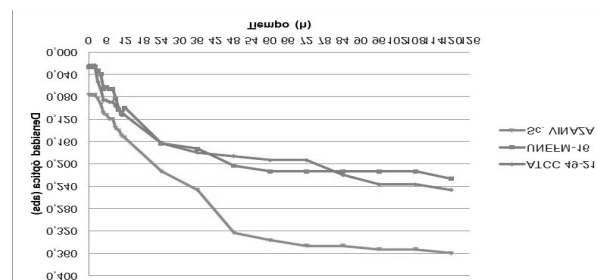


Figura 4. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza Agave cocui 20 %

Como era de esperar, aunque se repiten los comportamientos descritos en la experiencia anterior, el incremento poblacional de la cepa Sc. VINAZA es mucho más intenso y lo logra en un tiempo menor.

La fase de latencia es de aproximadamente tres horas para las tres cepas. Los períodos de diauxia se observan principalmente para la UNEFM-16 y ATCC 49-21 y para la Sc. VINAZA, solo en las primeras 12 h. La fase estacionaria es alcanzada en tiempos diferentes, la UNEFM-16 alcanzó esta fase a las 60 h, mientras que para la ATCC 49-21 y Sc. VINAZA no está bien definida en el tiempo final del experimento, es decir, que entre las 72 y 120 h se presenta un crecimiento difuso de estas cepas y a pesar de que las variaciones de densidad óptica son bajas van en aumento.

Otra evidencia de lo antes expuesto, la constituye el comportamiento de la cinética de crecimiento de estas cepas en un medio de vinaza más concentrado, vinaza al 30 % (Figura 5); que muestra una disminución de dos horas de la fase de latencia en comparación con el medio al 20 % vinaza; Sc. VINAZA no presentó fase de adaptación.

Los períodos de diauxia son menores para ATCC 49-21, UNEFM-16 y Sc. VINAZA, esto principalmente se debe a que a mayores concentraciones de vinaza el sustrato aporta los componentes que necesitan para

su crecimiento. La fase exponencial es alcanzada en tiempos diferentes.

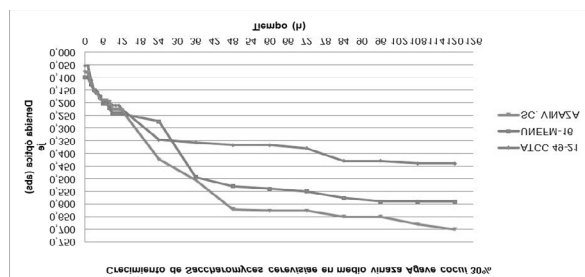


Figura 5. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza Agave cocui 30%

La levadura Sc. VINAZA inicia su fase exponencial más marcada a las 12 h, la UNEFM-16 a las 24 h, ATCC 4921, no presentó una diferenciada fase exponencial. Los resultados permiten deducir que probablemente la ATCC 49-21 y UNEFM-16 son más susceptibles a variaciones de pH y fuentes de nitrógeno, ya que el crecimiento de estos microorganismos en medio Sabouraud fue similar, teniendo en cuenta que la glucosa es una fuente de fácil asimilación, en comparación con las fuentes carbonadas de la vinaza.

Para el medio de mayor concentración, al 40 % en vinaza, los resultados (Figura 6) revelan un mayor crecimiento, los valores de DO alcanzados al culminar la fase exponencial son mayores, alrededor de 1,55-1,85 unidades de absorbancia. La fase de latencia fue de aproximadamente una hora. Cáceres y López²⁷ confirman que la DO aumenta a medida que la cantidad de microorganismos se incrementa; el medio resulta cada vez más turbio haciendo por ende aumentar su absorbancia. La fase de adaptación de las cepas es semejante, al igual que su fase exponencial y el tiempo en el que alcanza la fase estacionaria que fue de 24 h.

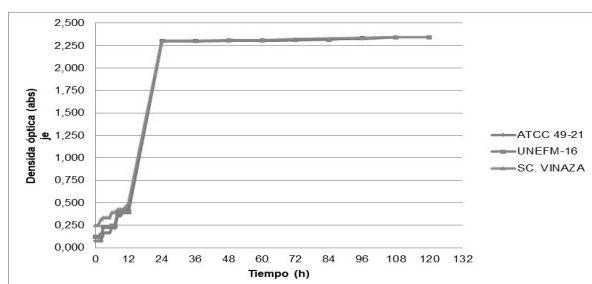


Figura 6. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza Agave cocui 40%

El análisis estadístico de comparación de varias muestras, permitió realizar pruebas para determinar si existen diferencias significativas entre las medias, varianzas y/o medianas del crecimiento alcanzado por las distintas cepas de levadura a las 96 h, tiempo en el que es alcanzada la fase estacionaria para las distintas cepas. La entrada de datos al programa se realizó colocando las observaciones de DO en una sola columna y en la otra se indicó a que cepa pertenecía, para los distintos tiempos de medición. Se realizó en primer lugar una prueba para establecer si los datos se ajustan a una distribución normal, esto con la finalidad de validar

las pruebas estadísticas realizadas con referencia a la desviación estándar.

Tomando en cuenta que el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 y +2, se verificó que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto, el análisis de varianzas se realizó a través de la comparación de medianas, empleando la prueba de Kruskal-Wallis, como criterio comparativo. La prueba de Kruskal-Wallis permitió evaluar la hipótesis nula de que las medianas de la DO para el tipo de cepa es la misma. El estadístico de comparación de rangos fue de 1,0504 y valor-P de 0,5914, por lo tanto, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas, es decir, el tipo de cepa no influye sobre la variable respuesta densidad óptica.

También se aplicó un análisis de comparación de muestras del factor medio de cultivo sobre la variable respuesta densidad óptica a las 96 h, aplicando los criterios establecidos para distribuciones no normales. El estadístico de comparación de rangos fue de 41,31 y valor-P de $2,31 \cdot 10^{-8}$, por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas, es decir, el factor medio de cultivo influye sobre la variable respuesta densidad óptica. En la Figura 7, se puede apreciar lo mencionado.

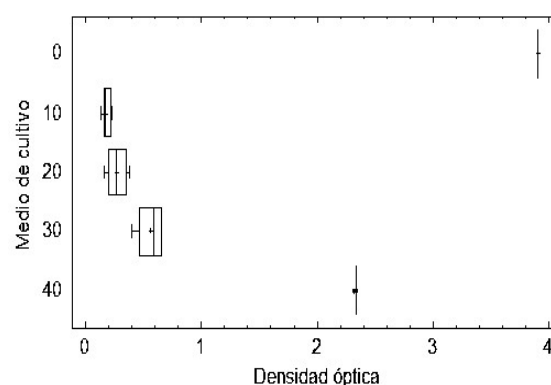


Figura 7. Caja y bigotes para densidad óptica por medios de cultivo

El gráfico de cajas y bigotes (Figura 7) permitió visualizar cuáles medianas son significativamente diferentes, unas de otras. Entre los medios vinaza al 10, 20 y 30 %, no existen diferencias significativas, estas se presentan entre estos niveles, y los niveles al 40 % y SDB. No es comparable la respuesta del medio vinaza al 40 % con el SDB, sin embargo, estos resultados confirman que este medio favorece en gran medida el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Sanz y col.²⁸ reportan similares resultados para vinazas de caña.

4. CONCLUSIONES

1. El análisis de las características fisicoquímicas de la vinaza, permite establecer que su descarga en el suelo y cuerpos de agua, viola la normativa ambiental vigente, por lo tanto, es necesario la implementación de alternativas de aprovechamientos y/o tratamiento de este residual.

2. Según el estudio de la flora fúngica, realizado a la vinaza de *Agave cocui*, se evidencia que las levaduras representan los microorganismos predominantes en este residual, a su vez existe la presencia de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*), así como de bacterias en forma de bacilo, se trata de especies muy frecuentes en la microbiota epifítica y en los suelos.
3. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre las cepas empleadas, el rol desempeñado por la Sc. VINAZA y en segundo lugar la UNEFM-16, medido a través de su crecimiento en los distintos medios de cultivo, es indicativo que estas levaduras pueden adaptarse fácilmente a sustratos complejos como la vinaza.
4. En el medio de cultivo vinaza al 40 % fue donde se obtuvo una respuesta más cercana a la del medio comercial, es decir, el aumento de la concentración de vinaza en los medios evaluados promueve el crecimiento de esta levadura.

REFERENCIAS

1. Sigüencia, J.; Delgado, J.; Posso, F.; Sánchez, J. (2020). Estimación del potencial de producción de bioetanol para los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, **2020**, 2, 3.
2. Del-Gobbo, L.M.; Colin, V.L. Fungal technology applied to distillery effluent treatment. In: Prasad, R.; Aranda, E., editors.: Springer, **2018**. p. 185-197.
3. Chirinos, E.; Ferrer, J.; Barreto, G. *Tratamientos biológicos para vinazas de destilería*. Presentado en el IV Simposio Internacional de Química, Cayo Santa María, Villa Clara, Cuba, junio 7-10. **2013**.
4. Ferrer, J. Estudio de la oxidación de la vinaza del agave cocui mediante procesos fenton y foto fenton. Trabajo especial de grado como requisito para optar al título de magister en ingeniería química. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. **2009**.
5. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. Decreto N° 883, Gaceta Oficial N° 5021, Venezuela. **1995**.
6. España, E.; Mijangos, J.; Barahona, L.; Domínguez, J.; Hernández, G.; Alzate, L. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*. **2011**, 29, 12, 1235-1250.
7. Parsaei, M.; Kiani, M.; Karimi, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy*. **2019**, 122, 117-125.
8. Fito, J.; Tefera, N.; Kloos, H.; VanHulle, S.W.H. Anaerobic treatment of blended sugar industry and ethanol distillery wastewater through biphasic high rate reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **2018**, 53, 7, 676-685.
9. Tiwari, P.C.; Warade, A. Technology for waste management in distillery. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **2015**, 9, 9, 105-108.
10. Mornadini, M.; Quaiá, E. Alternativas para el aprovechamiento de la vinaza como subproducto de la actividad sucroalcoholera. *Avance Agroindustrial*. **2013**, 34, 2, 1-12.
11. Noa, A.; Pérez, O.; Zumalacárregui, L.; Pérez, J.L. Simulation of concentration and incineration as an alternative for vinasses' treatment. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **2020**, 19, 3, 1265-1275.
12. Christoforetti, C.A.; Escher, J.P.; Correia, J.E.; Urbano, J.F.; Fontanetti, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Management*. **2013**, 33, 2752-2761.
13. Alonso, D.; Garrido, N.; Pérez, O.; Zumalacárregui, L. Alternativas tecnológicas para reducir el volumen de las vinazas de la industria alcohólica y su tratamiento. *Centro Azúcar*. **2016**, 43, 1, 70-79.
14. Guardia, L.; Ruiz, M. Reutilización de vinazas producidas durante la destilación alcohólica. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. **2010**.
15. Yegres, F.; Fernández, G.; Padín, C.; Rovero, L.; Richard, N. *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación del licor de Cocuy. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **2003**, 23, 1, 51-54.
16. Barreto, G. Tópicos avanzados de Microbiología. Universidad de Camagüey. Cuba. **2012**.
17. Romero, M.; Silva, M. Evaluación de cultivos hidropónicos de pimentón utilizando soluciones nutritivas a base de vinaza de cocuy. Trabajo especial de grado para optar al título de ingeniero químico. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Venezuela. **2007**.
18. Campos, Y.; Chirinos, E. Efectos de la incorporación de una mezcla vinaza de cocuy- vermicompost sobre las propiedades químicas y biológicas del suelo. Caso Serie "El Jefe" municipio Miranda del estado Falcón. Trabajo especial de grado para optar al título de Especialista en calidad ambiental. Instituto Universitario de Tecnología "Alonso Gamero", Coro, Venezuela. **2010**.
19. Leal, I.; Chirinos, E.; Leal, M.; Morán, H.; Barrera, W. Caracterización fisicoquímica de la vinaza del Agave cocui y su posible uso agroindustrial. *Multiciencias*. **2003**, 3, 2, 83-88.
20. Mendoza, M. Importancia de la identificación de levaduras. *Rev. Soc. Ven. Microbiología*. **2005**, 25, 1, 15-23.
21. Fajardo, E.; Sarmiento, S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. **2007**.
22. CIATEJ. Ciencia y tecnología del tequila; avances y perspectivas (Primera ed.). México. **2004**.
23. Leal, I.; Miquilena, R.; Morán, H. Evaluación del proceso de destilación del Cocuy de Pecaya a partir de la composición de los volátiles mayoritarios. *Multiciencias*. **2007**, 7, 2, 181-189.
24. Silva, A.; Varesche, M.; Foresti, E.; Zaiat, M. Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochemistry*. **2002**, 37, 9, 927-935.
25. Pelczar, M.J.; Reid, R.D.; Chan, E.C.S. Microbiología. McGraw-Hill. México. pp. 211-214; 223. **1991**.

26. Pérez, B.; Matallana, E. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Applied and environmental Microbiology*. **2005**, 71, 11, 6831-6837.
27. Cáceres, G.; López, A. Modelamiento microbio-lógico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo especial de grado para optar al título de ingeniería en producción agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad de la Sabana. Bogotá, Colombia. **2002**.
28. Sanz,; Montero, K.; Díaz, R. Utilización de la vinaza como alternativa para aliviar el efecto destructivo del vertimiento de desechos en la bahía de Santiago de Cuba. *Tecnología Química*. **2005**, XXV, 2, 32-38

Effect of imidazolium-based ionic liquids on the asphaltenes average size in crude oil and water-in-oil emulsions

E.E. Banda-Cruz, A.R. Lara-Hernández, N.V. Gallardo-Rivas*, U. Páramo-García, R.D. Martínez-Orozco.

Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. Prol. Bahía de Aldhair y Av. De las Bahías, Parque de la Pequeña y Mediana Industria, 89600, Altamira, Tamaulipas, México.

Efecto de los líquidos iónicos a base imidazol en el tamaño promedio de los agregados de asfaltenos en emulsiones de crudo y agua-crudo

Efecte dels líquids iònics a base d'imidazol en el volum mitjà dels agregats d'asfaltens en emulsions de cru i aigua-cru

RECEIVED: 6 JULY 2020; REVISED: 12 DECEMBER 2020; ACCEPTED: 31 DECEMBER 2020

ABSTRACT

Water-in-oil emulsions are ubiquitous in the oil industry due to the presence of polar compounds like asphaltenes and resins that act as natural surfactants. A key parameter in flow properties is viscosity, mainly when its value is high a practical solution use of viscosity reducers. In this work, two imidazolium-based ionic liquids with long alkyl chains inserted into their structures was used to simulate the natural interaction and to evaluate the aggregation behavior of asphaltenes in water-in-oil (W/O) emulsions. Dynamic light scattering (DLS) results showed that both the added ionic liquid and alkyl chain length of imidazolium cations modified the asphaltene average size. These changes in aggregates size was observing viscosity changes induced by concentration of ionic liquids According to zeta potential study, alkyl chain length of imidazolium cation affected the stability and surface charge of asphaltenes; although surface charge test suggest interaction between asphaltenes and ionic liquids, is not enough to achieve its complete dispersion and decreases viscosity of W/O emulsions. Flocculated asphaltenes from crude oil solutions was study by TEM. The result shows that the asphaltenes are constituted of nanoparticles. Aggregation behavior of asphaltenes revealed the complex molecular structure and interaction of asphaltenes in solution.

Keywords: Crude oil, Dynamic light scattering, Ionic liquids, Rheology, Water-in-oil emulsions.

RESUMEN

Las emulsiones de agua-crudo están omnipresentes en la industria petrolera, debido a la presencia de compuestos polares como asfaltenos y resinas que actúan como tensioactivos naturales. Un parámetro clave en las propiedades de flujo es la viscosidad, principalmente cuando su valor es alto, una solución práctica es utilizar reductores de viscosidad. En este trabajo, se utilizaron dos líquidos iónicos a base de imidazolio con largas cadenas de alquilo insertadas en su estructura para simular la interacción natural y evaluar el comportamiento de agregación de los asfaltenos en emulsiones de agua en crudo (W/O). Los resultados de la dispersión dinámica de la luz (DLS) mostraron que tanto el líquido iónico, como la longitud de la cadena de alquilo de los cationes de imidazolio modificaron el tamaño medio de los asfaltenos. Estos cambios en el tamaño de los agregados producen cambios en la viscosidad, inducidos por la concentración de los líquidos iónicos. De acuerdo al estudio de potencial zeta, la longitud de la cadena de alquilo del catión imidazolio afectó la estabilidad y la carga superficial de los asfaltenos; aunque la prueba de carga superficial sugiere interacción entre asfaltenos y líquidos iónicos, no es suficiente para lograr su completa dispersión y disminuye la viscosidad de las emulsiones W/O. En TEM se estudiaron los asfaltenos floculados de las soluciones de petróleo crudo. El resultado mostró que los asfaltenos están constituidos por nanopartículas. El comportamiento de agregación de

*Corresponding author: nohvigari@itcm.edu.mx

los asfaltenos reveló la compleja estructura molecular y la interacción de los asfaltenos en solución.

Palabras clave: petróleo crudo, dispersión dinámica de luz, líquidos iónicos, reología, emulsiones de agua en crudo.

RESUM

Les emulsions d'aigua-cru estan omnipresents en la indústria petrolera, a causa de la presència de compostos polars com asfaltens i resines que actuen com tensioactius naturals. Un paràmetre clau en les propietats de flux és la viscositat, principalment quan el seu valor és alt. Una solució pràctica és utilitzar reductors de viscositat. En aquest treball, es van utilitzar dos líquids iònics a base d'imidazolio amb llargues cadenes d'alquil inserides en la seva estructura per simular la interacció natural i avaluar el comportament d'agregació dels asfaltens en emulsions d'aigua en cru (W/O). Els resultats de la dispersió dinàmica de la llum (DLS) van mostrar que tant el líquid iònic, com la longitud de la cadena d'alquil dels cations d'imidazolio van modificar el volum mitjà dels asfaltens. Aquests canvis en el volum dels agregats produeixen canvis en la viscositat, induïts per la concentració dels líquids iònics. D'acord a l'estudi de potencial zeta, la longitud de la cadena d'alquil del catió imidazolio va afectar l'estabilitat i la càrrega superficial dels asfaltens; encara que la prova de càrrega superficial suggereix interacció entre asfaltens i líquids iònics, no és suficient per aconseguir la seva completa dispersió i disminueix la viscositat de les emulsions W/O. En TEM es van estudiar els asfaltens floculats de les solucions de petroli cru. El resultat va mostrar que els asfaltens estan constituïts per nanopartícules. El comportament d'agregació dels asfaltens va revelar la complexa estructura molecular i la interacció dels asfaltens en solució.

Paraules clau: petroli cru, dispersió dinàmica de llum, líquids iònics, reologia, emulsions d'aigua en cru.

INTRODUCTION

Crude oil is one of the major forms of non-renewable fossil fuel and fundamental raw material for a wide variety of products in the petrochemical industry. During its extraction it is usually accompanied by residual water as well as a combination of organic and inorganic compounds¹. Due to the depletion of conventional light crudes, the oil industry is increasingly turning to unconventional oil resources such as heavy crude oil (HCO)^{1,2}. Estimates indicate that about 80% of the exploited crude oil exists in an emulsion state, mainly as water-in-oil (W/O) type due to the presence of water in the extractions wells³.

Although the chemical composition of the oil is very variable and complex, it is usually grouped into four major fractions according to their solubility and aromaticity: saturates, aromatics, resins and asphaltenes,

traditionally known as the acronym of SARA fraction⁴. Consequently, the viscosity of crude oil at given temperature and pressure is a function of its composition, and the stability of W/O emulsions is related to the amount of asphaltenes and resins present in crude oil, which act as natural surfactants^{5,6}. These surface-active components prevent water-droplet coalescence by the formation of an adsorption layer at the water-oil interface⁷.

Asphaltenes are aromatic compounds of higher polarity and molecular weight in the crude oil, besides presenting a high tendency to self-aggregation; whereas the resins are defined as the fraction of crude oil constituted by aromatic-ring aggregates, with similar structure that asphaltenes but much lower molecular weight⁵. Several authors have pointed out that asphaltenes content is the most important factor in the formation of emulsions^{3,8,9}. However, resins also play a key role in emulsion-stability since they act as peptizing agents of asphaltenes^{9,10}, favoring their dispersion as has been shown in works on the stability of emulsion through different evaluation techniques used, such as electrical conductivity measurements¹¹, light scattering methods¹² as well as observations by optical and electron microscopy¹³. In addition, the amount of asphaltenes and resins determines and limits the viscosity and processing of the oil, since they constitute an important part of the dispersed phase of the crude oil, impacting their rheological properties^{8,14}.

In this context, the oil industry has been investigated the use of solvents and dispersants of aromatic aggregates to improve the viscosity of heavy oils. To date, various viscosity reducing agents have been employed. The efficiency of the dispersants depends on their polarity and structure, i.e. the dispersants must have an double polar and non-polar affinity, and must be adsorbed on the surface of asphaltenes aggregates or bound to the polar group of asphaltenes molecules¹⁵. Various ionic liquids that may interact with asphaltenes have been reported, and the most important reason for the choice of ionic liquids is that they exhibit a wide variety of functionalities, such as aromatic and acid-base interactions. These functionalities cause ionic liquids to interact with asphaltenes, leading to modification on the properties of crude oil at the molecular level, reducing its viscosity^{16,17}.

Several researchers have used functionalized molecules to enhance stability and lower viscosity of crude oil. The ionic liquids were first tested by Hu and Guo in 2005 in order to reduce the precipitation of asphaltenes and improve stability of crude oil¹⁸. Subramanian et al., (2015) tested different ionic liquids in order to reduce viscosity of heavy and extra-heavy crude oils¹⁷. Their results showed that ionic liquids with higher tail lengths are more effective to reduce viscosity, but there are not exist a complete relation between alkyl tail length and the ability to reduce viscosity. Also anion charge density and type of head group influences through stronger interactions with the asphaltenes molecules. Finally, a high concentration of ionic liquid increases its self-associate effect, with an opposite effect in viscosity reduction. Sakthivel et al., (2016) investigated the

dissolution behavior of heavy crude oil in presence of eleven ionic liquids from lactam, alkyl ammonium and hydroxyl ammonium families by using organic solvents, through spectroscopic investigations¹⁹. They show that a very low concentration of ionic liquids has an effect on the heavy crude oil dissolution, and the interactions between ionic liquid and polar moieties of heavy crude oil are responsible of this efficient dissolution of heavy crude oil when ionic liquids were added.

The purpose of this work was to evaluate the effect of two imidazolium-based ionic liquids with linear carbon chain (12 and 14 carbons) in the asphaltenes aggregation and their rheological behavior in water-in-oil emulsion. The ILs were added based on a standard solution of crude oil in cyclohexane, and aggregation state of the resulting solutions was monitored by DLS testing. The results were corroborated with rheology study of W/O emulsions and the type of interactions between asphaltenes and both ILs was determined with zeta potential measurements.

MATERIAL AND METHODS

Materials

The Mexican crude sample used in this work has a density of 0.9696 g cm⁻³ with API degree of 14.40, and SARA fractions of 21.66 wt% saturate, 30.57 wt% aromatic, 24.35 wt% resin and 23.41 wt% asphaltene content, respectively.

The ionic liquids 1,3-dodecylimidazolium bromide, (C₁₂Im) and 1,3-tetradecylimidazolium bromide, (C₁₄Im) are shown in Table 1 and were synthesized according to a reported procedure²⁰. The chemicals used were; imidazole (ReagentPlus®, 99% purity), 1-bromododecane (97% purity), 1-bromotetradecane (97% purity), sodium ethanoate (99% purity), ethyl ether (≥ 99% purity) and ethanol (99.5% purity) were purchased from Sigma Aldrich, México. And used in the dispersion of asphaltenes. Cyclohexane (99.9% purity) was used as solvent for oil-emulsion preparation and supplied by Tedia Company (USA).

EXPERIMENTAL METHODS

Extraction of asphaltenes from heavy crude oil was performed by precipitation method, according to ASTM D2007-80 1983 standard method of the American Society for Testing and Materials (ASTM).

The water-in-oil emulsions were prepared at room temperature and containing 30% (v/v) aqueous solutions. Once the mixture was homogenized, the ionic liquids were added at two different concentrations of 200 and 400 mg L⁻¹, respectively. The average aggregate size and zeta potential measurements were carried out using a Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 system (He-Ne laser, 633 nm, 4 mW) from Malvern Instruments. Scattering light was detected at 173 degrees by the automatically adjusted laser attenuation filters in a cell. All measurements were performed at 25°C in order to maintain constant viscosity ($\eta = 1.0200$ cP and the refractive index of 1.427).

The aggregation state of oil-in-cyclohexane and water-in-oil emulsions were determined based on a standard solution of 100 mg L⁻¹ of oil in cyclohexane, to which the additives were added and homogenized by ultrasonic for 20 min (Crest Ultrasonics PowerSonic™) for their immediate evaluation. Average aggregate size was monitored during the first 100 minutes. Figure 1 shows the experimental procedure followed for the preparation of heavy crude oil dissolution with ionic liquids. Zeta potential measurements were conducted at constant temperature of 25°C. The measured electrophoretic mobility and zeta potential was estimated according to the Smoluchowski model²¹⁻²³.

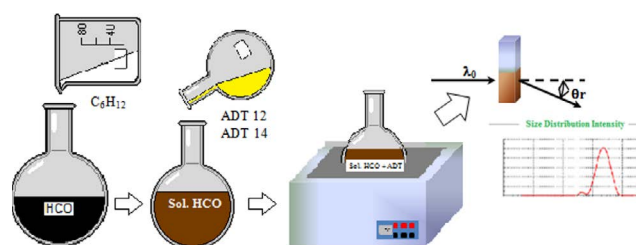


Figure 1. Scheme of methodology for preparation of oil-ionic liquid-cyclohexane solutions.

Table 1. Structure and label of the evaluated ionic liquids.

Ionic liquid	Label	Cation	Anion
1,3-dodecylimidazolium bromide	C ₁₂ Im		Br ⁻
1,3-tetradecylimidazolium bromide	C ₁₄ Im		Br ⁻

Shape and size of flocculated asphaltenes were examined through HRTEM using a JEOL JEM-2200FS equipment. Crude oil suspensions in ethanol were prepared by applying 5 min of ultrasound. Subsequently the solution was dripped onto the grid and left to dry with an incandescent lamp. The rheological behavior of the solutions was analyzed by a rheometer (MCR 301 Physica Anton Paar), with parallel plate geometry (4.958 mm diameter). Measurements were performed at constant temperature of 25°C and a shear rate from 1 to 100 s⁻¹. All experimental measurements were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Solvent-oil and ionic liquid-solvent-oil emulsions dispersion

In asphaltenes precipitation assessment, DLS is the more used experimental technique. This technique involves direct measurement of the effective diffusion coefficient from a set of suspended particles following Brownian movement within a viscous medium. When the particles grow slow enough, it is possible to record its kinetics. However, application of DLS to crude oil and asphaltene solutions has its challenge since opacity of these systems hinders light to pass through them. Asphaltenes are operationally defined as the crude oil fraction soluble in toluene and insoluble in n-heptane. The solubility must be understood here as not generating a precipitate and not as molecular solubility, since asphaltenes are known to form aggregates in toluene²⁴ and in cyclohexane²⁵.

DLS is based on determining the diffusion coefficient of colloidal particles by measuring the spectral composition (correlation function) of scattered light²⁶. Assuming a spherical particle, the radius of the particle can be calculated by the Stokes-Einstein equation, which relates the diffusion coefficient (D ; m² s⁻¹), the shear viscosity η of the medium (η ; Kg m⁻¹ s⁻¹) and the average hydrodynamic radius of the R_H particles (R_H ; m)²⁷:

$$D_t = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (1)$$

where K_B is the Boltzmann constant ($K_B = 1.380648 \times 10^{-23}$ J K⁻¹) and T is the absolute temperature (T ; K).

Figure 2 shows the aggregation behavior of crude oil-in-cyclohexane. The initial average size of crude aggregates in cyclohexane (ZAV) was 55 nm with a standard deviation of 5.24 nm, and this value remained stable over the analyzed time range. These results show that cyclohexane favors aggregation of asphaltene as a diluents as suggested by Pereira et al., (2011)²⁸ because it maintains the asphaltene in molecular state, favoring the association of higher molecular weight species while the lower molecular weight fraction remains as individual molecules or in states of lower aggregation.

Banda et al., (2017) evaluated the aggregation state of Mexican crude oil solutions by DLS and they concluded that this phenomenon is influenced by crude oil composition, specifically by the amount of resins²⁹. In this work, results indicant that the addition of ionic

liquids modifies the aggregation behavior of the crude in cyclohexane. The presence of C_{12} Im and C_{14} Im at a concentration of 200 mg L⁻¹ induces an increase in aggregate size by about 660-761 nm and 600-680 nm, respectively. However, when the concentration of both ILs increased to 400 mg L⁻¹, there was a decrease in the size of the aggregates at values between 280-220 nm for C_{12} Im and 410-460 nm for C_{14} Im.

The difference in aggregate size by DLS was attributed to the effect of alkyl chain length in the presence of both C_{12} Im and C_{14} Im ILs. Wang et al., (2011) have pointed out that a higher alkyl chain length decreases the value of the critical micellar concentration, by solvophobic effects of the alkyl chain of the ionic liquid³⁰. Pino et al., (2009) reported that the micellar behavior of two ionic liquids in the presence of organic solvents is affected by the alkyl chain length and a greater amount of organic solvent³¹. This effect allows to explain the decrease of the aggregate size by increasing the concentration of C_{12} Im and C_{14} Im, since an increase in the concentration of the ILs affects the micellar dynamics of the aggregates and, therefore, the size observed by DLS³²⁻³⁵. At this point our results may suggest an interaction between ILs and crude, however, perhaps solubility of asphaltenes is also affected by the solvent effect⁹.

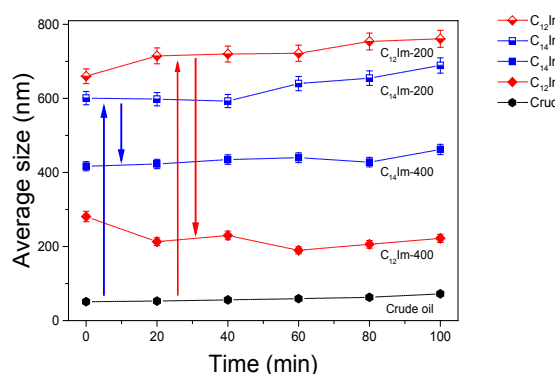


Figure 2. Measurements of aggregate size of the crude oil in cyclohexane at a concentration of 100 mg L⁻¹ and effect of the addition of C_{12} Im and C_{14} Im at concentrations of 200 and 400 mg L⁻¹ in the average size of the aggregates.

Evaluation of water-in-oil emulsions

The rheological properties of a substance provide information regarding flow and deformation characteristics. Viscosity characterizes flow resistance while elasticity is a measure of system-response to stresses. Water-in-oil emulsions exhibit both characteristics: the typical behavior of viscoelastic fluids^{8,36}.

Figure 3 shows the relationship between viscosity of as-prepared emulsions and shear rate (viscosity curves). Viscosity of native crude oil in the evaluated shear rate range was kept constant, and the addition of 30 vol% of water to the crude oil to produce the emulsion, induces an increase in viscosity, which decreases with increasing shear rate. This feature reflects a non-Newtonian shear-thinning behavior⁸. Similar results were reported by Ariffin et al., (2016)³⁷ where an increase in the water content produces an increase in the viscosity of the emulsion with a viscoelastic behavior.

The addition of ionic liquids at a concentration of 200 mg L⁻¹ into the emulsion increased the viscosity. The increase in viscosity under these conditions is related to the increase in average aggregate size as indicated by DLS results, with maximum viscosities of ~9 Pa.s for C₁₂Im and ~8.1 Pa.s for C₁₄Im respectively; that is, a higher viscosity increase in presence of ionic liquid with shorter alkyl chain. When the concentration of ILs increased to 400 mg L⁻¹, a decrease in viscosity occurred (~6.8 Pa.s for C₁₂Im and ~6.3 Pa.s for C₁₄Im), which is associated to aggregate size decreasing. In addition, the shape of the curves showed that as the shear rate increases, emulsion viscosities are reduced. As the shear rate increase, the molecules tend to break down into individual flocs, thus resistance to spindle rotation is less and eventually reducing the emulsion viscosity. This phenomenon is also known as non-Newtonian shear thinning behavior³⁷. Similar result was reported by Subramanian et al., (2015)¹⁷ where the addition of the ILs in the emulsions shows a non-Newtonian shear thinning behavior of the emulsion. From the physical point of view, it means that the resistance to flow decreases when the spill velocity increases.

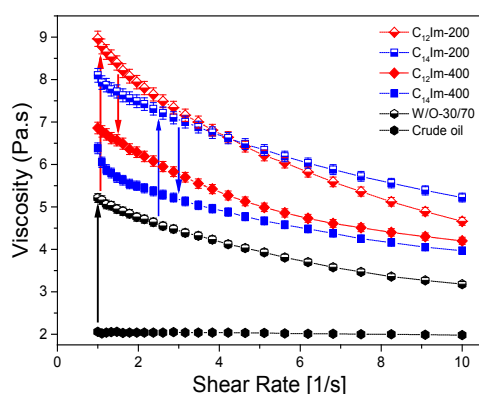


Figure 3. Viscosity vs shear rate dependence of crude oil, water-in-oil emulsions and effect of C₁₂Im and C₁₄Im ionic liquids. The addition of C₁₂Im and C₁₄Im was carried out at concentrations of 200 and 400 mg L⁻¹.

The results showed that the addition of ILs preserves non-Newtonian rheological behavior with differences in viscosities in the investigated domain. Different rheological behavior of emulsions can also be observed in the flow curve (Figure 4), since the relationship between the shear rate and the shear stress is not linear.

In general, the rheological behavior depends on the chemical composition of the material, its molecular structure and its microstructural organization at the interface. Due both evaluated ILs have an amphiphilic character and similar composition with only different alkyl-chain length, the observed rheological differences may suggest a different microstructural organization³⁸, which result from the solubility/compatibility level between both ILs and asphaltenes in the emulsion. In other words, the behavior of the emulsion is controlled primarily by the properties of amphiphilic molecule surrounding the water droplets in the oil solution. The increase in viscosity is indicative of a certain level of

interactions in the system asphaltenes aggregates-water, but is not sufficient to create a complete dispersion of asphaltenes by the effect of both ILs.

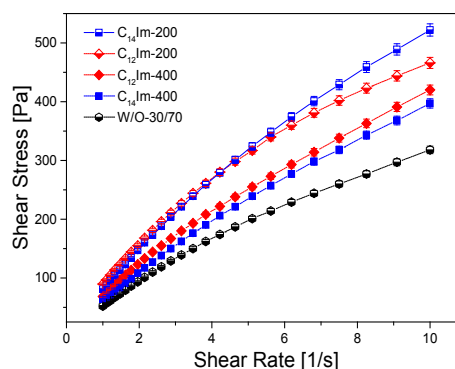


Figure 4. Shear stress versus shear rate for crude oil, W/O emulsion and effect of the addition of ionic liquid C₁₂Im and C₁₄Im emulsion at room temperatures. Flow curves the characteristic non-Newtonian shear-thinning behavior.

Transmission electron microscopy (TEM)

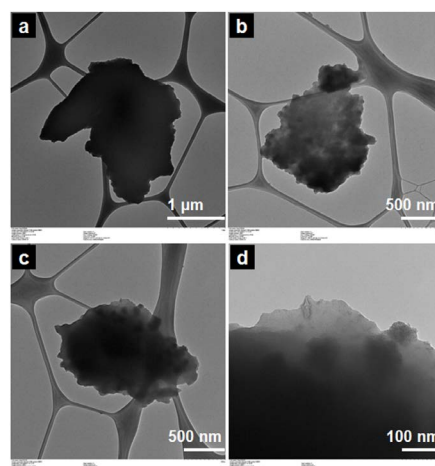


Figure 5. Representative transmission electron microscopy of precipitated crude oil asphaltenes.

Figure 5 shows the transmission electron microscopy images of precipitated asphaltenes. A thick, irregularly-shaped sheet similar to stacked-carbon flakes³⁹ is shown in Figure 5a. This phenomenon may result from the high aggregation tendency of asphaltenes with a resulting in average size in the micrometric scale. Banda et al., (2016) report a similar morphology of asphaltene aggregates, which details their stacked-flakes structure²⁵.

Figure 5b and 5c allows observing that these aggregates of asphaltenes are constituted by nanometric agglomerates. It is possible to appreciate them in various shapes and sizes as shown in Figure 5d. In the upper part of this image, the typical lamellar morphology with irregular edges is observed, suggesting the presence of layered structures resulting from the asphaltenes stacking. Although it was not possible to analyze the size distribution given the contrast, the range of these particles lies in the 300-500 nm size. Similar aggregate sizes have been reported by Banda et al., (2017)²⁹. These

results show the complex structure that asphaltenes possess both in topology and composition and with amorphous structure, since the images did not show the characteristic discernible order of a crystalline material.

According to DLS results, the range of these aggregates lies at 300-700 nm. The difference in size according to the TEM results can be explained on the basis that both techniques provide different information about the size of particles. DLS provides aggregate sizes from hydrodynamic radius of the particle in solution. In contrast, TEM measurement provides real information of dried particle size distributions.

Zeta potential measurements

The zeta potential (ζ) is a key parameter for characterizing the stability of colloidal dispersion and provides information about surface charge associated with the double layer around the colloidal particle⁴⁰. Figure 6 shows the zeta potential of asphaltenes dispersed in an aqueous solution of 1.0 mM NaNO₃. The zeta potential of the asphaltene solution is negative in the pH range from 3 to 10, which decreases slightly as the pH increases, and an isoelectric point (IEP) around pH 3 (~2.7). This value of IEP is close to that reported in the literature⁴¹. The surface charge ζ of asphaltene aggregates is a consequence of ionization of the different surface functional groups which depending on the pH value. According to these results, the asphaltene surface is negatively charged for lower values than pH 3, and positively charged for higher pH values.

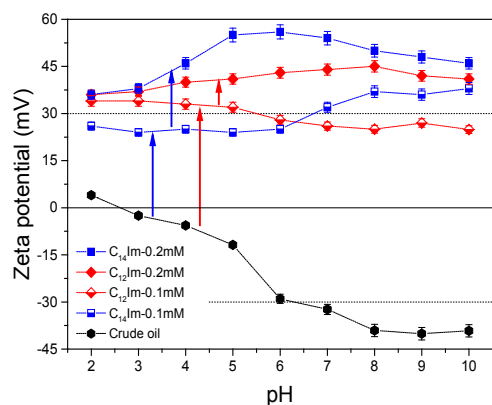


Figure 6. Effect of different concentrations of $C_{12}\text{Im}$ and $C_{14}\text{Im}$ (0.1 y 0.2 mM) on zeta potential of crude oil solution.

These results indicate a favorable electrostatic adsorption of imidazolium cations on negatively charged asphaltene surfaces, and indeed, the addition of $C_{12}\text{Im}$ and $C_{14}\text{Im}$ at different concentrations (0.1 and 0.2 mM) modifies the surface charge of asphaltenes in solution to positive values of zeta potential, in the all evaluated pH range (from 2 to 10), without observable IEP.

This electrokinetic behavior implies electrostatic interactions between imidazolium cations of $C_{12}\text{Im}$ and $C_{14}\text{Im}$ molecules and asphaltene aggregates in the double layer. However, the effect of the alkyl chain also contributes to the adsorption mechanism, because the

difference in magnitude of ζ apparently affect the electrical properties at the interface. At a concentration of 0.1 mM $C_{12}\text{Im}$ and $C_{14}\text{Im}$, the zeta potential is positive and oscillates at a value of 30 mV and without a defined trend in the investigated range. This electrokinetic potential value suggests a moderately stable colloidal stability. For oil solutions with 0.2 mM of both ILs, a stable dispersion was formed because the magnitude of the zeta potential is greater than +30 mV. This result indicates that at a higher concentration of ILs in the solution, the effect of the alkyl chain length can also modify the electrostatic interactions between the polar sites of the asphaltenes aggregates and the imidazolium cations. So, zeta potential is dependent on the length of the alkyl chain⁴², and suggest that the length of the alkyl chain of the imidazolium cation affect the stability and surface charge of asphaltenes aggregates in solution.

On the other hand, these interactions increased the aggregation state of crude oil in cyclohexane. Although DLS results were performed under different experimental conditions compared to the zeta potential test (n-heptane-crude); experimental results indicate that the electrokinetic behavior of asphaltenes can be manipulated in the presence of ionic liquids containing imidazolium cations and different alkyl chains lengths. Therefore, the use of these amphiphilic molecules can give indications on the phenomena of aggregation and precipitation of asphaltenes, as well as the stabilization of water-in-oil emulsions.

CONCLUSIONS

Through the addition of two imidazolium-based ionic liquid with different alkyl length chain in crude oil solutions and water-in-oil emulsions, the asphaltenes aggregation behavior and its rheological features was analyzed. Particular insights of this work are the following:

The addition of ionic liquids modified the aggregation behavior of the crude in cyclohexane, the presence of $C_{12}\text{Im}$ and $C_{14}\text{Im}$ at a concentration of 200 mg L⁻¹ induced an increase in aggregate size but when ILs concentrations increased, a decreased in aggregate sizes was observed. The difference in aggregation behavior by DLS results is attributed to the effect of alkyl chain length between of both evaluated ILs.

The initial increase and later decrease water-in-oil viscosity in the rheological tests were related by the ionic liquids-induced change in aggregate size.

The emulsion behavior was main controlled by the molecular properties of both used ionic liquids, although viscosity change indicative certain level of interactions in the system, apparently is not enough to achieve a complete dispersion of the asphaltenes in solution.

TEM results showed difference in asphaltene aggregate size both in size and shape but they do not allow to differentiate the effects of the ionic liquids in the aggregation behavior, due to the their molecular complexity of asphaltenes.

Zeta potential measurements revealed that the alkyl chain length of the imidazolium cation affect the sta-

bility and surface charge of asphaltenes aggregates in solution, possibly through electrostatic interactions between asphaltenes polar sites and imidazolium cations.

ACKNOWLEDGEMENTS

R. Lara Hernández wants to thank to CONACyT-México (724540/698780) for the degree fellowship granted. The authors thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)/ Projects of Scientific Development to Address National Problems (APN) for the financial support of the No.3676 project. Furthermore we appreciate the funding provided by the Tecnológico Nacional de México with the project No. 5090.19-P.

REFERENCES

- Alboudwarej, H.; Felix, J.; Taylor, S.; Badry, R.; Bremner, C.; Brough, B.; Skeates, C.; Baker, A.; Palmer, D.; Pattison, K.; Beshry, M.; Krawchuk, P.; Brown, G.; Calvo, R.; Triana, J.; Hathcock, R.; Koerner, K.; Hughes, T.; Kundu, D.; Cárdenas, J.; West, C. Highlighting heavy oil, *Oilfield Review* **2006**, 18, 34-53.
- Abdurahman, N.; Rosli, Y.; Azhari, N.; Hayder, B. Pipeline transportation of viscous crudes as concentrated oil-in-water emulsions, *Journal of Petroleum Science and Engineering* **2012**, 90, 139-144.
- Kilpatrick, P. Water-in-Crude Oil Emulsion Stabilization: Review and Unanswered Questions, *Energy & Fuels* **2012**, 26, 4017-4026.
- Qiao, P.; Harbottle, D.; Tchoukov, P.; Masliyah, J.; Sjöblom, J.; Liu, Q.; Xu, Z. Fractionation of Asphaltenes in Understanding Their Role in Petroleum Emulsion Stability and Fouling, *Energy & Fuels* **2017**, 31, 3330-3337.
- Mousavi, M.; Abdollahi, T.; Pahlavan, F.; Fini, E. The influence of asphaltene-resin molecular interactions on the colloidal stability of crude oil, *Fuel* **2016**, 183, 262-271.
- Wong, S.; Lim, J.; Dol, S.; Crude oil emulsion: A review on formation, classification and stability of water-in-oil emulsions, *Journal of Petroleum Science and Engineering* **2015**, 135, 498-504.
- Tchoukov, P.; Yang, F.; Xu, Z.; Dabros, T.; Czarnecki, J.; Sjöblom, J. Role of Asphaltenes in Stabilizing Thin Liquid Emulsion Films, *Langmuir* **2014**, 30, 3024-3033.
- Maia-Filho, D.; Ramalho, J.; Lucas, G.; Lucas, E. Aging of water-in-crude oil emulsions: Effect on rheological parameters, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2012**, 405, 73-78.
- Langevin, D.; Argillier, J. Interfacial behavior of asphaltenes, *Advances in Colloid and Interface Science* **2016**, 233, 83-93.
- Spiecker, P.; Gawrys, K.; Trail, C.; Kilpatrick, P. Effects of petroleum resins on asphaltene aggregation and water-in-oil emulsion formation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, 220, 9-27.
- Varka, E.; Ampatzidis, C.; Kostoglou, M.; Karapantsios, T.; Dutschk, V. On the use of electrical conductance measurements for the stability of oil-in-water Pickering emulsions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, 365, 181-188.
- Makan, A.; Spallek, M.; Du Toit, M.; Klein, T.; Pasch, H. Advanced analysis of polymer emulsions: Particle size and particle size distribution by field-flow fractionation and dynamic light scattering, *Journal of Chromatography A* **2016**, 1442, 94-106.
- Ma, L.; Xu, X.; Zhang, C.; Luo, J. Direct observation of the formation and destruction of the inverted continuous oil phase in the micro-outlet region achieved by the confined diluted O/W emulsion stream, *Soft Matter* **2014**, 10, 7946-7951.
- Ghannam, M.; Hasan, S.; Abu-Jdayil, B.; Esmail, N. Rheological properties of heavy & light crude oil mixtures for improving flowability, *Journal of Petroleum Science and Engineering* **2012**, 81, 122-128.
- Rezaee-Nezhad, E.; Heidarizadeh, F.; Sajjadifar, S.; Abbasi, Z.; Dispersing of petroleum asphaltenes by acidic ionic liquid and determination by UV-visible spectroscopy, *Journal of Petroleum Engineering* **2013**, 1-5.
- Boukherissa, M.; Mutelet, F.; Modarressi, A.; Dicko, A.; Dafri, D.; Rogalski, M.; Ionic Liquids as Dispersants of Petroleum Asphaltenes, *Energy & Fuels* **2009**, 23, 2557-2564.
- Subramanian, D.; Wu, K.; Firoozabadi, A. Ionic liquids as viscosity modifiers for heavy and extra-heavy crude oils, *Fuel* **2015**, 143, 519-526.
- Hu, Y.; Guo, T. Effect of the Structures of Ionic Liquids and Alkylbenzene-Derived Amphiphiles on the Inhibition of Asphaltene Precipitation from CO₂-Injected Reservoir Oils, *Langmuir* **2005**, 21, 8168-8174.
- Sakthivel, S.; Gardas, R.; Sangwai, J. Spectroscopic investigations to understand the enhanced dissolution of heavy crude oil in the presence of lactam, alkyl ammonium and hydroxyl ammonium based ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids* **2016**, 221, 323-332.
- Gallardo-Rivas, N.; Moreno-Guerrero, A.; Mendoza-Martínez, A.; Reyes-de la Torre, A.; Díaz-Zavala, N.; Domínguez-Esquivel, J. Efecto de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de moléculas iónicas en las propiedades reológicas de crudos pesados, *Innovación y desarrollo tecnológico* **2014**, 6, 10-19.
- Frenklach, M. Dynamics of discrete distribution for Smoluchowski coagulation model, *Journal of Colloid and Interface Science* **1985**, 108, 237-242.
- Parra-Barraza, H.; Hernández-Montiel, D.; Lizardi, J.; Hernández, J.; Urbina, R. H.; Valdez, M. A. The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions, *Fuel* **2003**, 82, 869-874.
- Collini, H.; Li, S.; Jackson, M. D.; Agenet, N.; Rashid, B.; Couves, J. Zeta potential in intact carbonates at reservoir conditions and its impact on oil recovery

- ery during controlled salinity waterflooding, *Fuel* **2020**, 266, 116927.
24. Xu, J.; Liu, H. The growth and development of asphaltene aggregates in toluene solution, *Petroleum Science and Technology* **2015**, 33, 1916-1922.
 25. Banda-Cruz, E.; Rivas-Gallardo, N.; Páramo-García, U.; Estrada Moreno, I.; Pozas-Zepeda, D.; Reyes-Gómez, J. Crude oil aggregation by microscopy and dynamic light scattering, *Petroleum Science and Technology* **2016**, 34, 1812-1817.
 26. Maltseva, E.; Gorshkov, A.; Chekantseva, L.; Shishmina, L.; Yudina, N. Influence of aggregation of asphaltenes on the rheological properties of oil, *Russian Journal of Applied Chemistry* **2013**, 86, 1370-1375.
 27. Rahdar, A.; Almasi-Kashi, M. Dynamic light scattering of nano-gels of xanthan gum biopolymer in colloidal dispersion, *Journal of Advanced Research* **2016**, 7, 635-641.
 28. Pereira, J.; Delgado-Linares, J.; Briones, A.; Guevara, M.; Scorzza, C.; Salager, J. The Effect of Solvent Nature and Dispersant Performance on Asphaltene Precipitation from Diluted Solutions of Instable Crude Oil, *Petroleum Science and Technology* **2011**, 29, 2432-2440.
 29. Banda-Cruz, E.; Gallardo-Rivas, N.; Páramo-García, U.; Mendoza-Martínez, A.; Melo-Banda, J. Physicochemical Characterization of crude Oils and the precipitated asphaltenes fraction using UV spectroscopy, *Dynamic Light Scattering and Microscopy*. Mansoor Zoveidavianpoor (Ed.), InTech, **2017**, Chap. 6, 117-135.
 30. Wang, J.; Zhang, L.; Wang, H.; Wu, C. Aggregation Behavior Modulation of 1-Dodecyl-3-methylimidazolium Bromide by Organic Solvents in Aqueous Solution, *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 115, 4955-4962.
 31. Pino, V.; Yao, C.; Anderson, J. Micellization and interfacial behavior of imidazolium-based ionic liquids in organic solvent–water mixtures, *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 333, 548-556.
 32. Baltazar, Q.; Chandawalla, J.; Sawyer, K.; Anderson, J. Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, 302, 150-156.
 33. Liu, X.; Dong, L.; Fang, Y. Synthesis and Self-Aggregation of a Hydroxyl-Functionalized Imidazolium-Based Ionic Liquid Surfactant in Aqueous Solution, *Journal of Surfactants and Detergents* **2011**, 14, 203-210.
 34. Blesic, M.; Marques, M.; Plechkova, N.; Seddon, K.; Rebelo, L.; Lopes, A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution, *Green Chemistry* **2007**, 9, 481-490.
 35. Łuczak, J.; Hupka, J.; Thöming, J.; Jungnickel, C. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, 329, 125-133.
 36. Fingas, M.; Fieldhouse, B. Studies on crude oil and petroleum product emulsions: Water resolution and rheology, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, 333, 67-81.
 37. Ariffin, T.; Yahya, E.; Husin, H. The rheology of light crude oil and water-in-oil-emulsion, *Procedia Engineering* **2016**, 148, 1149-1155.
 38. Merola, M.; Carotenuto, C.; Gargiulo, V.; Stanzone, F.; Ciajolo, A.; Minale, M. Chemical–physical analysis of rheologically different samples of a heavy crude oil, *Fuel Processing Technology* **2016**, 148, 236-247.
 39. Li, K.; Vasiliu, M.; McAlpin, C.; Yang, Y.; Dixon, D.; Voorhees, K.; Batzle, M.; Liberatore, M.; Herring, A. Further insights into the structure and chemistry of the Gilsonite asphaltene from a combined theoretical and experimental approach, *Fuel* **2015**, 157, 16-20.
 40. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release* **2016**, 235, 337-351.
 41. Parra-Barraza, H.; Hernández-Montiel, D.; Lizardi, J.; Hernández, J.; Herrera-Urbina, R.; Valdez, M. The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions, *Fuel* **2003**, 82, 869-874.
 42. Markiewicz, M.; Mrozik, W.; Rezwan, K.; Thöming, J.; Hupka, J.; Jungnickel, C. Changes in zeta potential of imidazolium ionic liquids modified minerals – Implications for determining mechanism of adsorption, *Chemosphere* **2013**, 90, 706-712.

Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Citrus sinensis*

K.C. Córdova- Cisneros¹, A. Sáenz-Galindo¹, J. A. Ascacio-Valdés¹, F. Avalos¹, I. Moggio²,
A. Castañeda-Facio^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza esq. José Cárdenas Valdés col. República, CP. 25280 1, Saltillo, Coahuila, México. ²Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna, San José de los Cerritos, CP. 25294, Saltillo, Coahuila, México.

Síntesis de nanopartículas de plata mediante extractos acuosos de Rosmarinus officinalis y Citrus sinensis

Síntesi de nanopartícules de plata mitjançant extractes aquosos de Rosmarinus officinalis i Citrus sinensis

RECEIVED: 8 JULY 2020; REVISED: 26 NOVEMBER 2020; ACCEPTED: 19 JANUARY 2021

ABSTRACT

In this study, the synthesis of silver nanoparticles (NPsAg) is presented using AgNO_3 as precursor salt and the aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* or *Citrus sinensis* as reducing-stabilizing agent. To obtain the nanoparticles, 25 ml of a 0.1M AgNO_3 solution were added to 10 ml of the previously prepared aqueous extract at room temperature for 24 hours. The extracts were characterized by the HPLC-MS technique, for the determination of the compounds responsible for the reduction of Ag^+ to Ag^0 , and thus to propose a reaction mechanism for the synthesis of NPsAg. The obtained NPsAg were characterized by various techniques such as XRD, confirming their obtaining by means of the ICDD 04-0783 diffraction chart, by SEM micrographs the size of the NPs was determined in a range of 20-60 nm using the *Rosmarinus officinalis* extract as reducing agent and 10-30 nm when the *Citrus sinensis* extract was used, indicating that when using different types of aqueous plant extracts there is a variation in the size of the NPs. Using UV-Vis spectroscopy, the characteristic surface plasmon resonance of silver nanoparticles was found at 430-450 nm and by FT-IR spectroscopy it was confirmed that NPsAg are functionalized.

Keywords: Synthesis, silver nanoparticles, aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Larrea tridentata*.

RESUMEN

En este estudio, se presenta la síntesis de nanopartículas de plata (NPsAg) utilizando como sal precursora AgNO_3 y como agente reductor-estabilizador los extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis*. Para obtener las nanopartículas, se agregaron 25 ml de una solución de AgNO_3 0.1 M a 10 ml del extracto acuoso previamente preparado a temperatura ambiente por 24 horas. Los extractos obtenidos fueron caracterizados por la técnica HPLC-MS para la determinación de los compuestos responsables de la reducción de Ag^+ a Ag^0 , y así proponer un mecanismo de reacción para la síntesis de las NPsAg. Las NPsAg obtenidas se caracterizaron por diversas técnicas como el DRX confirmando su obtención mediante la carta de difracción ICDD 04-0783. Mediante micrografías SEM se determinó el tamaño de las NPs en un rango de 20-60 nm utilizando como agente reductor el extracto de *Rosmarinus officinalis* y en un rango de 10-30 nm cuando se utilizó el extracto de *Citrus sinensis*, indicando que al utilizar diferentes tipos de extractos acuosos de plantas existe una variación de tamaño. Mediante espectroscopía UV-Vis se observó la resonancia del plasmón superficial alrededor de 430-450 nm, característica de las NPsAg, y mediante espectroscopía FT-IR se confirmó que las NPsAg se encuentran funcionalizadas.

Palabras clave: Síntesis, nanopartículas de plata, extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis*, *Larrea tridentata*.

*Corresponding author: adali.castaneda@uadec.edu.mx

RESUM

En aquest estudi, es presenta la síntesi de nanopartícules de plata (NPsAg) utilitzant com a sal precursora AgNO_3 i com a agent reductor-estabilitzador els extractes aquosos de *Rosmarinus officinalis* i *Citrus sinensis*. Per obtenir les nanopartícules, es van agregar 25 ml d'una solució de AgNO_3 0,1 M a 10 ml de l'extracte aquós prèviament preparat a temperatura ambient per 24 hores. Els extractes obtinguts van ser caracteritzats per la tècnica HPLC-Ms per a la determinació dels compostos responsables de la reducció de Ag^+ a Ag^0 , i així proposar un mecanisme de reacció per a la síntesi de les NPsAg. Les NPsAg obtingudes es van caracteritzar mitjançant diverses tècniques com el DRX, confirmant la seva obtenció mitjançant la carta de difracció ICDD 04-0783. Fent servir, crografies SEM es va determinar la mida de les NPs en un rang de 20-60 nm utilitzant com a agent reductor l'extracte de *Rosmarinus officinalis* i de 10-30 nm quan es va utilitzar l'extracte de *Citrus sinensis*, indicant que a l'utilitzar diferents tipus d'extractes aquosos de plantes hi ha una variació de volum. Mitjançant espectroscòpia UV-Vis es va observar la ressonància del plasmó superficial al voltant de 430-450 nm característica de les NPsAg i mitjançant espectroscòpia FT-IR es va confirmar que les NPsAg es troben funcionalitzades.

Paraules clau: Síntesi, nanopartícules de plata, extractes aquosos de *Rosmarinus officinalis*, *Larrea tridentata*

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la nanotecnología ha sido una rama de gran estudio, al diseñar, manipular y sintetizar materiales con tamaño nanométrico¹, entre las cuales las nanopartículas de plata (NPsAg) han tomado gran interés al presentar propiedades que han sido aplicadas en diversas áreas tales como la electrónica, ingeniería, medio ambiente, medicina², siendo esta última, de gran impacto para la comunidad científica, debido a sus propiedades antiinflamatorias, anticancerosas, antifúngicas y antibacterianas, entre las cuales, ha destacado la actividad antimicrobiana debido a que las NPsAg son de gran toxicidad para las células procariontas (bacterias, virus y hongos)³, sin embargo, no son tóxicas para las células eucariontas³. Para la obtención de este tipo de NPs, existen diversos métodos de síntesis, como son los métodos químicos, entre los cuales se puede mencionar la reducción química, la microemulsión/coloidal, los métodos sonoquímicos, el método electroquímico y la descomposición solvothermal⁴; por otro lado, entre los métodos físicos más utilizados han sido la ablación láser, la molienda mecánica, la molienda mecanoquímica y el método de descarga pulsada en alambre⁴, sin embargo, estos métodos han presentado grandes desventajas al ser muy costosos, al necesitar la adición de agentes reductores y agentes estabilizadores químicos⁵ y otros, al generar residuos tóxicos perjudicando el medio ambiente⁶, por lo cual recientemente se ha estudiado la síntesis de NPsAg mediante métodos biológicos a partir

de diversos tipos de organismos como son los microorganismos y los extractos de plantas, siendo esta última un campo de gran interés⁷, al considerarse un método simple, rápido, rentable y no tóxico⁵. Se han utilizado diversos extractos de plantas para la síntesis de NPsAg, entre los cuales se pueden mencionar: el *Crocus sativus* (azafrán)⁸, *Azadirachta indica* (neem)⁹, *Geranium leaf* (hojas de geranio)¹⁰, entre otros; los cuales tienen en común diversos compuestos químicos como los ácidos metoxicinámicos, flavonoides y terpenoides⁸ los cuales actúan como agentes reductores y estabilizadores de las NPsAg, evitando la adición de sustancias químicas tóxicas durante la síntesis, así como el uso de altas temperaturas y alta presión¹¹, haciendo que este método sea muy atractivo y eficaz para la obtención de NPsAg siendo este método amigable con el medio ambiente. El *Rosmarinus officinalis* y el *Citrus sinensis* al ser plantas que crecen en diferentes partes del mundo, han sido de gran estudio debido a su abundancia y al presentar en su composición algunos compuestos químicos como flavonoides, fenoles, terpenos, glucósidos¹², ácidos fenólicos, flavonoles, ácidos y alcoholes terpenícos¹³, los cuales han tomado gran interés al actuar como agentes reductores de los iones plata en las síntesis de NPs¹⁴. Por lo cual, en este trabajo de investigación se describe una metodología amigable con el medio ambiente para la síntesis de NPsAg a partir del extracto de plantas de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis*, evitando el uso de químicos tóxicos para contribuir con el cuidado del planeta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El nitrato de plata (AgNO_3) fue adquirido en Jalmek. Se utilizó agua bidestilada en todo el estudio para la preparación del extracto de plantas (*Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis* de la región), así como para la síntesis y purificación de las NPsAg.

2.2 Preparación de los extractos acuosos de plantas

Las hojas frescas de las plantas se secaron en una estufa, las cuales posteriormente se trituraron y se colocaron con agua bidestilada a una temperatura de 60°C durante 1 hora. El extracto se filtró para separar los sólidos contenidos¹⁵.

2.3 Síntesis de NPsAg

A 25 ml de una solución de AgNO_3 0.1 M se le adicionó 10 ml del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 24 horas, con ayuda de agitación magnética. Las nanopartículas obtenidas se purificaron mediante lavados con agua bidestilada en una centrifuga a 3000 rpm. Para la síntesis de NPsAg con el extracto de *Citrus sinensis* se realizó el mismo procedimiento.

2.4 Caracterización de los extractos de plantas

Los extractos de plantas de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis* fueron caracterizados mediante la técnica HPLC-MS y espectroscopía FT-IR.

2.4.1 Análisis de la composición de los extractos mediante HPLC-MS

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Varian Prostar 330 con detector de arreglo de diodos acoplado a un espectrómetro de masas Varian 500 ms con trampa de iones. La separación cromatográfica se desarrolló en una columna de C18 ACE Excel 3 Super, con dimensiones de 150 x 2.1 mm, de un tamaño de partícula de 3 μm . La fase móvil empleada fue de (a) acetonitrilo/ (b) ácido fórmico al 0.2% en agua. El volumen de muestra inyectado fue de 5 μl .

2.4.2 Análisis de los extractos mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (FT-IR) marca Perkin-Elmer Nicolet Nexus 47, equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada ángulo de incidencia de 45° y un cristal de diamante ATR a una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras se prepararon por evaporación de una gota de solución del extracto.

2.5 Caracterización de las NPsAg

Las NPsAg obtenidas se caracterizaron mediante las técnicas de difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja (FT-IR), espectroscopía UV-vis y Microscopía electrónica de barrido (SEM).

2.5.1 Difracción de rayos X (DRX)

La fase cristalina de las NPsAg se comprobó mediante un DRX marca PANalytical, modelo Emyrean, utilizando un ánodo de Cu, con un paso 2 θ de 0.02°, operando con una corriente de 30 kV y 20 mA. Los parámetros de medición fueron programados de 20-80° en el ángulo 2 θ .

2.5.2 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Los espectros IR de las NPsAg se llevaron a cabo como fue descrito en el punto 2.4.2.

2.5.3 Espectroscopía UV-visible

Los espectros UV-vis se obtuvieron en un espectrómetro de doble haz marca Shimadzu UV-2401 PC utilizando lámparas halógenadas y D2 de 50 W, con una resolución de 0.1 nm.

2.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

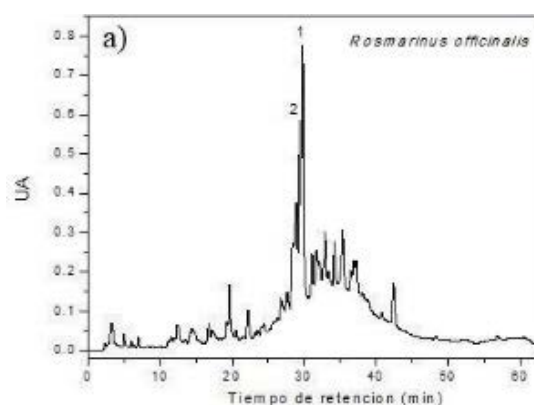
El tamaño y la forma de las NPsAg se determinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (HITACHI modelo SU8010) a una aceleración de electrones de 5000 V, a una distancia de trabajo de 2.1 mm con un detector LA100 (U) (referente a los electrones retrodispersos de ángulo bajo con la supresión al 100% de los electrones secundarios). La determinación del tamaño se llevó a cabo con el software Image J.

3. RESULTADOS

3.1 Extractos acuosos de plantas

3.1.1 Determinación de los compuestos orgánicos presentes en los extractos acuosos de plantas mediante la técnica de HPLC-MS.

En la Figura 1 se muestran los cromatogramas HPLC de los dos extractos y en la tabla 1 los compuestos identificados a partir de los cromatogramas, de acuerdo a su tiempo de retención y junto con su peso molecular. Para el extracto *Rosmarinus officinalis*, se observa que las principales familias presentes en el extracto son: hidroxycumarinas, ácidos metoxicinámicos, alquilfenoles, ácidos hidroxicinámicos, flavones, catequinas, metoxiflavones, dímeros de ácidos metoxicinámicos, antocianinas y terpenos fenólicos. En lo que concierne el extracto *Citrus sinensis*, se encuentran familias como las hidroxycumarinas, metoxisoflavones, metoxiflavones, curcuminoides, ácidos hidroxicinámicos, ácidos metoxicinámicos, dímeros de ácidos metoxicinámicos, flavones, dímeros de proantocianidinas y flavonoles. Ambos extractos presentan en común dentro de sus estructuras químicas grupos oxigenados como alcoholes, siendo importantes al ser compuestos susceptibles a oxidarse¹⁶. En la figura 1a se muestran los cromatogramas de HPLC de a) *Rosmarinus officinalis*, en donde se encuentran marcados como 1 (TR= 28.23) y 2 (TR= 27.46) los compuestos mayoritarios correspondientes a 5-5'-Ácido dihidroferúlico perteneciente a la familia de los dímeros de ácidos metoxicinámicos y Gardenin B perteneciente a la familia de los metoxiflavones. Debido a que son extractos acuosos, estos compuestos están en mayor proporción; se ha reportado por el contrario que cuando la extracción es etanólica, se han obtenido en mayor proporción diferentes compuestos como el ácido rosmarínico¹⁷. La figura 1b muestra el cromatograma correspondiente al extracto acuoso de *Citrus sinensis*, el cual muestra como componentes principales al compuesto 1,2- diferuloilgenticobiosa (1), perteneciente a la familia de los ácidos metoxicinámicos con un TR de 29.85 y al compuesto (-)-Epicatequina-(2a-7) (4a-8)-epicatequina 3-O-galactósido (2) correspondiente a la familia de los dímeros de proantocianidinas con un TR=33.73.



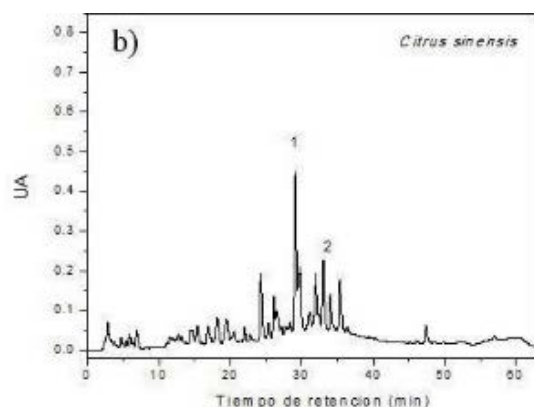


Figura 1. Cromatogramas HPLC de a) extracto de *Rosmarinus officinalis* y b) *Citrus sinensis*.

Tabla 1. Compuestos químicos identificados por HPLC-Ms correspondientes a los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis*.

<i>Rosmarinus officinalis</i>			
Tiempo de retención	Masa (g/mol)	Compuesto químico	Familia
3.34	191	Escopoletina	Hidroxycumarinas
5.16	355	Acido ferúlico 4-O-glucósido	Ácidos metoxicinámicos
5.64	355	Acido ferúlico 4-O-glucósido	Ácidos metoxicinámicos
11.84	374.9	5-Nonadecil resorcinol	Alquilfenoles
13.21	359	Acido rosmarinico	Ácidos hidroxicinámicos
15.08	447	6-Hydroxyluteolin 7-O-ramnosido	Flavones
19.04	431.1	Apigenina 6-C-glucósido	Flavones
20.1	354.9	Acido ferúlico 4-O-glucósido	Ácidos metoxicinámicos
21.38	352.9	1- Acido cafeoilquinico	Ácidos hidroxicinámicos
24.12	305	(+)-Galocatequina	Catequina
27.46	356.9	Gardenin B	Metoxiflavones
28.23	384.9	5-5'-Ácido dihidroferúlico	Dímeros de ácidos metoxicinámicos
34.79	558.8	Vitisin A	Antocianinas poliméricas
43.06	327.1	p-Coumaroil tirosina	Ácidos hidroxicinámicos
48.89	344.9	Rosmanol	Terpenos fenólicos
<i>Citrus sinensis</i>			
3.21	191	Escopoletina	Hidroxycumarinas
4.76	190.9	Escopoletina	Hidroxycumarinas
7.51	265	Formononetina	Metoxisoflavones
13.17	315	Nepetin	Metoxiflavones
14.55	307	Bisdemetoxicumarina	Curcuminoides
15.24	352.9	1- Acido cafeoilquinico	Ácidos hidroxicinámicos
16.17	354.9	Feruloi glucosa	Ácidos metoxicinámicos
17.69	354.9	Feruloi glucosa	Ácidos metoxicinámicos
18.89	337	3-p- Acido cumaroilquinico	Ácidos hidroxicinámicos
20.14	354.9	Feruloi glucosa	Ácidos metoxicinámicos
21.25	366.9	3- Acido feruloiquinico	Ácidos metoxicinámicos
21.85	312.9	Cirsimaritin	Metoxiflavones
22.7	384.9	5-5'-ácido dihidroferúlico	Dímeros de ácido metoxicinámico
23.52	336.9	3-p- Acido cumaroilquinico	Ácidos hidroxicinámicos
24.94	593	Apigenina 6,8-di-C-glucósido	Flavones
26.14	623	Isoramnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnosido	Metoxiflavonoles
27.23	357	Gardenin B	Metoxiflavones
28.99	336.8	4-p- Acido cumaroilquinico	Ácidos hidroxicinámicos
29.85	692.8	1,2- diferuloiilgentobiosa	Ácidos metoxicinámicos
31.69	397	3- Acido Sinapoilquinico	Ácidos metoxicinámicos
33.73	704.9	(-)-Epicatequina-(2a-7)(4a-8)-epicatequina 3-O-galactósido	Dímeros de proantocianidinas
34.56	650.9	Quercetina 3-O-(6'- acetil-galactósido) 7-O-ramnosido	Flavonoles
43.11	327.1	p-Coumaroil tyrosina	Ácidos hidroxicinámicos

3.1.2. Espectroscopía FT-IR de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis*

La espectroscopía FT-IR de los extractos se utilizó como una técnica complementaria al HPLC-Ms para confirmar los grupos funcionales presentes en los extractos. Los espectros FT-IR se muestran en la figura 2a correspondiente al extracto de *Rosmarinus officinalis* y 2b correspondiente al extracto *Citrus sinensis*, en los cuales se pueden observar bandas muy similares entre sí, de acuerdo a lo observado la técnica HPLC-Ms, es decir que ambos extractos están compuestos

por flavones, ácidos metoxicinámicos, metoxiflavones, dímeros de ácidos metoxicinámicos, entre otros, los cuales se encuentran formados por grupos funcionales como fenoles, ácidos carboxílicos, cetonas y ésteres. La banda ancha de $3250\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), en 2930 cm^{-1} se muestra una banda pequeña la cual indica los estiramientos $-\text{CH}_2-$, la banda en 1637 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de la función $\text{C}=\text{O}$ atribuidas a las cetonas, ácidos carboxílicos presentes en las moléculas del extracto¹⁸, en $1365\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ se observa una banda que representa las flexiones de los grupos metilos ($-\text{CH}_3$) presentes, en 1100 cm^{-1} se observa la banda característica del estiramiento de $\text{C}-\text{OH}$ correspondiente a los alcoholes secundarios presentes en los compuestos químicos de los extractos como los flavones, los ácidos metoxicinámicos, falvonoles, siendo los responsables de reducir la Ag^+ a Ag^0 ¹⁹.

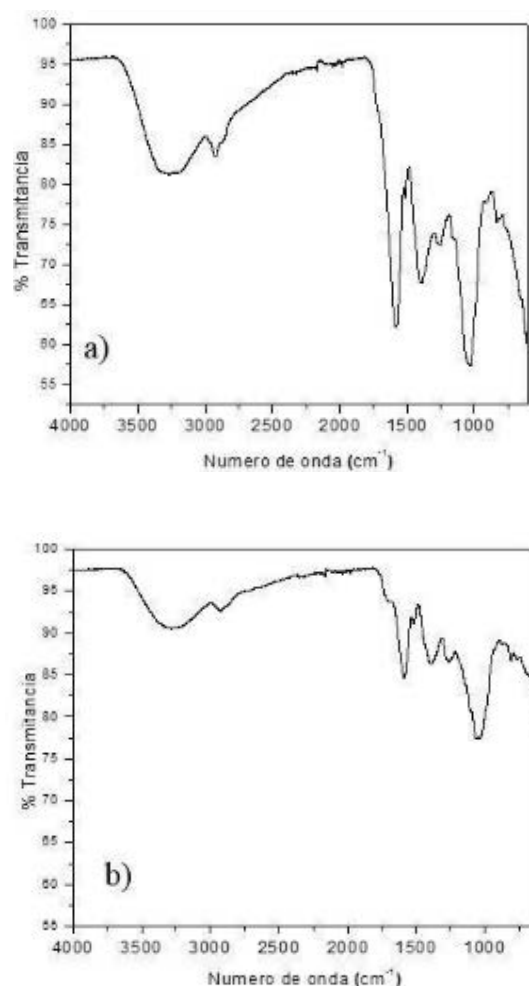


Figura 2. Espectros FT-IR del a) extracto de *Rosmarinus officinalis* y b) *Citrus sinensis*.

3.2. Síntesis de NPsAg

3.2.1. Mecanismo para la reducción de la plata mediante los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis*.

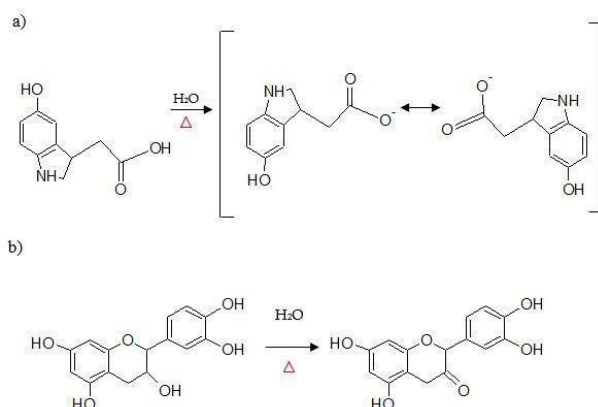
Se propone que el ecanismo se puede llevar a cabo en tres etapas.

1. En la primera etapa se lleva a cabo la disociación de la sal precursora en agua.



Esquema 1. Reacción química de la disociación del AgNO_3 , precursor de las NPsAg.

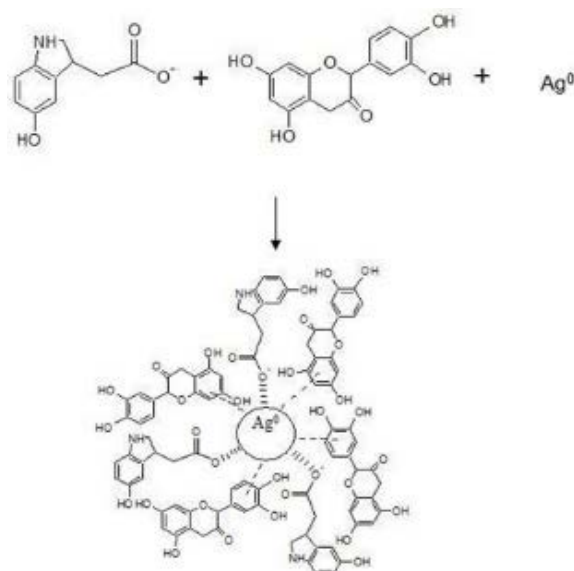
2. La segunda etapa comprende la oxidación de los grupos oxigenados de los extractos, en el esquema 2a) se muestra la oxidación del compuesto 5-5'-Ácido dihidroferúlico correspondiente al extracto *Rosmarinus officinalis*, el cual en presencia de agua, calor y agitación mecánica el ácido carboxílico (presente en el compuesto) forma iones carboxilato; esto debido a que los ácidos carboxílicos al ser muy reactivos son capaces de donar protones (H^+). En el esquema 2b) se muestra la oxidación de un alcohol secundario presente en la (-)(-)Epicatequina correspondiente a la familia de los flavonoles presente en el extracto acuoso de *Citrus sinensis*, los cuales en presencia de agua, calor y agitación mecánica forman cetonas, donando H^+ , propiciando la reducción de la Ag^+ a Ag^0 , tal como lo reporta Tao y col. en el año 2010, quienes estudiaron la reducción de la Ag^+ utilizando agentes químicos como el etilenglicol (alcohol primario), el cual genera aldehídos y al ser muy reactivos pueden donar (H^+), propiciando la reducción de la Ag^+ a Ag^0 20.



Esquema 2. a) Reacción de la oxidación del compuesto 5-5'-ácido dihidroferúlico correspondiente al extracto de *Rosmarinus officinalis*, formando iones carboxilato. b) de la oxidación de la (-)(-)epicatequina correspondiente al extracto de *Citrus sinensis* formando cetonas.

3. Por último, en la tercera etapa, la mezcla de compuestos formados como iones carboxilatos y cetonas que propiciaron la reducción de la Ag^+ obteniendo Ag^0 , intervienen en la funcionalización de la Ag^0 con los compuestos restantes de los extractos (esquema 3). En esta reacción se observan interacciones con los átomos de oxígeno deficientes de enlaces, así como con la plata (Ag^0), la cual al ser un metal, tiene la capacidad de formar interacciones no covalentes tipo π con los sistemas conjugados formando complejos tipo sándwich 21, tal como lo reporta Raghunandan y col., en el año 2011, los cuales, sintetizaron NPSAg a partir

de la hoja de guayaba, encontrando que agentes ligantes como los citratos fueron absorbidos en la superficie de las NPs debido a interacciones π -electrones 22. En el esquema 3 además de las interacciones tipo π , también se muestran interacciones ion-dipolo de la plata (Ag^0) con los iones carboxilatos del compuesto 5-5'-ácido dihidroferúlico. Este comportamiento es debido a la densidad electrónica que presenta la Ag^0 y el compuesto conjugado (5-5'-ácido dihidroferúlico) como una molécula polar, interactuando por medio de atracción de cargas 23.



Esquema 3. Reacción de la plata funcionalizada con la mezcla de los compuestos pertenecientes a los extractos.

3.2.2. Espectroscopía UV-visible

En la Figura 3 se muestra el espectro UV-Vis de las suspensiones de NPsAg en agua. En ambos casos es evidente la banda plasmonica debida a la oscilación de los electrones libres en la banda de conducción de las NPsAg que interactúan en esa longitud de onda 24 y que depende del tamaño, forma, cristalinidad y medio circundante de las NPs 25. Sin embargo, mientras que para las NPsAg obtenidas a partir del extracto de *Citrus sinensis* (cuadros) la banda es muy definida y el máximo se puede claramente identificar a 444 nm, para la reacción del extracto de *Rosmarinus officinalis* (círculos) la banda se solapa con una línea de base más inclinada debida a la dispersión de luz que podría indicar aglomeración. El máximo no es bien definido, pero puede visualizarse alrededor de 544 nm. El desplazamiento a mayor longitud de onda sugiere un menor tamaño promedio de partícula para estas últimas 26. También se observa una diferencia en intensidad posiblemente debido a que ocurrió mayor reducción del AgNO_3 en presencia del extracto de *Citrus sinensis* promoviendo mayor formación de nanopartículas. Así mismo se observa un hombro alrededor de 350 nm correspondiente a las transiciones electrónicas del extracto (terpenos y flavones), tal como lo menciona Imran y col. en el año 2017, quienes estudiaron la síntesis de NPs, utilizando el extracto de *Matricaria recutita* 27.

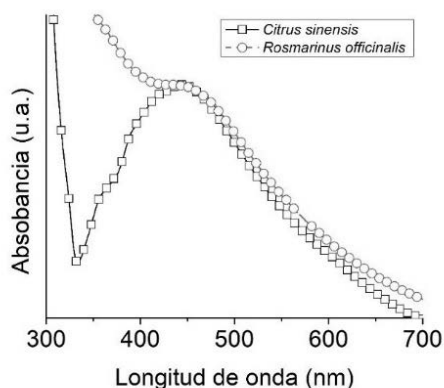


Figura 3. Espectros de UV-vis de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso de *Citrus sinensis* (cuadros) y *Rosmarinus officinalis* (círculos).

3.2.3. Difracción de rayos X

En la Figura 4 se muestran los difractogramas de rayos X de las NPsAg sintetizadas a partir del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (a) y *Citrus sinensis* (b). En ambos difractogramas se observa la posición de los picos de difracción en el ángulo $2\theta = 38.11^\circ, 44.27^\circ, 64.42^\circ, 77.47^\circ$ y 81.53° indexadas como (111), (200), (220), (311) y (222)²⁸ respectivamente, confirmando la obtención de plata metálica correspondiente a la fase cristalina cubica centrada en las caras (FCC), comparándolos con la carta de difracción ICDD 04-0783. El difractograma de las NPs obtenidas a partir del extracto de *Citrus sinensis* (b) presenta picos más anchos en comparación con los obtenidos en las NPsAg con el extracto de *Rosmarinus officinalis*, lo cual es atribuido al menor tamaño obtenido de las NPs sintetizadas con el extracto de *Citrus sinensis*^{29, 30}. Estos resultados concuerdan con el desplazamiento hacia el azul observado para la banda plasmónica y coinciden con lo obtenido en las micrografías SEM (Figuras 4c y 4d), siendo c) las correspondientes al extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* donde se observa una morfología cuasiesférica con tamaño de partícula en el rango de 20-60 nm y d) corresponde a las NPs obtenidas a partir del extracto acuoso de *Citrus sinensis* presentando tamaño en el rango de 10-30 nm. Más precisamente, a partir de los histogramas, las NPs obtenidas a partir del extracto acuoso de a) *Rosmarinus officinalis* (Figura 5 a) presentan un tamaño en el rango 20-63 nm con un tamaño promedio de 39.72 nm ($\pm$ nm), mientras que las NPs obtenidas a partir del extracto acuoso de *Citrus sinensis* (5b) se encuentran en el rango de 10-31 nm con un tamaño promedio de 18.80 nm ($\pm$ nm). Este resultado demuestra que los extractos acuosos de distintas plantas influyen de forma importante en el tamaño de las NPs. Este comportamiento también fue observado por Saquib y colaboradores en el año 2019, los cuales sintetizaron NPsAg a partir del extracto de corazón de purpura obteniendo morfologías esféricas, con un tamaño aproximado de 98 nm³¹.

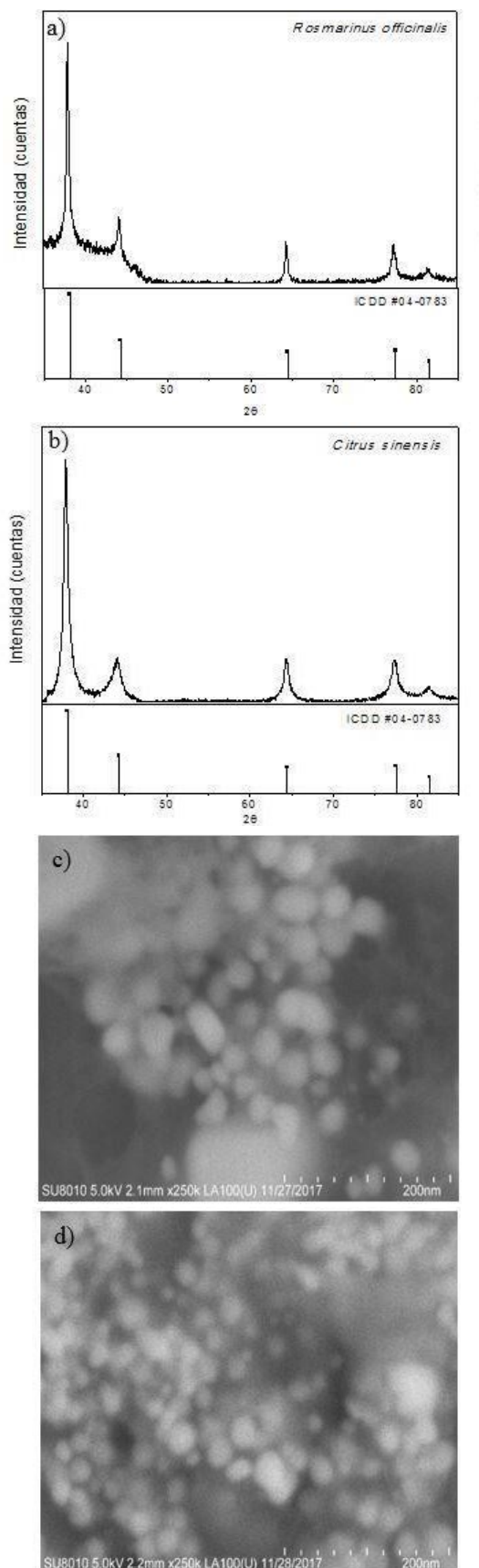


Figura 4. Difractogramas de NPsAg obtenidas a partir del extracto acuoso a) de *Rosmarinus officinalis*, b) de *Citrus sinensis* y Micrográficas SEM de las NPsAg obtenidas del extracto acuoso c) de *Rosmarinus officinalis*, d) de *Citrus sinensis*.

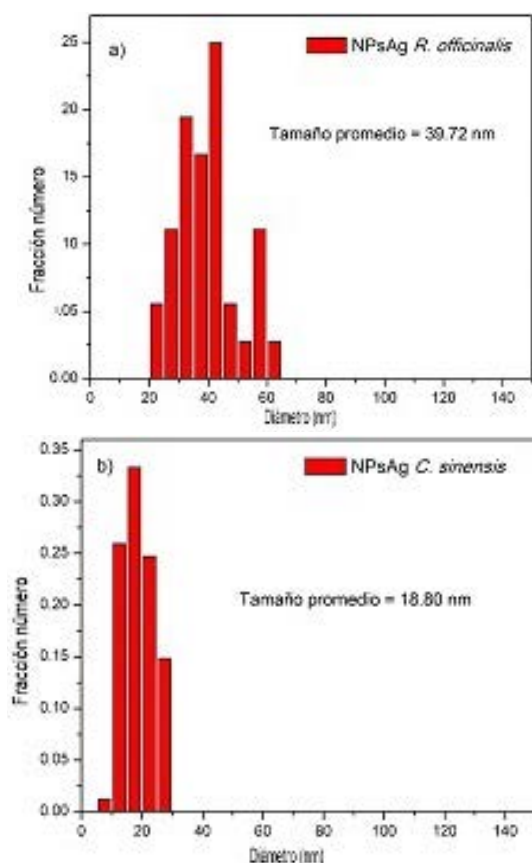


Figura 5. Histograma de tamaño promedio de partícula de las NPsAg a partir del extracto acuoso de a) *Rosmarinus officinalis* y b) *Citrus sinensis*.

3.2.4. Espectroscopía FT-IR de las NPsAg

Después de un tratamiento de purificación, las NPsAg se analizaron por medio de la técnica espectroscopia FT-IR para confirmar la presencia de los grupos funcionales provenientes de los extractos acuosos de plantas. En los espectros de las nanopartículas con los diferentes extractos (Figura 6) se observa una banda ancha presente en la región de $3200\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ que se atribuye a las vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), las bandas presentes en 1700 cm^{-1} corresponden a las vibraciones del estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ pertenecientes a las cetonas, ácidos carboxílicos presentes en los extractos, la señal de 1200 cm^{-1} corresponde al enlace $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ del grupo fenol y la banda de 1076 cm^{-1} corresponde a la presencia del estiramiento de $\text{C}-\text{O}$ del grupo éter, las cuales son atribuidas a los grupos funcionales presentes en los extractos utilizados. Las bandas de vibración anchas e intensas observadas en la región de $3200\text{--}3250$ son atribuidas a las interacciones ion-dipolo con la plata (Ag^0) y los iones carboxilatos de los compuestos químicos presentes en el extracto y las NPsAg³² como se propuso en el esquema 3. Analizando los espectros de las nanopartículas y los extractos, ambos presentan las mismas bandas provenientes de los grupos funcionales aún después de un proceso de purificación, indicando que las NPsAg presentan grupos funcionales en la superficie, provenientes de los flavonoides, ácidos metoxicinámicos, ácidos hidroxicinámicos, presentes en los extractos acuosos.

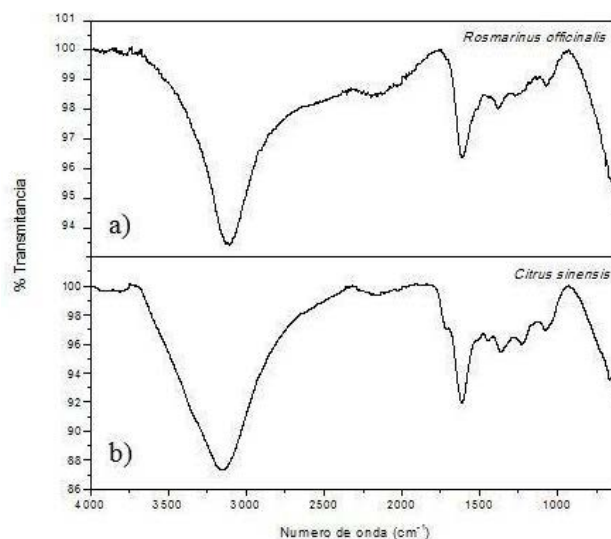


Figura 6. Espectroscopia FT-IR de NPsAg obtenidas a partir del extracto acuoso a) de *Rosmarinus officinalis*, b) de *Citrus sinensis*.

4. CONCLUSIÓN

Los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Citrus sinensis* demostraron ser excelentes agentes reductores para la síntesis de NPsAg, como se confirmó por DRX, espectroscopia UV-Vis y SEM. Además se observó que a pesar de tener compuestos químicos similares de acuerdo al HPLC el extracto influye de manera importante en el tamaño de las NPs obtenidas, debido a que en la síntesis de NPsAg con el extracto de *Citrus sinensis* se obtuvieron tamaños más pequeños en comparación a las NPsAg obtenidas a partir del extracto de *Rosmarinus officinalis* ($18.80 \pm .\text{nm}$ contra $39.72 \pm .\text{nm}$). Además, mediante IR se demostró que las NPsAg quedan funcionalizadas con los compuestos químicos de los extractos acuosos de plantas, sin la necesidad de adicionar químicos tóxicos como agentes de reducción o estabilización. Lo cual, convierte a esta metodología en una ruta eficaz, sencilla y amigable con el medio ambiente de gran interés para el estudio de NPs.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada No. 784728 al programa de doctorado en Ciencia y Tecnología de Materiales, así como al cuerpo académico de Ciencia y Tecnología en Polímeros de la Universidad Autónoma de Coahuila.

REFERENCIAS

- Shani, R.; Suresh, M.; Rohini, T. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2018**, 503, 2814-2819. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.011>.

- org/10.1016/j.bbrc.2018.08.045 2. Yin, N.; Gao, R.; Knowles, B.; Wang, J.; Wang, P.; Sun, G.; Cui, Y. Formation of silver nanoparticles by human gut microbiota. *Science of The Total Environment*. **2019**, 651, 1489- 1494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.312>
2. Keshari, A.; Srivastava, R.; Singh, P.; Yadav, V.; Nath, G. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. **2018**, 11, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.11.003>
 3. Satyanarayana, T. and Sudhakar, S. A review on chemical and physical synthesis methods of nanomaterials. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. **2018**, 6, 2885-2889.
 4. Saber, M.; Mirtajani, S.; Karimzadeh, K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Trapa natans* extract and their anticancer activity against A431 human skin cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **2018**, 47, 375-379. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.08.004>
 5. Ruíz-Baltazar, A.; Reyes-López, S.; Larrañaga, D.; Estévez, M.; Pérez, R. Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract with antibacterial properties. *Results in Physics*. **2017**, 7, 2639-2643. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rinp.2017.07.044>
 6. Kannan, R.; Stirk, W.; Van, J. Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* P.C. Silva (Chlorophyceae). *South African Journal of Botany*. **2013**, 86, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2013.01.003>
 7. Bagherzade, G.; Manzari, M.; Hasan, M. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pac J Trop Biomed*. **2017**, 7 (3), 227-233.
 8. Shakeel, A.; Saifullah, M.; Babu, L.; Saiqa, I. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Science*. **2016**, 9, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.06.006>
 9. Shankar, S.; Ahmad, A.; Sastry, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol Prog*. **2003**, 19 (6), 1621-1631. <http://dx.doi.org/10.1021/bp034070w>
 10. Benakashani, F.; Allafchian, A.; Jalali, S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Capparis spinosa* L. Leaf extract and their antibacterial activity. *Karbala International Journal of Modern Science*. **2016**, 2, 251-258.
 11. Aristizabal, J. and Vera, R. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las cáscaras y semillas de tres especies de cítricos contra el hongo fitopatógeno *Fusarium Roseum* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. **2011**.
 12. Avila, R.; Navarro, A.; Vera, O.; Dávila, R.; Melgoza, N.; Meza, R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*. **2011**, 43, 23-36.
 13. Kambale, E., Nkanga, C., Mutoonkole, B., Bapolist, A., Tassa, D., Liesse, J., Krause, R., Memvanga, P. Green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using aqueous leaf extracts from three Congolese plant species (*Brillantaisia patula*, *Crossopteryx febrifuga* and *Senna siamea*). *Heliyon*. **2020**, 6, e04493.
 14. Ya, M., Yan, T., Sheng, W., Jun, L., Han, Z., Dong, L. Green synthesis of silver nanoparticles using Eucalyptus leaf extract. *Materials Letters*. **2015**, 144, 165-167.
 15. Wade, L. Química orgánica. Quinta edición. Pearson Prentice Hall. Madrid. **2004**.
 16. Bendif, H.; Boudjeniba, M.; Djamel, M.; Biqiku, L.; Bramuco, M.; Caprioli, G.; Lupidi, G.; Caprioli, G.; Lupidi, G.; Quassinti, L.; Sagratini, G.; Vitali, L.; Vittori, S.; Maggi, F. *Rosmarinus officinalis*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*. **2017**, 218, 78-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.063>
 17. Nilavukkarasi, M.; Vijayakumar, S.; Kumar, S. Biological synthesis and characterization of silver nanoparticles with *Capparis zeilanica* L. leaf extract potent antimicrobial and antiproliferation efficiency. *Materials Science for Energy Technologies*. **2020**, 3, 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.02.008>
 18. Zia-ur-Rehman, M.; Mubarak, A.; Tariq, K.; Akhtar, N. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2016**, 234, 132- 141. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.008>
 19. Tao, Z.; Rong, S.; Shuhui, Y.; Zhijun, Z.; Limin, Z.; Haitao, H.; Ruxu, D. Size-controlled preparation of silver nanoparticles by a modified polyol method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010, 366, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.06.005>
 20. Klepetarova, B.; Kvicalová, M.; Sykora, K.; Kvicalová, D.; Makrlík, E.; Vanura, P. Experimental and Theoretical study on cation- π interaction of the univalent silver cation with pyrene in the gas phase and in the solid state. *Inorganica Chimica Acta*. **2018**, 477, 165-171.
 21. Raghunandan, D.; Mahesh, B.; Basavaraja, S.; Balaji, S.; Manjunath, S.; Venkataraman, A. Microwave-assisted rapid extracellular synthesis of stable bio-functionalized silver nanoparticles from guava (*Psidium guajava*) leaf extract. *J Nanopart Res*. **2011**, 13, 2021- 2028. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9956-8>
 23. Gillespie, R. Química. Primera edición. Reverté. Barcelona. **1990**.
 24. Bindhu, M. and Umadevi, M. Surface plasmon resonance optical sensor and antibacterial activities of biosynthesized silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2014**, 121, 596-604. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.019>

25. Cruz, D.; Rodríguez, M.; López, J.; Herrera, V.; Orive, A.; Creus, A. Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencia e Ingeniería*. **2012**, 3, 67-78.
26. Cornejo, L. Resonancia del plasmón de la superficie (RPS); propiedades optoelectrónicas. *Nuevas Tecnologías y Materiales*. **2015**.
27. Imran, U.; Khateeb, A.; Ashraf, A.; Mohd, A. Synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria recutita* (Babunah) plant extract and its study as mercury ions sensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*. **2017**, 16, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.11.005>
28. Dangui, S.; Gupta, A.; Kumar, D.; Singh, S.; Parajuli, N. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous root extract of *Berberis asiatica* and evaluation of their antibacterial activity. *Chemical Data Collections*. **2020**, 28, 100411
29. Rajesh, B. and Hymavathi, B. X-ray peak profile analysis of solid-state sintered alumina doped zinc oxide ceramics by Williamson-Hall and size-strain plot methods. *Journal of Asian Ceramic Societies*. **2017**, 5, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.jascer.2017.02.001>
30. Martínez, L. and Aguado, F. Determinación del tamaño de partícula mediante difracción de rayos X. Tesis de licenciatura en física. Cantabria, España. Universidad de Cantabria. Facultad de Ciencias, **2018**.
31. Saquib, M.; Noushad, Md.; Sabir, Md., Rishishwar, P.; Rishishwar, S.; Ali, S.; Kumar, A.; Beg, S. Purple heart plant leaves extract-mediated silver nanoparticles synthesis: Optimization by Box-Behnken design. *Materials Science & Engineering*. **2019**, 99, 1105– 1114. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.061>
32. Chunfa, D.; Xianglin, Z.; Hao, C.; Chuanliang, C. Green synthesis of biocompatible silver nanoparticles mediated by *Osmathus fragrans* extract in aqueous solution. *Optik*. **2016**, 127, 10378-10388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijleo.2016.08.055>

Theoretical Insight on Structural Activities and Targets of Kaempferol Glycosides

K. Anbazhakan^{1,3}, R. Praveena^{1,3}, K. Sadasivam^{1,2}, G. Salgado⁴, W. Cardona⁵, L. Gerli⁶,
L. Alvarado-Soto⁷, R. Ramirez-Tagle^{8*}

¹Quantum Computing and Phytochemistry Research Laboratory, Bannari Amman Institute of Technology Sathyamangalam, Tamil Nadu-638 401 ²Department of Physics, Bannari Amman Institute of Technology, Sathyamangalam, Tamil Nadu-638 401 ³Department of Chemistry, Bannari Amman Institute of Technology, Sathyamangalam, Tamil Nadu-638 401 ⁴Universidad de Concepcion, Investigador Extramural, Concepcion, Chile ⁵Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, Universidad Andres Bello, Concepcion, Chile ⁶Departamento de Química Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, Chile ⁷Química del Maipo Ltda., Peñaflor, Chile. ⁸ Dirección de Investigación y Postgrado, Universidad de Aconcagua, Santiago, Chile

Perspectiva teórica sobre las actividades estructurales y los objetivos de los glucósidos de kaempferol

Perspectiva teòrica sobre les activitats estructurals i els objectius dels glucòsids de Kaempferol

RECEIVED: 10 JULY 2020; REVISED: 1 DESEMBER 2020; ACCEPTED: 2 DESEMBER 2020

ABSTRACT.

Metabolite profile always hold important place for flavonoids as they are the major promoters of secondary metabolism in human body. For decades numerous flavonoids are explored for their structural activities which in turn helped them to meet various health promoting applications such as radical scavenging activity. Apart from conventional flavonoids their derivatives are also tend to exhibit similar kind of structural activity. Therefore in the present work afzelin and juglanin – the glycosyl derivatives of kaempferol an established flavonoid are subjected to structural activity relationship analysis using density functional theory. The structures of the two kaempferol glycosides are optimized and the optimized geometry is simulated to obtain frontier orbitals, electrostatic potential energy and molecular descriptors. The obtained results suggest that maximum amount of charge is accumulated over B-ring of two flavonoids, thus prefers to act as better electron donating region. Target predicted for two flavonoids over *homosapien* class reveal that the flavonoid highly prefers *lyase* and enzymatic targets for inhibition purpose.

Keywords: Kaempferol glycosides, structural activity, target prediction.

RESUMEN.

Los flavonoides siempre ocupan un lugar importante para el perfil de los metabolitos, ya que son los principales promotores del metabolismo secundario en el cuerpo humano. Durante décadas, se exploraron numerosos flavonoides por sus actividades estructurales que a su vez les ayudaron a cumplir con diversas aplicaciones promotoras de la salud, como la actividad de eliminación de radicales. Aparte de los flavonoides convencionales, sus derivados también tienden a exhibir un tipo similar de actividad estructural. Por lo tanto, en el presente trabajo, los derivados glicosílicos del kaempferol, un flavonoide, la afzelina y la juglanina, se sometieron a un análisis de relación de actividad estructural utilizando la teoría funcional de la densidad. Se optimizaron las estructuras de los dos glucósidos de kaempferol y se simuló la geometría optimizada para obtener orbitales de frontera, energía potencial electrostática y descriptores moleculares. Los resultados obtenidos sugieren que la cantidad máxima de carga se acumula sobre el anillo B de dos flavonoides, por lo que prefiere actuar como una mejor región donante de electrones. La diana predicha sobre la clase *homosapien* para los dos flavonoides revela que prefieren a *lyasa* como diana enzimática con fines de inhibición.

Palabras clave: glucósidos de kaempferol, actividad estructural, predicción de objetivos.

*Corresponding author: rodrigoramireztagle@gmail.com

INTRODUCTION

Flavonoids are ubiquitous group of naturally occurring polyphenolic compounds derived from plants, vegetables and fruits considered as health promoting as well as disease preventing dietary supplements. Epidemiological, clinical and animal studies reveal that flavonoids act as protective shield against various disease conditions including cardiovascular disease and cancer that are revealed in epidemiological, clinical and animal studies [1]. They have dominant impact over parameters associated with atherosclerosis, including lipoprotein oxidation, blood platelet aggregation, and vascular reactivity which makes them to be the focus of much current nutritional and therapeutic interest. Of all, well known flavonoids kaempferol containing plants have superior antioxidant activity not only in vitro but also in vivo [2]. Kaempferol significantly decreases superoxide levels at low concentrations, making it to be a potential antioxidant, since the formation of superoxide anion is required for the production of reactive oxygen and nitrogen species involved in oxidative stress. Structural features that support their antioxidant property are the presence of a double bond at C2-C3 in conjugation with an oxo group at C4, and the presence of hydroxyl groups at C3, C5 and C4' positions. At present scientific community is showing much interest over the derivatives of several high potent antioxidants, as they also mimic the same properties similar to their parent due to some important structural similarities with their parent. Best examples are glycosyl derivatives of flavonols and flavon-3-ols[3]. The present work portrays the theoretical investigation of structural activity of kaempferol afzelin derivatives and juglanin based on orbitals, electrostatic potential, molecular descriptors and identification of the potential targets using in-silico method.

COMPUTATIONAL DETAILS

In the present work, the geometries of afzelin and juglanin are optimized to their ground state using the hybrid density functional of a B3LYP parameter (Beckes-three parameter reformulated by Lee Yang and Parr) using the triple zeta valence basis set 6-311G(d,p) and polarization functions ++ are also been considered, due to high delocalization [4]. All the simulations were supported by the quantum chemical software Gaussian 09 and visualizations are aided by Gauss view 5.0 and chemcraft software. Initially the structures are been optimized to attain the ground state energy minimum through potential energy scan. The optimized structure of afzelin with energy -1564.8771034 Hartree is obtained from the simulation. Whereas optimized structure of juglanin possess a intra molecular hydrogen bond of length 1.699 Å and energy -1525.5879351 Hartree. Energetically afzelin seems to be of active than juglanin even though it lags intra molecular hydrogen bonding between. Target prediction for the respective compounds is supported by Swissadme.

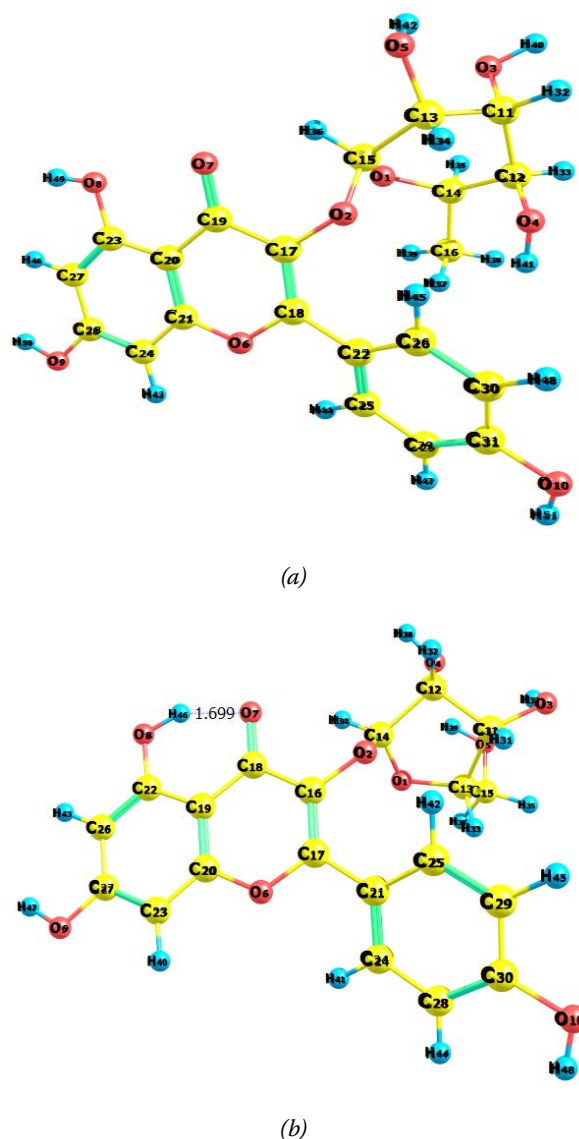


Figure 1.Optimized structure of (a) Afzelin and (b)Juglanin

RESULT AND DISCUSSION

Frontier Molecular Orbital Analysis

Frontier orbitals provide an insight on organic reactions based on how orbitals interact to control the outcome of reactions [5]. Here they are been used to understand the characteristic nucleophilic and electrophilic components by visualizing the occupied and unoccupied molecular orbitals. From Figure 2.it is observed that molecular orbitals of both HOMO and LUMO are found to be spread all over both the molecules. C3-C6-C3' skeleton possess bonding type of orbitals in both occupied and unoccupied energy levels. Similarly hydroxyl units possess anti-bonding orbitals. Herein considering molecular orbital energy levels both afzelin and juglanin possess same kind of occupancies, A and B ring in both molecules possess high charge density which is shown by increased number of positive and negative lobes there. Another important

observation is energy gap between HOMO and LUMO for afzelin and zuglanin. For afzelin energy difference of about 4.14 eV is observed and for zuglanin energy difference of about 4.06 eV is observed, since there is no any appreciable variation that is in line with previous observations. Hence both molecules exhibit same kind of antioxidant activity.

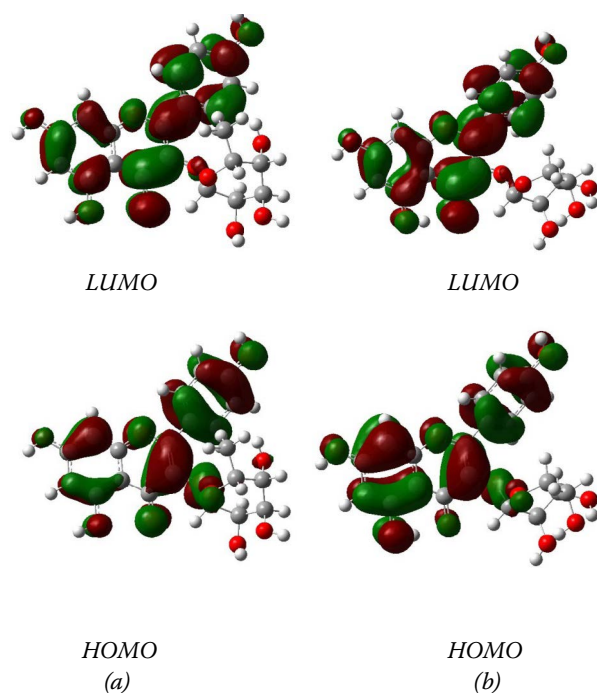


Figure 2. Molecular orbital occupancies for (a) Afzelin and (b) Juglanin

Molecular Electrostatic Potential(MEP) analysis

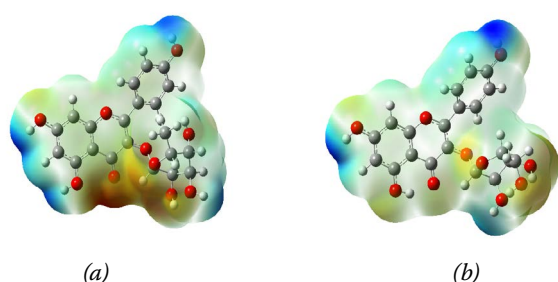


Figure 3. Electrotatic potential diagrams of (a) Afzelin and (b) Juglanin

MEP diagrams (Figure 3.) are helpful in understanding the charge distribution in a molecule. Here this analysis is been done to understand the electrostatic potential properties of the two studied molecules [6]. For afzelin highest electrostatic potential regions are been witnessed near hydroxyl units present in b and a ring hence they act as active electron donating sites. Similarly for the hydroxyl units of juglanin, the same observation is witnessed. Lower electrostatic potential regions are witnessed over the glycosyl region for both

the molecules, indicating its electron acceptor property hence said to be highly delocalized. From the above observation, it can be concluded that the molecules act as electron donors since they possess more number of higher electrostatic potential regions.

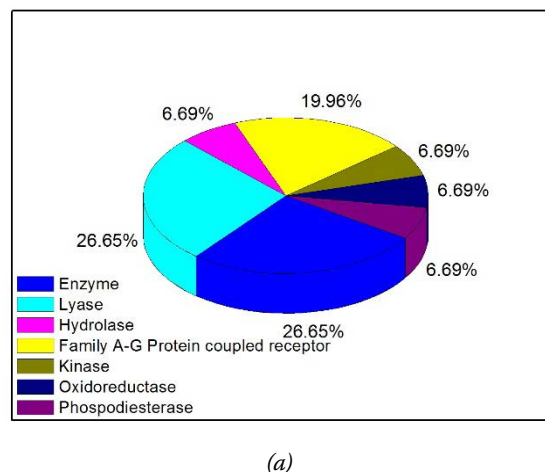
MOLECULAR DESCRIPTORS

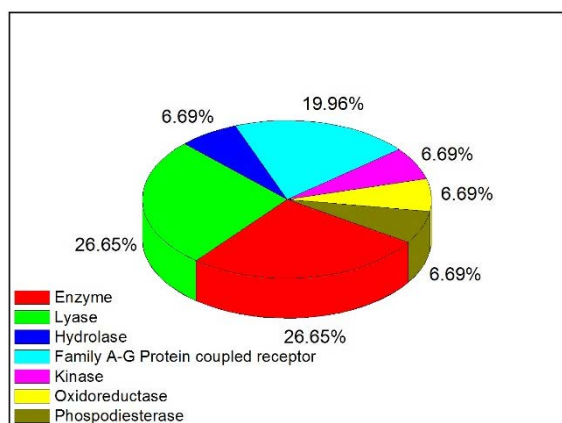
Table 1. Molecular descriptive parameters for afzelin and juglanin

Molecular descriptors	E_o (eV) of Afzelin	E_o (eV) of Juglanin
IP (eV)	5.66	6.12
EA (eV)	1.51	2.05
ω (eV)	2.07	2.03
S (eV)	0.24	0.24
X (eV)	3.59	4.08
η (eV)	3.11	4.10

To characterize the antioxidant property of a flavonoid, it is vital to compute χ , IP, EA, η , S and ω [7]. Ionization potential(IP) portrays electron donating ability, likewise chemical hardness(η) is a measure of resistance to charge transfer, while the electronegativity (χ) is a measure of the tendency to attract electrons in a chemical bond and is defined as the negative of the chemical potential in DFT . The maximum electron flow between a donor and an acceptor is governed by the decomposition of binding energy between the atoms and it is determined by the factor electrophilicity index (ω). The above molecular descriptor values obtained from the total orbital energy method for the investigated compounds are displayed in Table 1. Ionization energy profile shows that electron removal is more facilitated by afzelin than juglanin with a difference of 0.54 eV in magnitude. Both the molecules display lesser hardness and increased smoothness which facilitate enhanced structural activity to change its electronic configuration. The electron attracting ability for afzelin is quite easier than juglanin which is represented by the electronegativity values. The calculated molecular properties clearly confirm that afzelin and juglanin prefer to act as electron donor rather than electron acceptors. This is also an indicator of their antioxidant capability.

Target prediction analysis





(b)
Figure 4. Target prediction chart for
 (a) Afzelin and (b) Juglanin

Screening of targets for the lead compounds is considered to be an essential step in in-silico analysis, as it helps for easier identification for the potential target for inhibitory action [8]. Out of 500 hundred studied targets both afzelin and juglanin prefers lyase as well as enzymatic targets (Figure 4.) under homosapien class in higher percentages. Since inhibiting lyase and enzyme based target regulates imbalance in metabolism thereby facilitates good health and improves secondary metabolism in human body.

CONCLUSION

In the present work structural activity identification of kaempferol glycosides afzelin and juglanin through theoretical mode with the help of density functional theory is been carried out. Molecular geometry (bond length, bond angle, dihedral angle and minimum ground state energy conformer) are achieved with the hybrid density functional of a B3LYP parameter and triple zeta valence basis set 6-311G(d,p) adopted in the present investigation. The following results are arrived from observations made in result and discussion section.

Frontier molecular orbital analysis supports the well-known fact about reactivity of B-ring which here is characterized by bonding type of orbitals in highest occupied state for both the molecules. The energy gap is in the order of 4 eV for the two flavonoids resulting that both exhibit same kind of reactivity towards invading free radicals. Molecular electrostatic potential analysis depicts the presence if highest electrostatic potential regions over hydroxyl units in both the compounds. Henceforth these –OH units readily scavenges the free radicals through H-atom transfer mechanism.

Molecular descriptive parameter gives a deep insight regarding structural activity where both the compounds acts as electron donors rather than electron acceptors. Electron donation is the major concerned property of flavonoids, so in that way the flavonoids under study are potential antioxidants nominated for radical scavenging process.[9]

Target prediction analysis sheds light over lyase and enzymatic targets for azelin and juglanin thereby de-

picting their inhibitory action over pathogens through non-covalent interaction or electron donation.

Based on the above observations it is validated that both afzelin and juglanin exhibit better structural activity and are also suitable for inhibition of the targets.

REFERENCES

1. J.M. Calderón-Montaña, E. Burgos-Morón, C. Pérez-Guerrero and M. López-Lázaro, A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11, 298-344.
2. A.Galano, G.Mazzone , R Alvarez-Diduk , T Marino , J. R Alvarez-Idaboy , N. Russo. Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level Annu Rev Food Sci Technol. 7, 335-52.(2016)
3. M. Leopoldini, T. Marino, N.Russo, M. Toscano. Antioxidant properties of phenolic compounds. H-atom versus electrontransfer mechanism. J. Phys. Chem. B 108, 4916-4922.(2004).
4. R. G. Parr, and W. Yang, Density-Functional Theory of Atoms and Molecules, OUP, Oxford, (1989).
5. K. Sadasivam and R. Kumaresan. Antioxidant behavior of mearnsetin and myricetin flavonoid compounds — A DFT study. SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 79(1), 282–293.(2011).
6. R.Praveena, K. Sadasivam, R. Kumaresan, V. Deepha and R. Sivakumar, Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from Rhynchosiacapitata. SpectrochimcaActa A,103, 442-452.(2013)
7. D. Jeevitha, K. Sadasivam,R. Praveena, and R. Jayaprakasam DFT study of glycosyl group reactivity in quercetin derivatives, Journal of Molecular Structure 1120 15e24. (2016).
8. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci. Rep. 2017 7:42717.
9. L. Alvarado-Soto and R. Ramirez-Tagle , NICS: A Pssible new criterion to evaluate the structure-antioxidant activity relationship of phenolic compound , Oxidation Communications 34, No 3, 516–520 (2011)

Análisis del efecto de capilaridad en el procesos de infusión de bio-resinas en tejidos de fibra natural

E.A. Franco-Urquiza¹, B. Vázquez², C.A. Escalante-Velázquez^{1*}

¹Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT - CIDESI), Centro Nacional de Tecnologías Aeronáuticas (CENTA), Carretera Estatal 200, km 23, 76265, Querétaro, México. ²Universidad Tecnológica de Querétaro, Av. Pie de la Cuesta 2501, Nacional, 76148 Santiago de Querétaro, México.

Analysis of the capillary effect in the bio-resin infusion processes on natural fiber fabrics

Anàlisi de l'efecte de capil·laritat al processos d'infusió de bio-resines en teixits de fibra natural

RECEIVED: 13 JULY 2020; REVISED: 20 SEPTEMBER 2020; ACCEPTED: 7 OCTOBER 2020

ABSTRACT

In this work, Hele-Shaw cells were manufactured to evaluate the imbibition flow of two thermosetting resins on porous surfaces. Both resins turned out to be wettable liquids, although the GP resin had a smaller contact angle, favoring greater ease of penetrating capillary media.

The porous surfaces were the natural fibers of henequen, ixtle and jute. The compatibility of the fibers with the resins was favored with the use of chemical agents that modified the fibers, although the treatment by acetylation caused the degradation of the ixtle fiber. The compatibility promoted the impregnation speed of the fibers, significantly reducing the advance time of thermosetting resins compared to unmodified fabrics. Despite the results obtained, a higher advance speed did not necessarily imply a better impregnation of the fibers.

Keywords: Hele-Shaw, natural fibers, composites

RESUMEN

En este trabajo se presentan resultados de imbibición como función del tiempo de dos resinas termoestables en medios porosos confinados en celdas Hele-Shaw construidas con placas de vidrio. Una de las resinas (Epolam) es de origen sintético mientras que la otra (SR GreenPox) es una bio-resina. Ambas resinas resultaron ser líquidos mojables, aunque la resina GP presentó un ángulo de contacto más pequeño, favoreciendo la imbibición en las fibras. Los medios porosos consistieron en las fibras naturales de henequén, ixtle y yute. La compatibilidad de las fibras con las resinas se favoreció con el uso de agentes químicos que modificaron las propiedades superficiales de las fibras,

aunque el tratamiento por acetilación provocó la degradación de la fibra ixtle. La compatibilidad promovió una mayor velocidad de impregnación de las fibras, reduciendo notablemente el tiempo de avance de las resinas termoestables en comparación con los tejidos sin modificar. A pesar de los resultados obtenidos, una mayor velocidad de avance, no necesariamente implicó una mejor impregnación de las fibras.

Palabras clave: Hele-Shaw, fibras naturales, compuestos

RESUM

En aquest treball es van fabricar cel·les Hele-Shaw per avaluar el flux de imbibició de dues resines termoestables sobre superfícies poroses. Les dues resines van resultar ser líquids mullables, encara que la resina GP presentar un angle de contacte més petit, afavorint una major facilitat per penetrar en mitjans capil·lars.

Les superfícies poroses van ser les fibres naturals d'henequén, ixtle i jute. La compatibilitat de les fibres amb les resines es va afavorir amb l'ús d'agents químics que van modificar a les fibres, encara que el tractament per acetilació va provocar la degradació de la fibra ixtle. La compatibilitat promoure la velocitat d'impregnació de les fibres, reduint notablement el temps d'avanç de les resines termoestables en comparació amb els teixits sense modificar. Tot i els resultats obtinguts, una major velocitat d'avanç, no necessàriament implicar una millor impregnació de les fibres.

Paraules clau: Hele-Shaw, fibres naturals, compostos

*Corresponding author: carlos.escalante@cidesi.edu.mx

1. INTRODUCCIÓN

La capilaridad, es la capacidad de un fluido líquido para penetrar en superficies que contienen poros finos y grietas. La dinámica del flujo capilar guarda relación con ciertos aspectos prácticos en relación con el movimiento del fluido sobre las superficies, el flujo en materiales en medios porosos, etc. Por otra parte, el ascenso capilar en los medios porosos es el resultado del efecto capilar es contrarrestado por la gravedad. Un medio poroso se puede considerar como un conjunto de capilares que tiene una sección transversal desigual. La tensión superficial juega un papel importante, ya que si un capilar está parcialmente sumergido en un fluido, el líquido dentro del capilar puede subir o bajar dependiendo del ángulo de contacto. Si el ángulo de contacto es inferior a 90 °, el líquido asciende dentro del capilar ^{1,2}.

Bell y Cameron ³ analizaron por primera vez el flujo impulsado por capilaridad y resistido solo por las pérdidas viscosas. Sin efecto de la gravedad, mostraron que la posición del frente embebido avanza en el tiempo de acuerdo con la relación $h \sim t^{1/2}$ donde h es la distancia de avance del frente y t es el tiempo. Unos años más tarde (1911) Green, Ampt, Lucas y Washburn ⁴ calcularon la constante de proporcionalidad para el caso de un tubo con una sección transversal circular, y encontraron que dicha constante es función del radio del tubo y las propiedades del líquido: viscosidad, tensión superficial y ángulo de contacto ⁴.

A fin de analizar el impacto de los fenómenos capilares también conocidos como flujos de imbibición (cuando un fluido mojante desplaza a otro no mojante) se han planteado diferentes experimentos para estudiar los procesos de imbibición, de particular interés ha resultado el estudio de la imbibición en las llamadas celdas de Hele-Shaw (HS). Este tipo de celdas ha sido ampliamente utilizado para el diseño de modelos experimentales ad-hoc para el estudio de las características y mecanismos del desplazamiento de flujo espontáneo sin medio poroso ⁵ y con medio poroso (referencia). Estas celdas consisten en un par de placas planas de vidrio transparente, separadas mediante separadores rígidos, la separación de entre las placas es determinada por el espesor de los separadores el cual debe ser muy pequeño (del orden de milímetros o menor) a fin de observar fenómenos capilares. Su construcción es sencilla, pero han resultado ser modelos físicos con muchas aplicaciones.

Algunas aplicaciones que hacen uso de celdas HS, sin medio poroso, consisten en el estudio de los procesos de imbibición espontánea, en los cuales un fluido desplaza a otro fluido, por ejemplo Soria et al. ⁵, utilizaron agua destilada como fluido desplazante y Sotrol 170 como fluido desplazado, su estudio incluye la variación del espesor de los separadores y para este caso en particular, encontraron una separación óptima (0.015 cm) para la cual se observa una mayor eficiencia de barrido⁵. Tales procedimientos experimentales, toman en cuenta la mojabilidad del medio y las propiedades del flujo de la resina polimérica.

Investigaciones más recientes⁶, tratan sobre capilaridad en los modelos Hele-Shaw, tanto analítica como experimentalmente, para la elevación capilar con y sin gravedad.

Por otro lado, estudios que consideran procesos de imbibición en celdas HS con medio poroso y que consideran flujos multifásicos, están relacionados a aplicaciones para remediación de suelos así como en estudios de recuperación de aceite ^{7,8}. En particular, en este trabajo es de interés estudiar el efecto de los fenómenos capilares en procesos conocidos como moldeo líquido de compuestos ⁹ (LCM, por sus siglas Liquid Composite Molding). Estas técnicas son utilizadas en los procesos de manufactura de material compuesto a partir de resinas epóxicas y fibras largas. Estos procesos consisten en la inyección de resina (con algún agente de curado) en tejidos de algún tipo de fibra que sirven como refuerzo, utilizando una bomba de vacío para ejercer succión (presión negativa) para facilitar el flujo de resina sobre las fibras. Es muy conocido que en este proceso el flujo capilar tiene impacto importante. y es de gran importancia en los procesos de manufactura de compuestos con fibras largas ⁹.

Los tejidos se tejen a partir de mechas, las cuales a su vez están formadas por filamentos, cada mecha, dependiendo del tipo de tejido- puede contener entre 5000 y 12000 filamentos. Debido a estas características este tipo de tejidos puede considerarse un medio poroso ¹⁰.

En este trabajo, se reportan resultados de flujos de imbibición de resinas en celdas de HS, con medio poroso, dicho medio poroso está formado por tejidos de fibras naturales. Se analizaron tres tipos de fibras: henequén, yute e ixtle, además con el objetivo de modificar sus propiedades superficiales, algunas muestras recibieron un tratamiento químico ácido y otras un tratamiento químico base. Se utilizaron dos resinas, las cuales son utilizadas para la manufactura de materiales compuestos con fibras largas. Para cada caso, se presenta la distancia de avance como función del tiempo y se muestran comparaciones de los procesos de imbibición de resinas en fibras con y sin tratamiento.

2. MATERIALES

Materiales

Fibras naturales de henequen (*Agave fourcroydes*), ixtle (*Agave vivipara*) y yute (*Corchorus olitorius*), con la siguiente nomenclatura: FH, FI, FY, respectivamente, se emplearon como medios porosos para evaluar el efecto capilar en los procesos de infusión de resina líquida.

Las fibras naturales de henequén e ixtle se conformaron de aproximadamente 30 y 50 hilos retorcidos respectivamente, para formar mechas de cuerda de entre 4-6 mm de grosor promedio. Ambas fibras se adquirieron a cordelería Santa Inés en Yucatán, México. Ambas fibras naturales fueron tejidas en una configuración bidireccional (plain weave) por artesanos mexicanos del estado de Querétaro en México. La fibra de yute tejida, proveniente de Centro América, se adquirió a través de bolsas publicitarias SA de CV. Los tejidos de

henequén, ixtle y yute tuvieron un espesor promedio de 1.63, 1.46 y 0.88 mm.

Como fluidos de imbibición se empleó una resina líquida Epolam 2015 (Epolam) de Axson technologies con una viscosidad a 25 °C de 1500 mPa.s¹¹ y una resina bio-resina SR GreenPoxy 56 (GP) de Sicomin, con una viscosidad a 25 °C de 800 mPa.s. Para evitar cambios en la viscosidad durante el proceso de imbibición ambas resinas se utilizaron *sin* el agente endurecedor. Las celdas Hele-Shaw fueron construidas utilizando vidrio portaobjetos pulidos LAUKA02350 de 75x38 cm de longitud y espesor de 1 mm.

Métodos experimentales

Para analizar el fenómeno de imbibición se diseñaron celdas Hele-Shaw, utilizando dos portaobjetos colocados de forma paralela, con un pequeño espacio entre ellas para permitir el flujo de resina. Primero se estudió el proceso de imbibición en celdas HS sin medio poroso utilizando separadores del orden del espesor de los tejidos (0.21, 0.25 y 0.39 mm), en el caso de celdas HS con medio poroso, la distancia de separación entre las placas fue determinada por el espesor del tejido de la fibra estudiada.

Es importante resaltar que las placas de vidrio se limpiaron con etanol previo a cada ensayo.

Para todas las pruebas imbibición, se colocó una regla graduada como referencia de distancia. La resina se depositó en la entrada de la celda utilizando una jeringa convencional, cuidando no forzar el flujo de resina dentro de la celda, el cual debe de ser espontáneo. A continuación se tomaron lecturas del frente de avance como función del tiempo, en función de la separación los tiempos pueden durar horas o días. La Figura 1 muestra el procedimiento inicial para el caso de imbibición sin medio poroso.

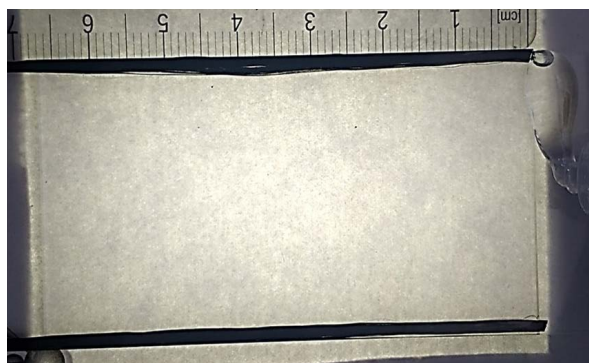


Figura 1. Proceso de imbibición de la resina Epolam en la celda Hele-Shaw.

El método de la gota sésil se utiliza a menudo para realizar mediciones directas del ángulo de contacto, que determina la mojabilidad de un sólido respecto a un líquido. Para medir el ángulo de contacto entre las resinas epoxi sobre la placa de vidrio se utilizó un medidor de ángulo de contacto óptico OCA20 de Data-Physics Instruments. Se analizaron gotas de resina de 3 ml, depositadas en tres secciones diferentes de la superficie del vidrio utilizado para la celda HS. La temperatura ambiente se mantuvo en 25° C.

Las fibras se sometieron a dos tratamientos químicos para mejorar su compatibilidad con la resina, para ello, se lavaron previamente en agua ionizada a 75 ° C durante 2 h, con un posterior secado a 85 ° C durante 2 h en un horno de convección de aire. El primer método consistió en un tratamiento alcalino bajo una solución al 3% de NaOH agitada mecánicamente a 85 ° C durante 2 h. El segundo método consistió en realizar una digestión ácida en una solución de ácido acético al 50% agitada mecánicamente a 85 ° C durante 2 h, en este caso se agregaron dos gotas de ácido sulfúrico como catalizador. Después de los tratamientos químicos, las fibras se lavaron en agua desionizada, hasta alcanza un pH 7 y posteriormente se secaron a 85 ° C durante 2 h.

3. RESULTADOS

La **Figura 2** muestra un ejemplo de las imágenes capturadas durante el ensayo para determinar el ángulo de contacto para de la resina Epolam sobre la placa de vidrio y el ángulo de contacto de la resina GP sobre la placa de vidrio.

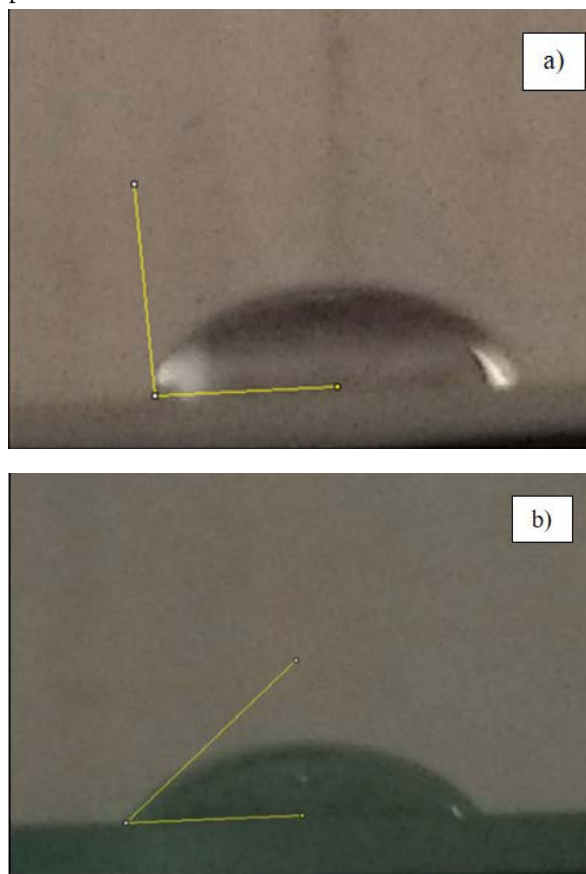


Figura 2. Fotografías capturadas durante el análisis del ángulo de contacto sobre las placas de vidrio correspondientes a) resina Epolam 2015 y b) resina GP.

La **Tabla 1** presenta los resultados obtenidos. Es posible apreciar que ambas resinas epoxi son inferiores a 90°, lo que permite suponer que el vidrio utilizado para las celdas HS no impide el deslizamiento de la gota. Tomando en cuenta los valores registrados en la **Tabla 1**, la resina GP de desliza con mayor facilidad

en el vidrio que la resina sintética. Lo anterior podría deberse a la menor viscosidad de la resina GP.

Tabla 1. Valores del ángulo de contacto obtenido para las resinas sobre el vidrio y las fibras

Medio poroso	Epolam	GP
Vidrio	63.96	46.10
FH	53.31	45.24
FI	51.8	43.20
FY	46.12	33.28

Al utilizar muestras de fibras naturales como medio poroso, en sustitución del vidrio, se aprecia claramente que la resina GP posee una mayor mojabilidad sobre las resinas, lo que se podría atribuir al contenido orgánico de la resina GP y su compatibilidad con las fibras naturales.

El proceso de imbibición en celdas HS con fibras naturales de Henequén, Ixtle y Yute se evaluó utilizando la resina epoxi sintética Epolam y la resina biobasada GreenPoxy.

La **Figura 3** muestra las gráficas distancia vs tiempo de avance, obtenidas después de registrar el avance de la resina sintética Epolam (**Figura 3a**) y la resina biobasada GP (**Figura 3b**) sobre las fibras naturales de henequén, ixtle y yute, las cuales fueron utilizadas como medios porosos.

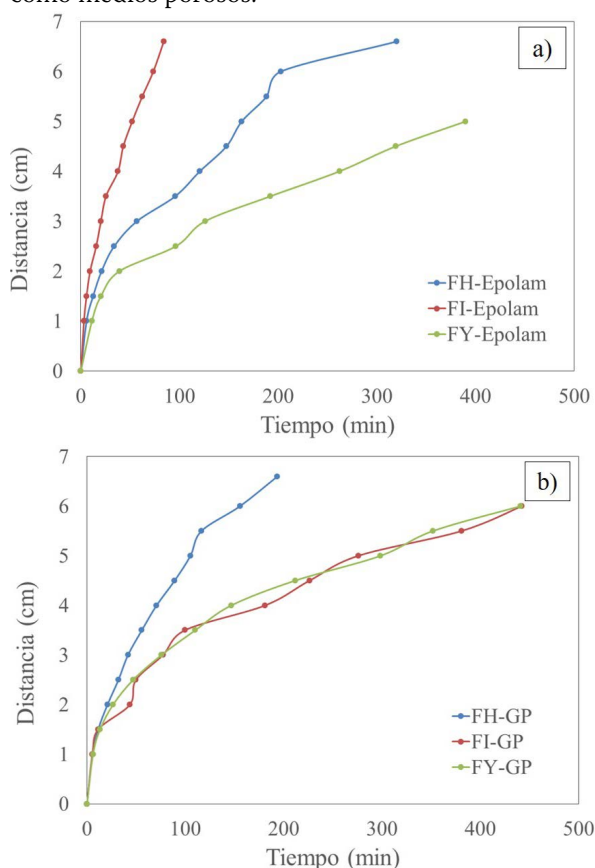


Figura 3. Gráficas de distancia recorrida vs tiempo correspondientes a la imbibición de fibras naturales sobre: (a) resina epolam, (b) resina GP.

Para ambas resinas, resulta evidente que la velocidad de impregnación es mucho mayor al inicio y se va ralentizando conforme la distancia recorrida. La resina Epolam (**Figura 3a**) muestra un avance mucho más lineal, lo que representa un proceso de imbibición en las fibras naturales más corto que con la resina GP.

A partir de la **Figura 2a**, se puede apreciar que el proceso de imbibición se completó en los tejidos de fibra henequén e ixtle, mientras que en el tejido de yute la resina solo pudo desplazarse 5 cm. Además, el proceso de imbibición fue notoriamente más rápido en la fibra ixtle que en la fibra de henequén, ya que la resina tardó solamente 73 minutos en desplazarse 6 cm a través de la fibra ixtle, respecto a los 202 minutos que tardó para la fibra de henequén.

Por su parte, la fibra Yute presentó un tiempo de embebido mucho mayor (310 min para un desplazamiento de 5 cm) que el resto de las fibras naturales. Lo anterior se atribuyó a la configuración del tejido. A pesar de que el yute tiene un tejido bidireccional, físicamente es un tejido abierto, lo que restringe el paso de resina. La impregnación es efectiva, pero el recorrido tarda más tiempo que una configuración más cerrada.

En el caso de la resina GP de la **Figura 2b**, se pudo apreciar claramente que el proceso de imbibición se completa con el tejido de fibra de henequén, mientras que los tejidos de fibra ixtle y yute solo logran ser impregnados hasta los 6 cm aproximadamente y en un tiempo muy similar. En este caso, la velocidad de impregnación podría estar influenciada por la compatibilidad de la fibra con la resina bioepoxi. Una mayor compatibilidad debería de permitir una impregnación más lenta pero de mejor calidad.

Una forma de evaluar la compatibilidad y su efecto en la velocidad de desplazamiento de resinas en celdas HS sería medir el peso de la celda posterior a la completa impregnación del tejido de fibra utilizado como medio poroso.

La **Tabla 2** presenta los resultados obtenidos del peso de la celda posterior al proceso de imbibición de resina Epolam y GP sobre las fibras naturales

Tabla 2. Peso de la celda HS sobre la absorción de resina por parte de las fibras naturales

Celda HS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Resina absorbida (g)
FH-Epolam	26.6	29.8	3.2
FI-Epolam	28.6	30.1	1.5
FY-Epolam	23.9	29.8	5.9
FH-GP	27.1	29.9	2.8
FI-GP	27.4	31.2	3.8
FY-GP	24.6	28.7	4.1

La fibra de ixtle absorbe muy poca cantidad de resina Epolam, lo que facilita el desplazamiento de ésta sobre el tejido. En el caso de la resina GP, la fibra de henequén presentó un valor de resina más bajo, lo que conlleva a un rápido avance de la resina biobasada. En ambas resinas, la celda HS conteniendo fibra de yute fue la que presentó un mayor peso al finalizar el proceso de imbibición.

Para tener un panorama más amplio de lo que está ocurriendo con el proceso de impregnación de las fibras naturales, es necesario analizar la calidad de los tejidos impregnados.

La **Figura 4** presenta fotografías de las celdas HS conteniendo los tejidos de fibra natural durante el proceso de imbibición utilizando ambas resinas epoxi. Las fotografías se presentan con un desplazamiento similar y sin considerar el tiempo de impregnación.

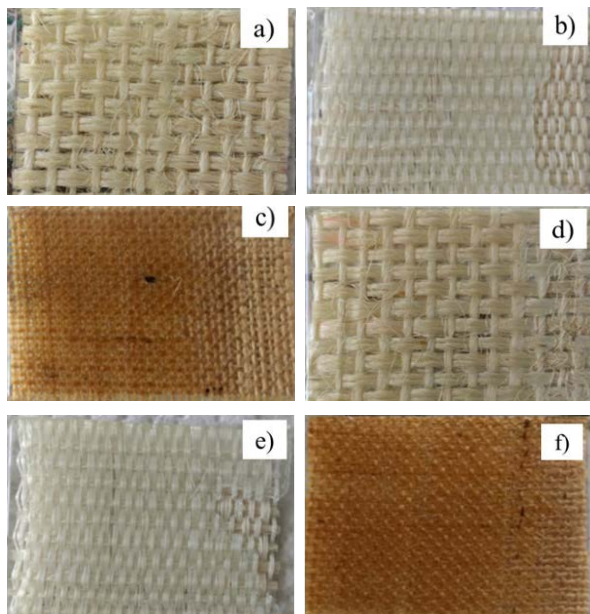


Figura 4. Fotografías tomadas durante el proceso de imbibición correspondientes a: a) FH-epolam, b) FI-epolam, c) FY-epolam, d) FH-GP, e) FI-GP, f) FY-GP.

A primera vista, no parece haber cambios en la calidad de la impregnación de las fibras, ya que todos los tejidos analizados en este trabajo no parecen presentar imperfecciones. Lo anterior hace necesario un análisis por estereoscopio para observar con mayor detenimiento la imbibición de las fibras naturales.

En un intento por profundizar más en la calidad del proceso de imbibición sobre las fibras naturales, se realizaron dos tipos de tratamientos químicos, el primero de ellos fue tratar a las fibras naturales con hidróxido de sodio (NaOH), para producir una mayor cantidad de grupos hidroxilos que permitan una mayor compatibilidad, al menos con la resina bioepoxi.

El segundo tratamiento consistió en un proceso de acetilación para sustituir los grupos OH por el grupo carboxílico – COOH. Los resultados se presentan en la **Figura 5**, la cual muestra el tiempo de recorrido de la resina Epolam y GP sobre los tejidos de fibras naturales henequén, ixtle y yute modificados con NaHO.

El tratamiento realizado a las fibras naturales con NaOH favoreció la velocidad de impregnación de las fibras, reduciendo notablemente el tiempo de avance de las resinas Epolam y GP si las comparamos con los tejidos sin modificar. Además, a diferencia de los tejidos no modificados, la presencia de grupos OH permitió la completa impregnación de los tejidos de fibra natural, por lo que ambas resinas lograron alcanzar un desplazamiento de 6.5 cm.

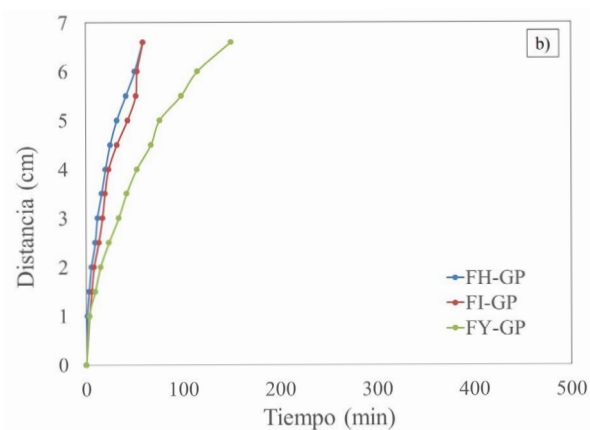
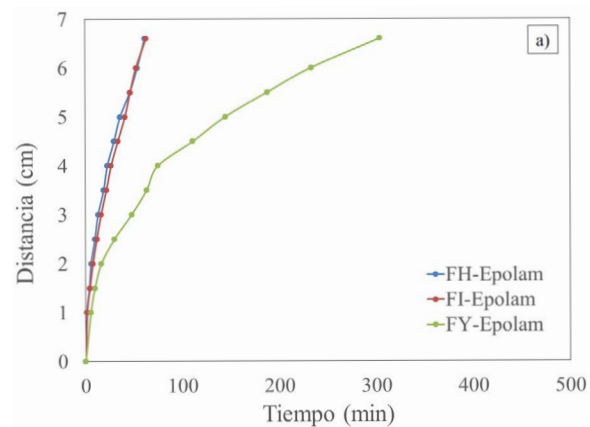


Figura 5. Gráficas de distancia recorrida vs tiempo correspondientes a la imbibición de fibras naturales modificadas sobre: (a) resina epolam, (b) resina GP.

La resina GP en el tejido de fibra de henequén presentó un tiempo de avance de 59 minutos, que representa una reducción del 67% respecto a la fibra sin tratar. Similarmente, las fibras de ixtle y yute presentaron una reducción en el tiempo de imbibición de aproximadamente 88 y 74% respectivamente. Los resultados obtenidos permiten confirmar que el tratamiento por NaOH favoreció la compatibilidad de las fibras y permitió una mayor velocidad de impregnación.

En el caso de las fibras tratadas químicamente por acetilación, solamente se pudo aplicar este tratamiento a las fibras de henequén y yute. La fibra de ixtle se deterioró considerablemente y no fue posible de utilizar. Además, el proceso de acetilación no favoreció el tiempo de avance de la resina GP sobre las fibras naturales tratadas. De hecho, la fibra de yute no pudo ser impregnada por completo, teniendo solo un avance de 4.5 cm en un tiempo aproximado de 308 minutos, siendo un 45 % mayor que el tiempo obtenido por el tejido de yute sin modificar.

A pesar de los resultados obtenidos, es necesario resaltar que obtener una mayor velocidad de avance, no necesariamente implica una mejor impregnación de la fibra. Por lo anterior, para evaluar correctamente la calidad del proceso de imbibición, es necesario considerar varios aspectos tales como el tipo de resina, la naturaleza de las fibras y la configuración de los tejidos.

La **Figura 6** muestra las fotografías tomadas de las diferentes fibras naturales evaluadas en este trabajo para comparar el proceso de imbibición respecto al tipo de resina, la naturaleza de las fibras y la configuración de los tejidos.

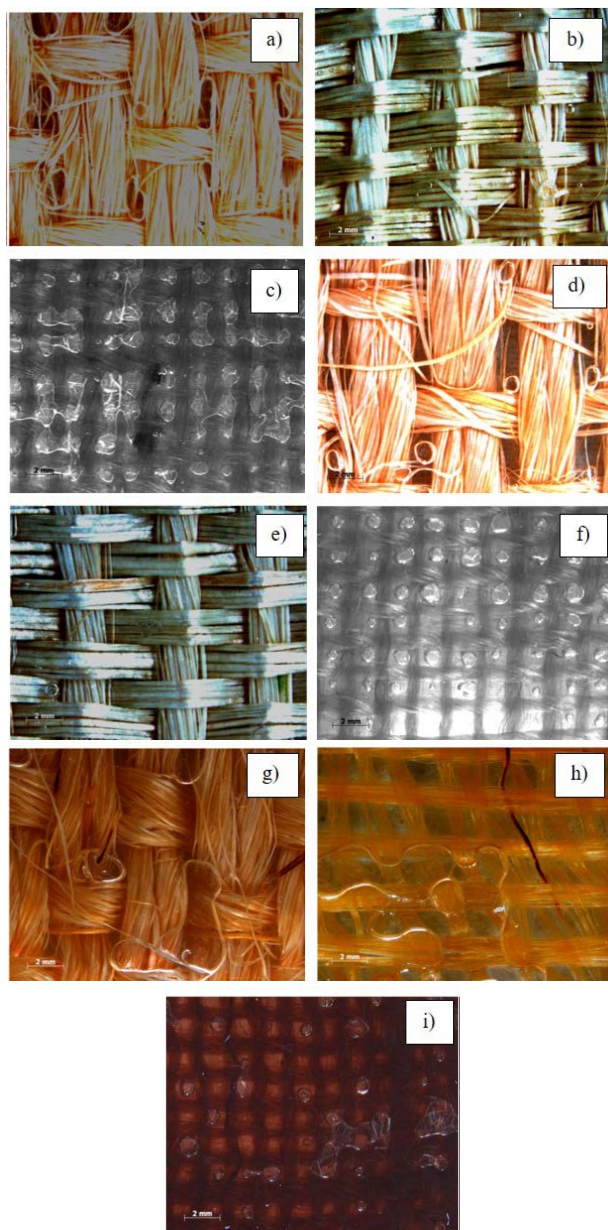


Figura 6. Fotografías tomadas posterior al proceso de imbibición de las fibras naturales: a) FH-epolam, b) FI-epolam, c) FY-epolam, d) FH-GP, e) FI-GP, f) FY-GP, g) FH-GP/NaOH, h) FI-GP/NaOH, i) FY-GP/NaOH.

Con respecto a la naturaleza de las fibras naturales, se pueden destacar ciertos rasgos físicos. Por ejemplo, el henequén presenta un tejido semiflexible que favorece su deshilado al momento de su tejido, y se observa claramente como hilos de fibra de henequén se encuentran desordenados. Contrariamente, la fibra ixtle es mucho más rígida que el henequén y el yute, lo que permite que los hilos de ixtle permanezcan firmes y sin aperturas entre la trama. Finalmente, la fibra de yute es muy flexible, de bajo calibre y con una apertura del tejido

similar a una malla para tamizado. Estas diferencias físicas repercuten en el proceso de imbibición.

Es posible apreciar que el tejido ixtle presenta un menor contenido de burbujas o vacíos que las fibras de henequén y yute. Algunos vacíos se logran apreciar en las hendiduras del tejido de henequén y claramente en las aperturas del tejido de yute. Por tanto, la configuración del tejido abierto favorece por mucho la formación de burbujas durante el proceso de impregnación respecto a un tejido cerrado, independientemente del tipo de resina, tal como se puede apreciar en las **Figuras 6a – 6f**.

En relación al tipo de resina, las fibras naturales presentan cierta compatibilidad con la resina biobasada. Lo anterior se puede apreciar claramente en la densidad de burbujas presente en los tejidos de henequén y yute (**Figura 6a y Figura 6c**) impregnados con resina sintética Epolam.

Para mejorar la compatibilidad y, en cierta medida, la impregnación de tejidos de fibra natural, las fibras se someten a tratamientos químicos. En este trabajo la compatibilización de fibras utilizando NaOH favoreció la velocidad de embebido, pero no la calidad de impregnación, según se puede apreciar en la **Figura 6g, Figura 6h y Figura 6i**.

En el caso de la fibra ixtle, resulta muy notoria la degradación de la fibra al ser sometida a un proceso químico, lo que favorece la formación de burbujas durante el proceso de imbibición. Las fibras henequén y yute no sufrieron un aparente daño por el efecto de la compatibilización. No obstante, el tejido de henequén mostró burbujas de mayor tamaño comparado con el tejido sin modificar. El tejido de yute continúa siendo el que mayor densidad de vacíos promueve debido principalmente a su configuración.

Similares observaciones se encontraron con los tejidos tratados químicamente por acetilación.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se fabricaron celdas Hele-Shaw para evaluar el flujo de imbibición de dos resinas termoestables en medios porosos formados por fibras naturales: henequén, ixtle y yute. Ambas resinas resultaron ser líquidos mojables, aunque la resina GP presentó un ángulo de contacto más pequeño, favoreciendo una mayor facilidad para penetrar en medios capilares.

La compatibilidad de las fibras con las resinas se favoreció con el uso de agentes químicos que modificaron a las fibras, aunque el tratamiento por acetilación provocó la degradación de la fibra ixtle. La compatibilidad promovió la velocidad de impregnación de las fibras, reduciendo notablemente el tiempo de avance de las resinas termoestables en comparación con los tejidos sin modificar. A pesar de los resultados obtenidos, una mayor velocidad de avance, no necesariamente implicó una mejor impregnación de las fibras.

La fibra de henequén presentó un tejido semiflexible, mientras que la fibra ixtle es mucho más rígida que el henequén y el yute, lo que permite que los hilos de ixtle permanezcan firmes y sin aperturas entre la trama. Estas diferencias físicas repercutieron en el

proceso de imbibición, ya que el tejido ixtle presentó un menor contenido de vacíos, mientras que la fibra de yute presentó diversas burbujas posterior a su impregnación, lo cual fue atribuido a la configuración de un tejido más abierto, lo que favorece la presencia de aire atrapado.

En general, la formación de burbujas durante la imbibición de resina en tejidos de fibras ocurre debido al efecto combinado de dos factores. El primer factor que influye es la arquitectura de las fibras la cual determina dos escalas, la primera escala depende de la distancia entre los filamentos que forman las mechas, esta es una escala micro, y una segunda escala depende de la separación entre las “mechas”, siendo una escala mesoscópica (del orden de milímetros). De acuerdo, con lo anterior, la capilaridad es mayor en el primer caso, por lo que la resina fluye más rápido entre los hilos y más lento en los espacios abiertos entre las mechas. El segundo factor, que influye es la dirección de las fibras: las resinas fluye más rápido en las fibras longitudinales, y más lento a través de ellas.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses financieros competitivos conocidos o relaciones personales que podrían haber influido en el trabajo reportado en este manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Secretaría de Educación Pública y CONACYT a través del Fondo de Ciencia Básica (SEP-CONACYT), número de subvención CB-2015-01-257458.

EA Franco-Urquiza y CA Escalante-Velázquez expresan su especial agradecimiento al “Programa de Investigadores de CONACYT (Cátedras CONACYT)”.

REFERENCIAS

1. A. Adamson and A. Gast, “Physical Chemistry of Surfaces,” *John Wiley & Sons Inc., 6a Edición, Department of Chemistry, University of Southern California, Los Angeles California*, 1997.
2. F. Mugele and H. J., “Introduction to Capillarity and Wetting Phenomena,” in *Electrowetting: Fundamental Principles and Practical Applications*, Wiley-VCH Verlag, 2019.
3. J. Bell and F. Cameron, *J. Phys. Chem.* 10, p. 658–674., 1906.
4. E. W. Washburn, “LA DINÁMICA DE FLOK CAPILAR,” *DEPARTMENT OF CERAMIC ENGINEERING*, pp. 273-283, 1921.
5. J. A. Soria and H. A., “Spontaneous Imbibition Processes in Hele-Shaw Cells,” *AIChE Journal*, pp. 1513-1523, 2001.
6. X. Clotet, R. Planet and J. Ortín, “Capillary rise in Hele-Shaw models of disordered media,” *Journal of Colloid and Interface Science*, p. 387–395, 2012.
7. G. Saffman and G. I. Taylor, “The penetration of a fluid into a porous medium or Hele-Shaw cell containing a more viscous liquid,” *Proceedings of the Royal Society A*, Febrero 1958.
8. G. M. Homsy, «Viscous Fingering in Porous Media,» *Ann. Rev. Fluid Mech.*, vol. 19, pp. 271-311, 30 Noviembre 1987.
9. Composite Integration Ltd, «Sobre RTM (Resin Transfer Molding),» 2000. [En línea]. Available: <http://www.composites-rtm.com>. [Último acceso: 2018].
10. J. d. S. Porto, «COMPUTATIONAL MODELING OF RTM AND LRTM PROCESSES APPLIED TO COMPLEX GEOMETRIES,» *Engenharia Térmica (Thermal Engineering)*, pp. 93-99, 2012.
11. AXSON, «AXSON,» Marzo 2018. [En línea]. Available: <http://www.axson-technologies.com/es/index.html>.

Evaluation of anthropogenic impacts in sediments from an aquaculture influenced area: the San Pedro river (Spain)

Mirella Peña-Icart^{1,2}, Carolina Mendiguchía¹, Margarita Villanueva Tagle³, Mario Simeón Pomares-Alfonso^{2,*}, Carlos Moreno¹

¹Faculty of Marine and Environmental Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain.

²Institute of Material Sciences and Technology, University of Havana, 10400 Plaza, La Habana, Cuba.

³Faculty of Chemistry, University of Havana, 10400, Plaza, La Habana, Cuba.

Evaluación del impacto antropogénico en sedimentos de una zona con influencia de acuicultura: Río San Pedro (España)

Avaluació de l'impacte antropogènic en sediments d'una zona amb influència d'aquicultura: Riu Sant Pere (Espanya)

RECEIVED: 6 JULY 2020; REVISED: 12 DECEMBER 2020; ACCEPTED: 31 DECEMBER 2020

ABSTRACT

Concentrations of Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, and Zn in sediments from San Pedro River were determined to assess the anthropogenic effects. Temporal and spatial variation studies of metal concentrations allowed to identify aquaculture activities as the main metals source. Additionally, Mn was also related with a wastewater treatment plant and Pb with the use of leaded additives in gasolines and its banishment after 2001. Nevertheless, San Pedro River can be considered, in general, as a minor contaminated area, although sampling stations related with aquaculture activities showed a moderate pollution by Cu, Co and Ni. In spite of this, metal concentrations in sediments from San Pedro River presented a low risk for the biota. Only Ni and Cr concentrations were above the probable effect range within which adverse effects frequently occur. In fact, a poor chemical status of San Pedro River was observed for these elements.

Keywords: aquaculture; environmental status; metals; San Pedro River; Sediments

RESUMEN

Se determinaron las concentraciones de Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti y Zn en sedimentos del río San Pedro para evaluar los efectos antropogénicos. Los estudios de variación temporal y espacial de las concentraciones de metales permitieron identificar las actividades acuícolas como la principal fuente de metales. Adicionalmente, el

Mn también se relacionó con una planta de tratamiento de aguas residuales y el Pb con el uso de aditivos con plomo en gasolinas y su eliminación a partir de 2001. Sin embargo, el río San Pedro puede considerarse, en general, como un área de baja contaminación, aunque las estaciones de muestreo relacionadas con las actividades de acuicultura mostraron una contaminación moderada por Cu, Co y Ni. A pesar de esto, las concentraciones de metales en los sedimentos del río San Pedro presentaron un riesgo bajo para la biota. Solo las concentraciones de Ni y Cr estuvieron por encima del rango de efecto probable dentro del cual ocurren con frecuencia los efectos adversos. De hecho, se observó un pobre estado químico del río San Pedro para estos elementos.

Palabras claves: acuicultura; estado ambiental; metales; río san pedro; sedimentos

RESUM

Es van determinar les concentracions de Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti i Zn en sediments del riu Sant Pere per avaluar els efectes antropogènics. Els estudis de variació temporal i espacial de les concentracions de metalls van permetre identificar les activitats aquícoles com la principal font de metalls. Addicionalment, el Mn també es va relacionar amb una planta de tractament d'aigües residuals i el Pb amb l'ús d'additius amb plom

*Corresponding author: nohvigari@itcm.edu.mx

en gasolines i la seva eliminació a partir del 2001. No obstant això, el riu Sant Pere pot considerar-se, en general, com un àrea de baixa contaminació, tot i que les estacions de mostreig relacionades amb les activitats d'aqüicultura van mostrar una contaminació moderada per Cu, Co i Ni. Malgrat això, les concentracions de metalls en els sediments del riu Sant Pere van presentar un risc baix per a la biota. Només les concentracions de Ni i Cr van estar per sobre de la franja d'efecte probable dins el qual ocorren amb freqüència els efectes adversos. De fet, es va observar un pobre estat químic del riu Sant Pere per a aquests elements.

Paraules clau: aquicultura, estat ambiental, metalls, riu Sant Pere, sediments

1. INTRODUCTION

Metals in sediments have been extensively used as tracers of anthropogenic impacts in marine environment.^{1,2,3} This fact is related with the capacity of sediments to retain these elements, being considered as historical archives of metal contamination.⁴ In this way, sediment cores can be used to determine contamination episodes in an area as well to establish the evolution of metal contamination from a preindustrial period.^{4,5,6} However, metal contents in surface sediments can reflect the actual metal sources in the area and a temporal study of these surface sediments could be useful to detect changes in the sources in a short time scale.^{7,8,9}

Among the different anthropogenic activities, metal contamination in sediments is usually related with diverse industrial activities, as tanneries or chemical industry, as well to agricultural activities and urban wastes.^{2,5,6,8,10} But in the last years metals appear as non-conventional contaminants in other human activities as aquaculture, usually related with other kind of pollutants as organic matter or nutrients.^{11,12} Several authors have reported high levels of copper and zinc in fish farm sediments in relation with undigested feed and faecal inputs, among other sources (Schendel et al., 2004).¹²⁻¹⁶

Nevertheless, distinguish between anthropogenic and natural contributions to metal concentrations in sediments can be difficult, due they could be naturally enriched in several elements.^{17,18} For this reason, different approaches have been performed to evaluate the anthropogenic effects on metal concentrations in marine sediments, as the use of the geoaccumulation index or the enrichment factor, which have been widely used with this aim.^{10,19-26} In addition, sediment quality guidelines provide a useful tool to assess the potential effects on the biota due to the metals content in marine sediments.²⁷

The present study has been performed in an aquaculture area near Río San Pedro (Spain). Its waters bathe a part of the Bahía de Cádiz Natural Park, communicating through the "Caño de la Cortadura", with the "Paraje Natural Isla del Trocadero". Among the main environmental values of this area, the great diversity of maritime-terrestrial transition ecosystems stands

out, constituting an important habitat for migratory species of bird fauna. However, this park has several environmental issues. One of the main is its location in an urban-industrial environment, which puts great pressure on the Park, especially in the form of discharges that produce water pollution, in addition to strong tourist pressure. To reduce these adverse effects, a sewage treatment plant was established in this area along the river bank, next to the Río San Pedro industrial zone. This way, waters from the industrial zone are treated before being discharged. Thus, effluents from aquaculture facilities are the only waters that reach the San Pedro River without any treatment.

In this work, the effect of aquaculture activities on the concentrations of several metals (Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, and Zn) and organic matter has been determined in sediments from an aquaculture area, the San Pedro River (Spain). The present study complemented a previous work, where enrichments in copper, zinc and lead concentrations in sediments were detected in the study area.¹² In addition, temporal variations in metal concentrations are studied in relation with changes in the anthropogenic sources.

Provided results can be used as a reference to evaluate the posterior influence of aquaculture activities on the metal concentrations in this and in others similar ecosystems. A methodology for evaluating sediment quality is proposed using different suitable indices.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study area

Sediments were collected in the San Pedro River, an arm-of-the-sea placed in the south of Spain, where several aquaculture facilities are located (Fig. 1). As has been previously described, five sampling stations were established along the study site. Stations 1 and 2 were located near the mouth of the river, where the influence of fish farms effluents is almost negligible. The sampling station 5 receives the effluents of a farm devoted to intensive land-based aquaculture, meanwhile stations 3 and 4 present minor aquaculture activities. In the inner part, the San Pedro River presents scarce water renovation due its "U" shape, favouring the deposition of particulate matter from aquaculture effluents.



Fig. 1. Location of sampling stations.

2.2. Materials and methods

Sediments were taken from a boat using an Ekman-Birge grab during four sampling campaigns, three of them in the years 1997, 1998 and 1999 in order to cover a complete culture cycle in the aquaculture farm located at sampling station 5. The last sampling campaign was carried out in 2010 to evaluate changes in the anthropogenic pollution sources observed in the area.

After sampling, sediments were mechanically sieved (< 500 µm), dried at 105 °C and homogenised with an agate mortar.

Determination of organic matter (OM) was performed in triplicate as Loss on Ignition (LOI). One g of sediment, previously homogenised as explained before, was put into a platinum crucible and heated in a muffle furnace (Heraeus Instruments, Germany) at 500°C until constant weight (approximately for 3 hours). More details can be found elsewhere.¹²

Total concentrations of metals (Al, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Ti and Zn) were determined by a modification of USEPA 3052 digestion method.²⁸ Samples of 0.25 g were digested in Teflon vessels with 1 mL of hydrofluoric acid and 4 mL of nitric acid using a microwave oven (Milestone Ethos100) with the following programme: 5 minutes at 500 W and then, 16.5 minutes at 1000 W maintaining a constant temperature of 180° C. After digestion procedure, boric acid was added to the samples in order to eliminate the excess of fluoride. Finally, the digested samples were filtered and quantitatively transferred into 50 ml volumetric flask and made up to volume with Milli-Q water.

Metals were analysed by an IRIS Intrepid (Thermo Elemental, United Kingdom) inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES), with the exception of Li, that was analysed by a Solaar M (Thermo Elemental, United Kingdom) flame emission atomic spectrometer (F-EAS).

All sediment samples were analyzed in triplicate, and for each series of analysis, blanks were performed. The quality of analysis was controlled by using a marine certified material (GBW 07313, National Research Centre for Certified Reference Material, China). The accuracy of the results obtained was confirmed by applying the t-test at a 95% confidence level.

2.3. Environmental assessment

In the present, there are a variety of pollution assessment methods based on metals concentrations in sediments.²⁹ Among them, Sediments Quality Guidelines (SQGs) proposed by the American National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)^{30,31} and two quantitative indices, the enrichment factor (EF) and the geoaccumulation index (I_{geo}), has been selected in the present work.

The NOAA guidelines defines the interim sediment quality guidelines (ISQG), also named threshold effect level (TEL), as the concentration above which adverse effects rarely occur, while the probable effects level (PEL) represents the concentrations above which adverse effects are frequently expected. In addition, the Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life defines the effects range-low (ERL) as the

concentration below which adverse effects rarely occur and the effects range-median (ERM) as the concentration above which adverse effects frequently occur.³²

The enrichment factor (EF) was evaluated using

$$EF = \frac{(C_{\text{metal}}/C_{\text{normalizer}})_{\text{sample}}}{(C_{\text{metal}}/C_{\text{normalizer}})_{\text{background}}} \quad (1)$$

In this work, Li has been used as normalizer element and the crustal abundance data from Rudnick³³ were used as background values. The results were interpreted as suggested by Acevedo et al.,¹⁹ where $EF < 1$ indicates no enrichment; < 3 is minor enrichment; 3-5 is moderate enrichment; 5-10 is moderately severe enrichment; 10-25 is severe enrichment; 25-50 is very severe enrichment and > 50 is extremely severe enrichment.

The geoaccumulation index (I_{geo}) was calculated by the following equation:

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{[M]_{\text{sample}}}{1.5[M]_{\text{background}}} \right) \quad (2)$$

Where, $[M]_{\text{sample}}$ is the metal concentration in the sediment sample and $[M]_{\text{background}}$ is also the metal concentration in the geochemical background given by Rudnick³³. The I_{geo} is divided into seven classes or grades¹⁹: class 0 (unpolluted): $I_{geo} < 0$; class 1 (unpolluted to moderately polluted): $0 < I_{geo} < 1$; class 2 (moderately polluted): $1 < I_{geo} < 2$; class 3 (moderately to strongly polluted): $2 < I_{geo} < 3$; class 4 (strongly polluted): $3 < I_{geo} < 4$; class 5 (strongly to very strongly polluted): $4 < I_{geo} < 5$ and class 6 (very strong polluted): > 5 .

Significant spatial and temporal variations in the metals concentrations in the sediments from San Pedro River were evaluated by an analysis of variance (ANOVA) using SPSS 15 for Windows software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Influence of aquaculture activities in sediments from San Pedro River

Organic matter

It is well-known that organic matter is associated with the effluents of aquaculture activities, so it could be useful to determine the impact of this activity in the San Pedro River.

As Fig. 2 shows, the organic matter (OM), determined by LOI, presented a similar trend for all the sampling campaigns, with higher values in the inner part of the river, where aquaculture facilities are located. This increase can be related with the deposition of suspended matter from aquaculture effluents, mainly uneaten food and faeces, in this area that is characterized by calm waters. In fact, the OM content in a clean culture pond at the beginning of a culture cycle (1.43%) was similar to those observed in the sampling stations far away to the aquaculture facilities, meanwhile the OM concentrations in the area under aquaculture influence were similar to the values observed in the culture pond at the end of a culture cycle (4.3%).

It can be noted that higher values were observed in the inner part of the river for the last sampling

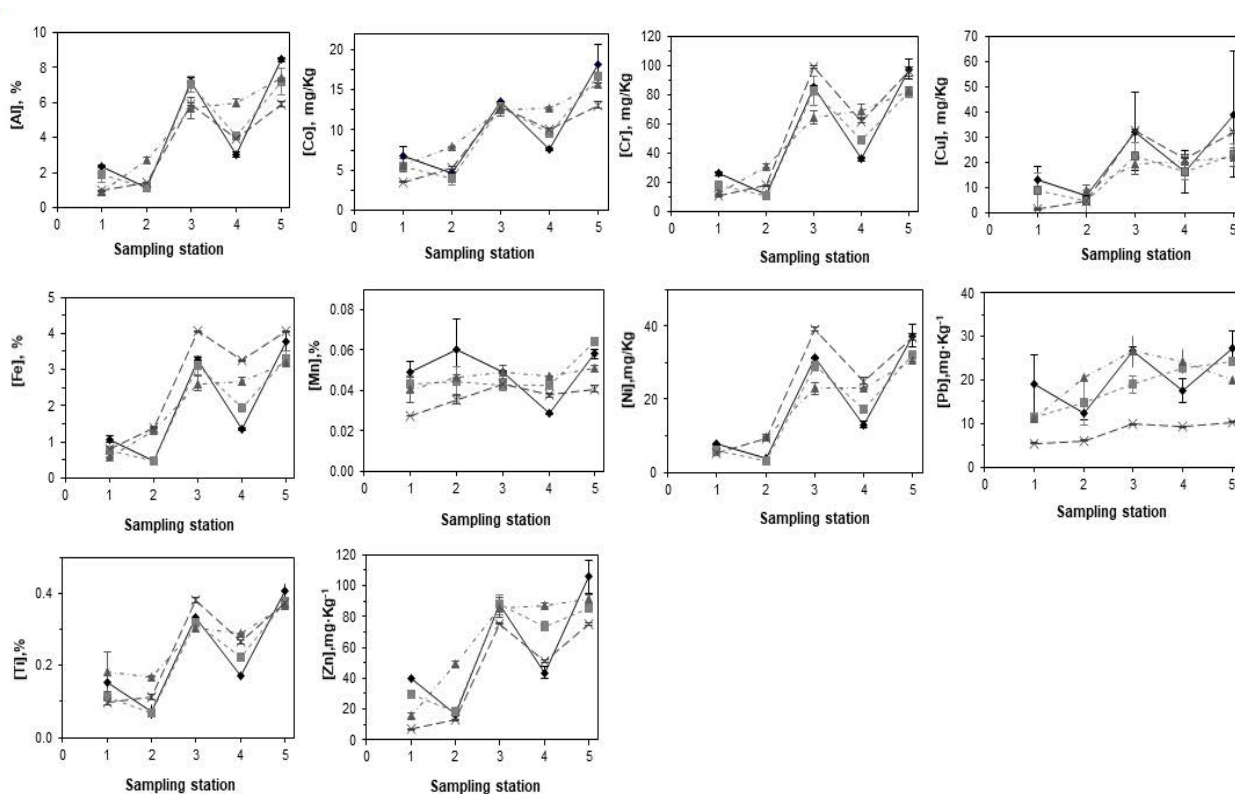


Fig. 2. Organic matter and metals concentrations in sediments from the San Pedro River.

campaign, probably due to the accumulation of the suspended matter from aquaculture effluents along the last decade.

Metals concentrations

In general, metals presented the same behaviour than organic matter in the sediments of the San Pedro River, as it was observed in a previous work for Cu, Zn and Pb.¹² In Fig. 2, it can be observed higher metal concentrations in the inner part of the river, where aquaculture activities are developed. In fact, an analysis of variance (ANOVA) determined significant spatial differences for most of the metals, with the exception of Mn ($p=0.203$) and Pb ($p=0.155$) suggesting a different origin for these elements. In general, sampling stations 1 and 2 were similar and different to the other sampling stations confirming two different areas in the San Pedro River. Nevertheless, Mn concentrations were very similar in the five sampling stations, probably due to high values in the outer part of the river related with a wastewater treatment plant in this area. As can be seen in Fig. 2, the manganese concentrations in the sampling stations 1 and 2 were even higher than those observed in the culture ponds before and after the culture cycle, meanwhile other metals presented similar concentrations for these two sampling stations and the culture pond before the culture cycle.

In addition, ANOVA was also used to determine temporal changes in metal concentrations in the sediments of the San Pedro River. As can be expected from the results, most of metals present no significant differences between the different sampling campaigns, with the exception of Pb ($p=0.018$). The concentrations of this

element were significant different in the last sampling campaign in comparison with the other ones due to the lower concentrations found for all sampling stations in 2010. This fact suggests the existence of other source for this element, different to the aquaculture activities, during the previous sampling campaigns. Probably, this source can be related with the use of leaded gasoline in automobiles before the banishment of the leaded additives in the year 2001. In the Bay of Cádiz, Ligeró et al., observed that the introduction of unleaded gasoline diminished the concentration of Pb in sediments, although this study has not data after the banishment.³⁴ A similar trend was also observed in the Seine River, where a fast decreased in the lead concentrations in suspended particulate matter was related with the banishment of gasoline leaded additives.³⁵

3.2. Environmental status of the San Pedro River

As Fig. 3(A) shows, the enrichment factor (EF) was below 1 for most of the metals, with the exception of Mn in sampling stations 1 and 2, and Ti and Pb in sampling station 1. Nevertheless, these elements showed a minor enrichment, suggesting the San Pedro River is a minor contaminated area. Geoaccumulation index confirms this result due to it was lower than 0 in all cases (Fig. 3(B)).

It can be notice that metals with EF higher than 1 showed higher value in the two first sampling stations, where aquaculture activities are not presented, in spite of the higher concentrations were observed in the other sampling stations. It can be related to the fact that the reference element (Li) also presented higher concentrations in the inner part of the San Pedro River. Some authors have pointed out the limitations of this index

due to its arbitrary “cut-off value” and the assumption of the constancy of heavy metal/reference element ratios in nature as well as its dependence on the background and the reference element selected.²⁹

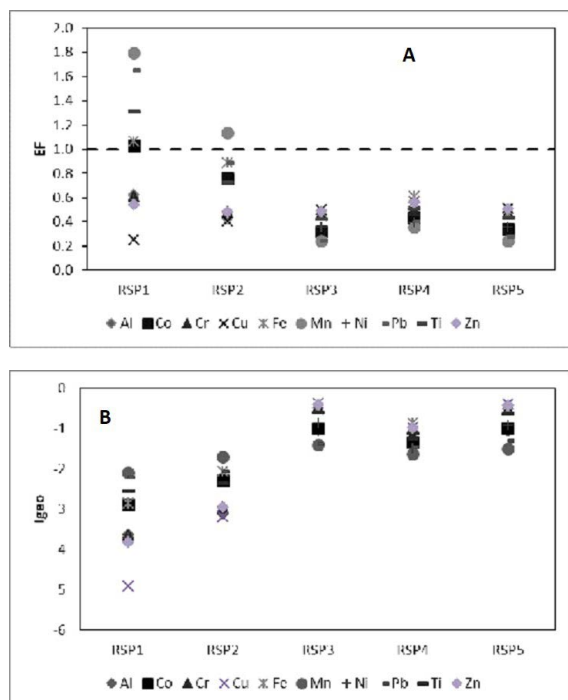


Fig. 3. Pollution assessment indexes: (A) Enrichment factor, (B) Geoaccumulation index.

Then, a comparison has been made with the sediment quality values for the Gulf of Cádiz proposed by Choueri.³⁶ All sampling stations related with aquaculture activities (sampling stations 3, 4 and 5) can be considered as moderately polluted by Cu, Co and Ni, as well sampling station 2 by Ni. The rest of metal concentrations were in no polluted range.

In addition, a comparison of metal concentrations (Cu, Cr, Ni, Pb, Zn) with the sediment quality guidelines was also performed to evaluate the possible toxic effects

on the biota (Fig. 4). As can be expected from the EF and the I_{geo} values, metal concentrations in sediments from San Pedro River present low risk for the biota due to concentrations were below the ERL for most of the cases, and even below TEL for Zn and Pb in all sampling stations and for the rest of metals in sampling stations 1 and 2. Only Ni and Cr showed concentrations above PEL in the inner sampling stations (3, 4 and 5).

Finally, the chemical status of San Pedro River was also evaluated using the World Wide Natural Background levels (WWNBLs) and the World-Wide Threshold Values (WWTVs) proposed by Gredilla et al.³⁷ These authors proposed an alternative to evaluate the quality of surface water bodies according to the chemical status of their sediments. If less than 20% of sampling stations present concentrations higher to the WWTVs for a specific contaminant, a good chemical status can be concluded regarding to this contaminant. On the contrary, if more than 20% of sampling stations present concentrations higher of WWTVs, a poor chemical status can be concluded. As shown table 1, a good chemical status was observed in the San Pedro River for Cu, Pb and Zn, meanwhile a poor chemical status was observed for Cr and Ni. In this case, the stations with concentrations higher than the WWTVs were those closed to the aquaculture facilities.

Table 1. Chrome, cooper, nickel and lead status concluded for the San Pedro River. All concentrations are given in $mg.kg^{-1}$

	Cr	Cu	Ni	Pb
Average concentration	57.1	18.3	23.2	8.2
Maximum concentration	99	32.3	39.1	10.4
Minimum concentration ($mg.kg^{-1}$)	11	1.4	5.4	5.5
World-Wide Natural Background Levels (WWNBL)	31.1	73.2	19.9	59.3
World-Wide Threshold Values (WWTV)	55.6	73.2	20.4	59.3

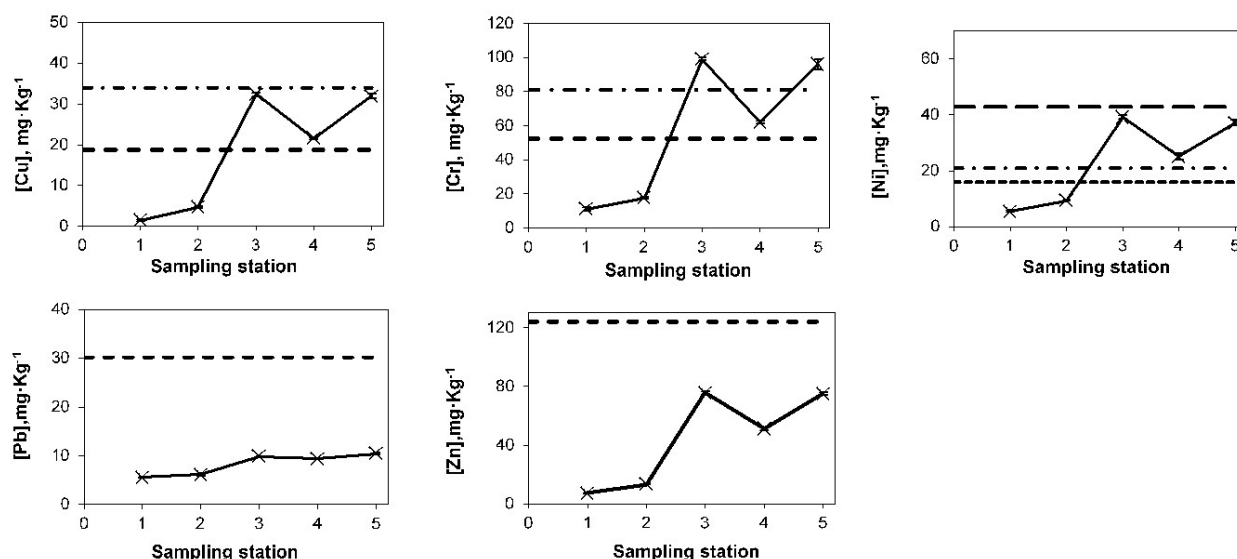


Fig. 4. Comparison of metal concentrations in San Pedro river with the sediment quality guidelines: TEL; ERL; PEL

3.3. Comparison of sediments of Rio San Pedro with sediments from other rivers influenced by aquaculture activities

Organic matter content in sediments from Rio San Pedro was between 2.6-5.9 times lower than that from sediments in Batan Bay, Aklan, Philippines³⁸ and estuarine sediments in Guadiana, Spain³⁹. Both ecosystems are also influenced by aquaculture activities.

On the other hand, Cr and Co concentrations were, generally, between 6 and 17 times higher, while Ni was between 15 -17 times higher as well in Rio San Pedro³⁹.

Variability of Cu, Pb and Zn concentrations in other ecosystems was significantly high respect to concentrations found in the present study, meaning that sometimes metal concentrations were higher in Rio San Pedro, while in other cases it was lower than that reported elsewhere. Thus, Cu was 1-3.4 times higher in Rio Tinto and Rio Odiel than that in Rio San Pedro^{40,41}. In the same way, Cu concentration was more than 100 and 3-5 times higher than that reported by Poersch et al.⁴², Pal and Maiti⁴³ and Aslam et al.⁴⁴. Lead was also 1 time higher in Rio Odiel⁴⁰ and between 6.8-32 times higher in Dhanbad (India)⁴³ in comparison with Rio San Pedro. Similarly, Zn was around 10-14 and 6-12 times higher than that in Rio San Pedro in both ecosystems, respectively. While it was around 10 times higher than that reported in Rio Tinto⁴¹.

Contrastingly, Pb was similar in Rio San Pedro than that reported by Junejo et al,⁴⁵, while it was higher in those sediments than reported elsewhere^{38,39}. Finally, Zn was also around 3 and 23 times higher in Rio San Pedro than that reported in estuarine sediments from Rio Guadiana⁴² and in Southern Brazil⁴⁴.

In summary, the comparison of metal concentrations found in Rio San Pedro with those found elsewhere did not show a clear picture. In some cases, concentrations were higher and in other cases were lower. Several factors could explain the diversity of observed results, for instance, the applied sediment digestion preparation, which can vary among different studies. In this context, enrichment factor and geoaccumulation index used to classify the pollution level as such as the comparison of found metal concentrations with reference concentration, which evaluated the occurrence probability of adverse effect on the biota confirmed their usefulness as effective tools in metal pollution assessment of sediments.

CONCLUSION

Aquaculture activities have been identified as the main anthropogenic source of metals in San Pedro River. Sampling stations close to aquaculture facilities have been considered as moderately polluted in Cu, Co and Ni when metal concentrations were compared with the sediment quality values for the Gulf of Cádiz. Nevertheless, Pb concentrations in sediments are mainly controlled by the use of leaded gasolines, since a considerable decrease was observed after the banishment of gasoline leaded additives. In addition, Mn concentrations were also related with the activities

of a wastewater treatment plant located in the outer part of the river.

In spite of this, San Pedro River can be considered as a minor contaminated area in relation to the enrichment factor and geoaccumulation index. Only Ni and Cr presented concentrations above the probable effects level (PEL), so adverse effects on the biota could be frequently expected for these metals. In addition, a poor chemical status of San Pedro River was also observed only for these elements.

ACKNOWLEDGEMENT

The author of this work thankfully acknowledges to Bachelor of Science Antonio Benítez for his assistance in the measurements in the ICP-AES, of Central Services of University of Cádiz. This work has been made in the Iberoamerican Program of Shared Doctoral Thesis between University of Cadiz and University of Havana.

DATA AVAILABILITY STATEMENT (DAS)

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article [and/or] its supplementary materials.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Chakraborty, P.; Ramteke, D.; Chackraborty, S.; Nagender Nath, B. Changes in metal contamination levels in estuarine sediments around India- An assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 2014, 78, 15-25. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.09.044.
2. Naser, H.A. Assessment and management of heavy metal pollution in the marine environment of the Arabian Gulf: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 2013, 72, 6-13. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.04.030.
3. Wang, S.L.; Xu, X.R.; Sun, Y.S.; Liu, J.L.; Li, H.B. Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 2013, 76, 7-15. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.08.025.
4. Heim, S.; Schwarzbauer, J. Pollution history revealed by sedimentary records: a review. *Environ. Chem. Lett.* 2013, 11, 255-270. DOI: 10.1007/s10311-013-0409-3.
5. Birch, G.F.; Lean, J.; Gunns, T. Growth and decline of shoreline industry in Sydney estuary (Australia) and influence on adjacent estuarine sediments. *Environ. Monit. Assess.* 2015, 187, 314-330. DOI: 10.1007/s10661-015-4481-y.
6. Cobelo-García, A.; Prego, R. Heavy metal sedimentary record in a Galician Ria (NW Spain):

- background values and recent contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 2003, 46, 1253-1262. DOI: 10.1016/S0025-326X(03)00168-1.
7. Bednarova, Z.; Kuta, J.; Kohut, L.; Machat, J.; Klanova, J.; Holoubek, I.; Jarkovsky, J.; Dusek, L.; Hilscherova, K. Spatial patterns and temporal changes of heavy metal distributions in river sediments in a region with multiple pollution sources. *J. Soils Sediments* 2013, 13, 1257–1269. DOI: 10.1007/s11368-013-0706-2.
 8. Valdés, J.; Román, D.; Guíñez, M.; Rivera, L.; Morales, T.; Ávila, J.; Cortés, P. Distribution and temporal variation of trace metal enrichment in surface sediments of San Jorge Bay, Chile. *Environ. Monit. Assess.* 2010, 167, 185–197. DOI: 10.1007/s10661-009-1041-3.
 9. Wang, Y.F.; Fung-Yee, T. Natural attenuation of contaminated marine sediments from an old floating dock - Part I: Spatial and temporal changes of organic and inorganic pollutants. *Sci. Total Environ.* 2012, 420, 90–99. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.011.
 10. Peña-Icart, M.; Rodrigues Pereira-Filho, E.; Lopes Fialho, L.; Nóbrega, J.A.; Alonso-Hernández, C.; Bolaños-Alvarez, Y.; Pomares-Alfonso, M.S. Combining contamination indexes, sediment quality guidelines and multivariate data analysis for metal pollution assessment in marine sediments of Cienfuegos Bay, Cuba. *Chemosphere*, 2016, 168, 1267-1276. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.053.
 11. Karakassis, I.; Hatzilyanni, E.; Tsapakis, M.; Plaiti, W. Benthic recovery following cessation of fish farming: a series of successes and catastrophes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1999, 184, 205-218.
 12. Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Manuel-Vez, M.P.; García-Vargas, M. Preliminary investigation on the enrichment of heavy metals in marine sediments originated from intensive aquaculture effluents. *Aquaculture*, 2006, 254, 317–325. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.049.
 13. Brooks, K.M.; Mahnken, C.V.W. Interactions of Atlantic salmon in the Pacific Northwest environment: III. Accumulation of zinc and copper. *Fish. Res.* 2003, 62 (3), 295-305. DOI: 10.1016/S0165-7836(03)00064-X.
 14. Dean, R.J.; Shimmield, T.M.; Black, K.D. Copper, zinc and cadmium in marine cage fish farm sediments: An extensive survey. *Environ. Pollut.* 2007, 145, 84-95. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.03.050.
 15. Jaysankar, D.; Fukami, K.; Iwasaki, K.; Okamura, K. Occurrence of heavy metals in the sediments of Uranouchi Inlet, Kochi prefecture, Japan. *Fish. Sci.* 2009, 75, 413-423. DOI: 10.1007/s12562-008-0054-0.
 16. Schendel, E.K.; Nordstrom S.; Lavkulich, L.M. Floc and sediment properties and their environmental distribution from a marine fish farm. *Aquac. Res.* 2004, 35, 483-493. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01042.x.
 17. Ben Omar, M.; Mendiguchía, C.; Er-Raioui, H.; Marhraoui, M.; Lafraoui, G.; Oulad-Abdellah, M.K.; García Vargas, M.; Moreno, C. Distribution of heavy metals in marine sediments of Tetouan coast (North of Morocco): natural and anthropogenic sources. *Environ. Earth Sci.* 2015, 74, 4171- 4185. DOI: 10.1007/s12665-015-4494-4.
 18. Ghandour, I.M.; Basaham, S.; Al-Washmi, A.; Masuda, H. Natural and anthropogenic controls on sediment composition of an arid coastal environment: Sharm Obhur, Red Sea, Saudi Arabia. *Environ. Monit. Assess.* 2014, 186, 1465-1484. DOI: 10.1007/s10661-013-3467-x.
 19. Acevedo-Figueroa, D.; Jiménez, B.D.; Rodríguez-Sierra, C.J. Trace metals in sediments of two estuarine lagoons from Puerto Rico. *Environ. Pollut.* 2006, 141, 336-342. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.08.037.
 20. Amin, B.; Ismail, A.; Arshad, A.; Yap, C.K.; Kamarudin, M.S. Anthropogenic impacts on heavy metals concentrations in the coastal sediments of Dumai, Indonesia. *Environ. Monit. Assess.* 2009, 148, 291-305. DOI: 10.1007/s10661-008-0159-z.
 21. Cukrov, N.; Frančišković-Bilinski, S.; Hlača, B.; Barišić, D. A recent history of metal accumulation in the sediments of Rijeka Harbor, Adriatic Sea, Croatia. *Mar. Pollut. Bull.* 2011, 62, 154-167. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2010.08.020.
 22. Davutluoglu, O.I.; Seckin, G.; Ersu, C.B.; Yilmaz, T.; Sari, B. Assessment of metal pollution in water and surface sediments of the Seyhan River, Turkey, using different indexes. *Clean (Weinh)* 2011, 39, 185-194. DOI: 10.1002/clen.201000266.
 23. Idris, A.M. Combining multivariate analysis and geochemical approaches for assessing heavy metal level in sediments from Sudanese Harbors along the Red Sea coast. *Microchem. J.* 2008, 90, 159-163. DOI: 10.1016/j.microc.2008.05.004.
 24. Wu, Y.; Hou, X.; Cheng, X.; Yao, S.; Xia, W.; Wang, S. Combining geochemical and statistical methods to distinguish anthropogenic source of metals in lacustrine sediment: a case study in Dongjiu Lake, Taihu Lake catchment, China. *Environ. Geol.* 2007, 52, 1467-1474. DOI: 10.1007/s00254-006-0587-4.
 25. Mohiuddin, K.M.; Otomo, K.; Ogawa, Y.; Shikazono, N. Seasonal and spatial distribution of trace elements in the water and sediments of the Tsurumi River in Japan. *Environ. Monit. Assess.* 2012, 184, 265-279. DOI: 10.1007/s10661-011-1966-1.
 26. Peña-Icart, M.; Mendiguchía, C.; Villanueva-Tagle, M.; Bolaños-Alvarez, Y.; Alonso-Hernandez, C.; Moreno, C.; Pomares-Alfonso, M. Assessment of Sediment Pollution by Metals. A Case Study from Cienfuegos Bay, Cuba. *Mar. Pollut. Bull. (Baseline)* 2017, 115 (1-2), 2017, 534-538. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.042.
 27. Hübner, R.; Astin, K.B.; Herbert, J.H. Comparison of sediment quality guidelines (SQGs) for the assessment of metal contamination in marine and estuarine environments. *J. Environ. Monit.* 2009, 11, 713-722. DOI: 10.1039/B818593J.
 28. Benomar, M.; Mendiguchía, C.; Er-Raioui, H.; Marhraoui, M.; Lafraoui, G.; Oulad-Abdellah, M.K.; García-Vargas, M.; Moreno, C. Analysis of heavy metals in sediments from Northern Moroccan Coast using simple and low-cost methodology.

Open Environ. Poll. Toxicol. J. 2012, 3, (Suppl 1-M6), 47-54.

29. Dung, T.T.T.; Cappuyns, V.; Swennen, R.; Phung, N.K. From geochemical background determination to pollution assessment of heavy metals in sediments and soils. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2013, 12, 335-353. DOI: 10.1007/s11157-013-9315-1.
30. Buchman, M.F. NOAA Screening Quick Reference Tables, NOAA OR&R Report 08-1, Seattle WA, office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 2008, 34 pages, (accessed 13 March 2017).
31. Long, E.R.; Mac Donald, D.D.; Smith, S.L.; Calder, F.D. Incidence of adverse biological effects within ranges chemical concentration in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 1995, 19, 81-97.
32. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. Available in internet: https://www.elaw.org/system/files/sediment_summary_table.pdf. (accessed 13 March 2017)
33. Rudnick, R.L.; Gao, S., Composition of the continental crust in R. L. Rudnick. The crust. Elsevier 2005. DOI: 10.1016/B0-08-043751-6/03016-4.
34. Ligeró, R.A.; Casas-Ruiz, M.; Barrera, M.; López-Aguayo, F.; Sales, D.; García, D. Environmental impact of unleaded gasolines in the bay of Cádiz (Spain). *Environ. Int.* 2004, 30, 99-104. DOI: 10.1016/S0160-4120(03)00152-1.
35. Ayrault, S.; Le Pape, P.; Priadi, C.R.; Roy-Barman, M.; Quantin, C.; Bonté, P. Lead pollution remanence in an urban river system: A multi-scale temporal and spatial study. *E3S Web of Conferences* 2013, 1, 24001. DOI: 10.1051/e3sconf/20130124001.
36. Choueri, R.B.; Cesar, A.; Abessa, D.M.S.; Torres, R.J.; Morais, R.D.; Riba, I.; Pereira, C.D.S.; Nascimento, M.R.L.; Mozeto, A.A.; DelValls, T.A. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *J. Hazard. Mater.* 2009, 170 (1), 320-331. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.04.093.
37. Gredilla, A.; Fdez-Ortiz de Vallajuelo, S.; de Diego, A.; Arana, G.; Stoichev, T.; Amigo, J.M.; Wasserman, J.C.; Botello, A.V.; Sarkar, S.K.; Schäfer, J.; Moreno, C.; de la Guardia, M.; Madariaga, J.M. A chemical status predictor. A methodology based on World-Wide sediments samples. *J. Environ. Manage.* 2015, 161, 21-29. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.06.044.
38. Nillos, M.G.; Taberna Jr, H.; Sesbreño, R.S.; Pahila, I.; Okamoto, Y.; Añasco, N. Geochemical speciation of metals (Cu, Pb, Cd) in fishpond sediments in Batan Bay, Aklan, Philippines. *Environ. Monit. Assess.* (2020) 192: 658. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08613-7>.
39. Delgado, J.; Nieto, J.M.; Boski, T. Analysis of the spatial variation of heavy metals in the Guadiana Estuary sediments (SW Iberian Peninsula) based on GIS-mapping techniques. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 88 (2010) 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.03.011>.
40. Vicente-Martorell, J.J.; Galindo-Riaño, M.D.; García-Vargas, M.; Granado-Castro, M.D. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *J. Hazard. Mater.* 162 (2009) 823-836. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.05.106.
41. de la Torre, M.L.; Grande, J.A.; Graiño, J.; Gómez, T.; Cerón, J.C. Characterization of AMD Pollution in the River Tinto (SW Spain). *Geochemical Comparison Between Generating Source and Receiving Environment. Water Air Soil Pollut.* (2011) 216:3-19. DOI 10.1007/s11270-010-0510-1.
42. Poersch, L.H.; Bauer, W.; Wallner Kersanach, M.; Wasielesky, W. Assessment of trace metals, total organic carbon and total nitrogen of a shrimp farm system in Southern Brazil. *Regional Studies in Marine Science* 39 (2020) 101452. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101452>
43. Pal, D.; Maiti, S.M. Seasonal variation of heavy metals in water, sediment, and highly consumed cultured fish (Labeo rohita and Labeo bata) and potential health risk assessment in aquaculture pond of the coal city, Dhanbad (India). *Environ. Sci. and Poll. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1424-5>
44. Aslam, S.N.; Skibnes Venzi, M.; Venkatraman, V.; Mikkelsen, Ø. Chemical assessment of marine sediments in vicinity of Norwegian fish farms - A pilot study. *Sci. of the Total Environ.* 732 (2020) 139130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139130>.
45. Hussain Junejo, S.; Baig, J.A.; Gul Kazi, T.; Afridi, H.I. Cadmium and Lead Hazardous Impact Assessment of Pond Fish Species. *Biol. Trace Element Res.* (2019) 191:502-511. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1628-z>.