

22

23

24

25

26

V

Cr

Mn

Vanadium

Chromium

Manganese

42
Mo

43
Tc

44
Ru

Yttrium

Technetium

Ruthenium

71
Lu

72
Hf

Ta

Lutetium

Hafnium

Tantalum

Osmium

103
Lr

104
Rf

105
Db

106
Sg

107
Bh

Lawrencium

Rutherfordium

Dubnium

Seaborgium

Bohrium

57
La

58
Ce

59
Pr

60
Nd

Lanthanum

Cerium

Praseodymium

Neodymium

89
Ac

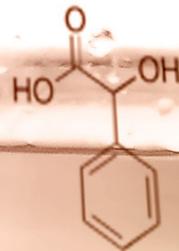
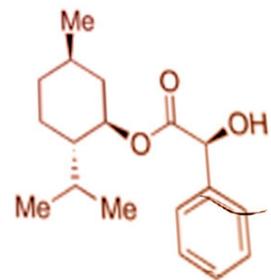
90
Th

91
Pa

Actinium

Thorium

Protactinium





DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA SIMPLE Y ECONÓMICO PARA LA **OBTENCIÓN DE DIÓXIDO DE NITRÓGENO**

Jael Reyes

Doctora en Química

INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es una grave amenaza para la salud en la mayoría de zonas del planeta. De acuerdo la OMS, cada año se producen más de 7 millones de muertes prematuras atribuibles a los efectos de la contaminación urbana, lo cual no es un problema exclusivo de los países más desarrollados, si no que más de la mitad de dicha carga recae sobre la población de los países en desarrollo.

Los principales contaminantes atmosféricos son los óxidos de nitrógeno, NO_x (NO_2 y NO), los cuales son responsables del smog fotoquímico. En particular, el NO_2 es un radical libre inorgánico, soluble en agua y altamente oxidante. De esta forma, el NO_2 es importante, no sólo por sus efectos sobre la salud, sino también porque absorbe la radiación solar visible y contribuye a la visibilidad atmosférica deteriorada; como un absorbente de la radiación visible podría tener un papel directo potencial en el cambio climático global si sus concentraciones fueran lo suficientemente altas. Además, se ha determinado que una alta exposición a NO_2 puede ser perjudicial para la salud humana. La exposición durante minutos a una hora a niveles de 50 a 100 ppm podría causar inflamación del tejido del pulmón. Es por esta razón que se han reportado estudios acerca de la reacción de NO_2 con biomoléculas como ácido ascórbico, ácido úrico, lípidos y proteínas del plasma humano.

Por otro lado, el NO_2 puede ser generado de manera normal en medios biológicos por rutas que incluyen reacciones catalizadas por enzimas peroxidasas, la autooxidación de NO y la dismutación de HNO_2 . El NO_2 es capaz de reaccionar con biomoléculas, tales como aminoácidos, proteínas, lípidos y aminas secundarias. Debido a su capacidad de iniciar una secuencia de reacciones en cadena en la peroxidación lipídica, puede alterar la estructura de biomoléculas y generar otros intermediarios reactivos. Por ello, el NO_2 es considerado un compuesto altamente tóxico y podría participar en varios procesos fisiopatológicos.

Si bien, el estudio de la reacción de NO_2 con diferentes moléculas y biomoléculas es de vital importancia, uno de los principales problemas que se presentan al hacer estos estudios es la obtención de este gas, ya que su almacenamiento en cilindros genera el producto dimerizado, N_2O_4 y en Chile son pocas las empresas que lo comercializan y las enzimas que generan este gas son sensibles a cambios de pH y temperatura, lo que dificulta su manipulación. Por esta razón, en el presente estudio se caracterizó y se estandarizó un sistema simple y económico capaz de generar NO_2 de manera continua y con parámetros conocidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: Rojo de pirogalol (PGR), NONOate dietilamina (1,1-dietil-2-hidroxi-2-nitrosodiazina) fueron obtenidos desde Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Cobre, ácido nítrico concentrado, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y nitrito de sodio fueron obtenidos desde Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los compuestos fueron de grado analítico y fueron empleados tal como se recibieron.

Soluciones: Las soluciones madre de PGR (300 μM) fueron preparadas diariamente en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4. Las soluciones de nitrito de sodio fueron preparadas en agua ultra pura.

Métodos:

Evaluación de la Generación de NO

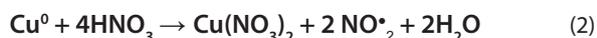
Curva de calibrado de producción de NO: el método de calibración es el recomendado por el fabricante del equipo (WPI Inc., Sarasota, FL, EEUU) y se basa en la reacción cuantitativa:



Para esto se realizaron soluciones patrones de NO_2^- , las cuales produjeron óxido nítrico (NO) cuantitativamente y la respuesta de corriente eléctrica se graficó en función de la concentración de nitrito adicionada, la que corresponde a la concentración de NO generada.

Sistema de generación de NO_2

La generación de NO_2 se realizó mediante la reacción redox entre cobre metálico (Cu^0) y ácido nítrico concentrado (HNO_3), según la Ecuación:



Esta reacción se realizó en un balón de tres bocas con una capacidad de 500 mL (equipado con una placa agitadora) adaptado con una entrada de N_2 . En el balón se agregaron 10 mg de Cu^0 finamente pulverizado en 20 mL de agua. A esta suspensión se le agregaron 30 mL de HNO_3 concentrado y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. El NO_2 generado se arrastró mediante un flujo de gas inerte (N_2) a una cubeta que contenía una muestra oxidable capaz de reaccionar con NO_2 . La salida del gas NO_2/N_2 se mantuvo a una velocidad de flujo constante de 45 mL/min.

Determinación de la concentración de nitrito

Las concentraciones de nitrito (NO_2^-) se cuantificaron mediante el método de Griess [5]. Para ello, se preparó una solución con 3 mg de N-(1-naftil)etilendiamina en 3 mL de agua bidestilada (Componente A). Por otro lado, se agregaron 30 mg de sulfanilamida en 2,8 mL de agua y 0,2 mL de ácido fosfórico (componente B, reactivo de Griess). Se mezclaron 1,5 mL del componente A con 1,5 mL de reactivo de Griess. La solución estándar de nitrito se preparó adicionando 13,8 mg de nitrito de sodio en 2 mL de agua bidestilada.

Se prepararon 6 muestras que contenían 100 μL de reactivo de Griess; 5, 10, 20, 40, 80 y 100 μM de nitrito y agua bidestilada hasta completar los 3 mL de volumen total en cada muestra. Las muestras se incubaron por 30 minutos y se mantuvieron protegidas de la luz a 4°C. La concentración de NO_2^- se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a $\lambda = 543 \text{ nm}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La generación de NO_2 se realizó de acuerdo a un sistema involucra la reacción entre Cu^0 y HNO_3 en un matraz redondo cerrado

(Ecuación 2); el gas generado es desplazado por arrastre con una corriente del gas inerte, N_2 y el gas de salida es conectado a la muestra en estudio. La solución se purgó con N_2 para eliminar el O_2 que podría estar presente en la solución. En estas condiciones, la reacción de Cu^0 con HNO_3 podría generar NO_2 y NO como productos.

La Figura 1 muestra un esquema del sistema utilizado para la generación de NO_2 . La cuantificación del NO_2 generado se hizo mediante su reacción con un exceso de antioxidante Trolox y, por lo tanto, se redujo cuantitativamente a nitrito, cuya concentración final se estimó mediante el ensayo de Griess, capaz de detectar el NO_2 generado como producto de reacción.

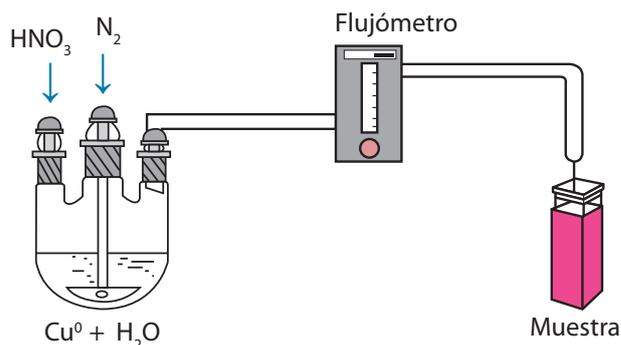
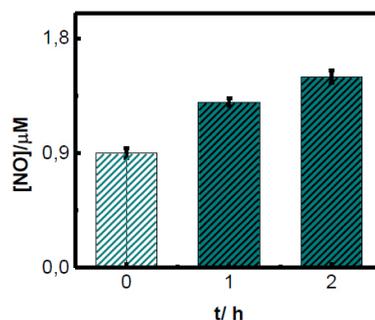


FIGURA 1

Representación del sistema empleado para la generación de NO_2

Se ha reportado que la proporción en que se generen estas especies depende de la concentración de HNO_3 empleada. En presencia de HNO_3 concentrado (en exceso) se genera mayormente NO_2 , el cual puede dimerizar a N_2O_4 . De esta forma, en el sistema se podrían generar las especies reactivas gaseosas NO , N_2O_4 y NO_2 .

La formación de NO en el sistema se determinó mediante técnicas electroquímicas, donde el NO es detectado a través de la intensidad eléctrica generada. Con este objetivo, se incubó HNO_3 y Cu^0 durante 2 horas y se evaluó la generación de NO . La Figura 2 muestra la concentración de NO generado a partir de una solución de HNO_3 concentrado (66% en masa) en ausencia y presencia de Cu^0 evaluado a tiempo cero, una y dos horas de reacción. El resultado muestra que el HNO_3 concentrado genera cerca de 0,9 μM de NO , mientras que en presencia de Cu^0 se generó una concentración de 1,3 y 1,5 μM de NO . Esto indicaría que en el sistema no se generó una cantidad de NO apreciable.



HNO_3	+	+	+
Cu^0		+	+

FIGURA 2

Concentración de NO generado en presencia de HNO_3 y durante la incubación de Cu^0 con HNO_3 .

La formación de especies oxidantes (NO_2^*) se determinó utilizando la sonda rojo de pirogalol (PGR, **Figura 3**) como sustrato oxidable (a pH 7,4). Esta sonda fue elegida debido a que ha demostrado reaccionar de manera eficiente con diferentes especies reactivas en medio acuoso como ácido hipocloroso (HOCl), y radicales peroxilo (ROO^*). La **Figura 4** muestra el espectro UV-visible inicial de PGR (5 μM , negro) y los obtenidos durante 20 minutos de reacción con el gas proveniente del sistema ($\text{Cu}^0\text{-HNO}_3$). Como se puede apreciar en esta figura, hay un consumo de la banda original de PGR a $\lambda=540$ nm y se observa la aparición de una nueva banda de absorción a $\lambda=390$ nm con formación de dos puntos isobásticos. Un resultado similar se obtuvo durante la reacción de PGR con HOCl, y ROO^* [7] [8]; lo cual se asoció a la formación de una quinona como producto de oxidación de PGR.

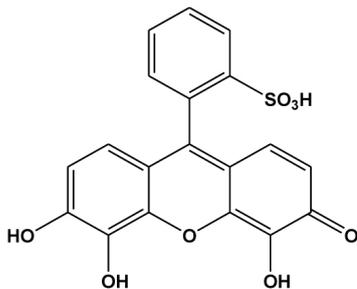


FIGURA 3

Estructura química de rojo de pirogalol (PGR).

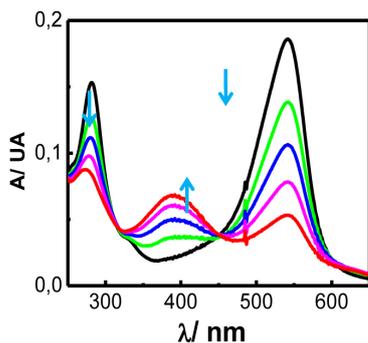


FIGURA 4

Consumo de PGR (5 μM) inducido por NO_2 entre 0 y 20 minutos de reacción a pH 7,4 y 25°C.

Por otra parte, se evaluó la generación de NO_2^* a través del consumo de la sonda ABTS. Esta sonda ha sido utilizada ampliamente para la detección de especies reactivas, en particular NO_2^* .

El ABTS tiene la capacidad de reaccionar rápidamente con NO_2^* ($k= 2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), generando el catión radical estable $\text{ABTS}^{*\cdot}$. Las características espectroscópicas de ABTS permiten evaluar su consumo a $\lambda= 310$ nm y, además permiten evaluar la formación del catión radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ a $\lambda= 660$ y 750 nm. La **Figura 5** corresponde al espectro UV-visible inicial de la sonda ABTS (20 μM) y su consumo durante 15 minutos de reacción con el NO_2 proveniente de la reacción entre Cu^0 y HNO_3 . Es importante mencionar que durante la incubación de ABTS (20 μM) con el flujo de N_2 procedente de una suspensión de Cu^0 (sin HNO_3), no se observaron cambios en su espectro inicial de absorbancia.

Conjuntamente con los resultados obtenidos empleando PGR, la generación de $\text{ABTS}^{*\cdot}$ demostró la formación de NO_2 en el sistema Cu^0 y HNO_3 .

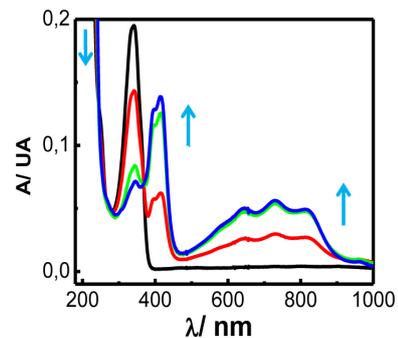


FIGURA 5

Consumo de ABTS (20 μM) inducido por NO_2 entre 0 y 30 minutos de reacción. La solución fue incubada a pH 7,4 y 25°C.

III.2.2.2. Estandarización del sistema

Posterior a la determinación de la generación de NO_2^* , se procedió a estandarizar el sistema y evaluar los diferentes factores que podrían afectar la generación de NO_2^* . Se evaluó el curso temporal de consumo de PGR mediado por NO_2^* mediante espectroscopía UV-visible a pH 7,4 en diferentes condiciones experimentales. Las variables estudiadas fueron:

- i) volumen de HNO_3
- ii) volumen de agua dentro del balón
- iii) cantidad de Cu^0 y
- iv) velocidad de flujo de salida de la mezcla de gases NO_2/N_2 .

i) **Volumen de HNO_3** : para determinar el efecto del volumen de HNO_3 adicionado, se evaluó la oxidación de PGR utilizando diferentes volúmenes de HNO_3 (5, 10, 30 y 80 mL). El perfil cinético obtenido con 30 y 80 mL de HNO_3 presentó un rápido consumo de PGR, mientras que en ausencia de HNO_3 no se observaron cambios en la absorbancia de PGR (**Figura 6**). A partir de estos resultados se decidió utilizar 30 mL de HNO_3 como volumen óptimo (adicionado a tiempo cero de incubación).

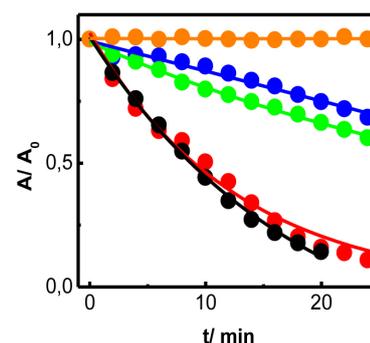


FIGURA 6

Consumo de PGR (5 μM) inducido por NO_2^* utilizando diferentes volúmenes de HNO_3 : (●) 0 (●) 5 (●) 10 (●) 30 y (●) 80 mL de HNO_3 concentrado. Condiciones del sistema: flujo de salida de 45 mL/min, 10 mg de Cu^0 y 20 mL de agua destilada.

ii) **Tiempo de incubación de HNO_3 y Cu^0** : la adición de HNO_3 a la mezcla Cu^0 /agua da inicio a la reacción redox donde se genera NO_2^* como producto. Sin embargo, se requiere conocer el tiempo inicial en el cual NO_2^* se genera de manera constante en el sistema. Con este objetivo, se evaluó el consumo de PGR a diferentes tiempos de incubación de la mezcla acuosa Cu^0/HNO_3 .

Sin incubación previa de Cu^0/HNO_3 se observó un consumo lento de PGR para luego consumirse rápidamente (**Figura 7**). No obstante, cuando Cu^0/HNO_3 fueron preincubados durante 15 minutos se observó un consumo constante de PGR en los primeros minutos de incubación.

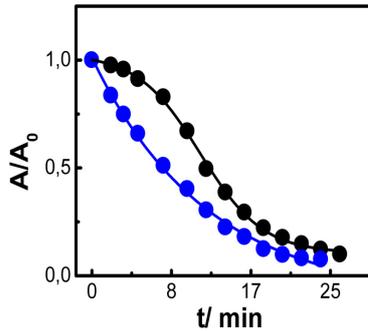


FIGURA 7

Perfil cinético de consumo de PGR ($5 \mu\text{M}$) inducido por $^*\text{NO}_2$ a tiempo cero de adición de HNO_3 (●) y a los 15 minutos de adición de HNO_3 (●). Las soluciones fueron incubadas a pH 7,4 y 25°C .

Con la finalidad de evaluar si la generación de $^*\text{NO}_2$ es un proceso constante durante el tiempo de incubación de Cu^0/HNO_3 se realizaron experimentos de inyección consecutiva de PGR a la solución de trabajo. Esto se hizo inyectando $30 \mu\text{L}$ de PGR (concentración final $5 \mu\text{M}$ en la celda) a diferentes tiempos de incubación de Cu^0 con HNO_3 : 15, 40, 60 y 85 minutos. La cinética de consumo de PGR en todos estos tiempos presentó velocidades iniciales similares (**Tabla 1**), lo cual confirma una producción constante de $^*\text{NO}_2$ en el sistema (**Figura 8**).

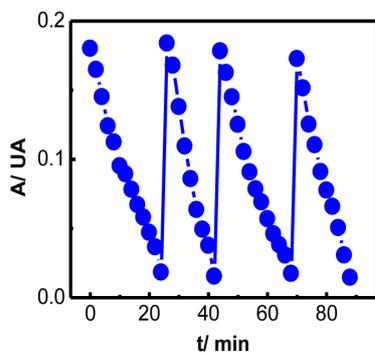


FIGURA 8

Perfil cinético de consumo de PGR ($5 \mu\text{M}$) adicionado a diferentes tiempos de incubación de Cu^0/HNO_3 . La solución fue incubada a pH 7,4 y 25°C .

iii) Volumen de agua: se adicionaron diferentes volúmenes de agua al balón: 0, 10, 20, 40 y 100 mL y posteriormente se adicionó Cu^0

Tabla 1. Velocidad inicial de consumo de PGR en función del tiempo de incubación

Tiempo de incubación $\text{Cu}^0\text{-HNO}_3$ / min	v_0 PGR / $\mu\text{M min}^{-1}$
15	0,44
40	0,43
60	0,47
85	0,45

y HNO_3 . Esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante cada medida realizada. A través de los perfiles de consumo de PGR se determinó que el volumen de agua adicionada (10- 100 mL) no afecta la velocidad de oxidación de PGR.

iv) Masa de Cu^0 : se realizaron experimentos por separado utilizando diferentes cantidades de Cu^0 en el balón (0,1; 1; 10 y 50 mg), el cual contenía 20 mL de agua y 30 mL de HNO_3 . Al adicionar 0,1 mg de Cu^0 , PGR se consumió de manera considerablemente más lenta que al adicionar 1, 10 y 50 mg (**Figura 9**). El experimento control (en ausencia de Cu^0) no mostró cambios en la absorbancia de PGR evaluada a $\lambda = 540 \text{ nm}$. Se determinó adicionar 10 mg de Cu^0 como cantidad óptima.

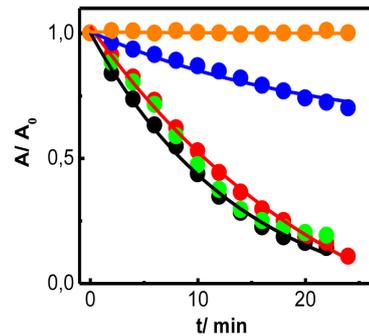


FIGURA 9

Perfil cinético de consumo de PGR ($5 \mu\text{M}$) inducido por $^*\text{NO}_2$ utilizando diferentes cantidades de Cu^0 . Control (●) 0,5 mg (●) 1 mg (●) 10 mg (●) y 50 mg de Cu^0 . Condiciones del sistema: 30 mL de HNO_3 , 20 mL de agua destilada y flujo de salida de 45 mL/min . Las soluciones fueron incubadas a pH 7,4 y 25°C .

v) Velocidad de flujo de gas: la oxidación de PGR se evaluó a diferentes velocidades de flujo de salida del gas $^*\text{NO}_2/\text{N}_2$ (10, 20 y 45 mL/min). Los resultados mostrados en la **Figura 10** indican que la mayor velocidad de consumo de PGR con un flujo de salida de flujo de 45 mL/min .

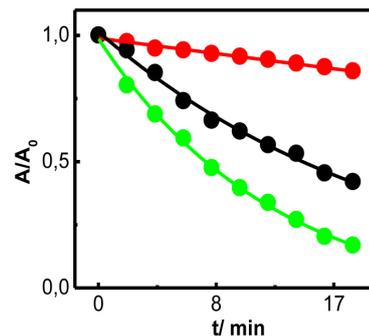


FIGURA 10

Perfil cinético de consumo de PGR ($5 \mu\text{M}$) inducido por $^*\text{NO}_2$ utilizando diferentes velocidades de flujo. 10 (●) 20 (●) y 45 mL/min . Condiciones del sistema: 30 mL de HNO_3 , 10 mg de Cu^0 y 20 mL de agua destilada. Las soluciones fueron incubadas a pH 7,4 y 25°C .

A partir de los resultados presentados, las condiciones óptimas escogidas para la generación de $^*\text{NO}_2$ fueron: 20 mL de agua ultrapura, 30 mL de HNO_3 , 10 mg de Cu^0 utilizados y una velocidad de flujo de 45 mL/min .

La estandarización del sistema fue establecida diariamente utilizando como referencia la v_0 de PGR $5 \mu\text{M}$ inducido por $^*\text{NO}_2$ (a pH 7,4 y 25°C , $v_0 = 0,45 \mu\text{M/min}$).

III.2.2.3. Determinación de la velocidad de generación de $\bullet\text{NO}_2$

La **Figura 11** presenta la dependencia de la velocidad inicial de consumo de PGR mediado por $\bullet\text{NO}_2$ en función de su concentración inicial. Se observa que hasta una concentración 20 μM la reacción siguió un orden uno en PGR, mientras que por sobre esta concentración inicial de ustrato se observó un orden cero con respecto a PGR. En estas condiciones (orden cero en PGR) y tomando en cuenta que PGR ha demostrado reaccionar con especies oxidantes con una estequiometría de dos moléculas de especie reactiva por cada molécula de PGR, se estimó que el $\bullet\text{NO}_2$ es generado a una velocidad de 1,8 $\mu\text{M}/\text{min}$.

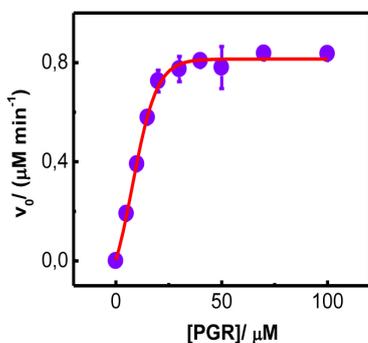
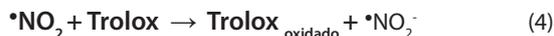


FIGURA 11

Dependencia de la velocidad inicial de consumo de PGR inducido por $\bullet\text{NO}_2$ en función de su concentración. Las soluciones fueron incubadas a pH 7,4 y 25°C.

III.2.2.4. Cuantificación de $\bullet\text{NO}_2$

Para cuantificar la concentración de $\bullet\text{NO}_2$ generado se utilizó la siguiente reacción:



El NO_2^- formado se cuantificó a través del método de Griess. Para ello, el $\bullet\text{NO}_2$ generado se redujo a NO_2^- a través de su reacción con exceso de antioxidante (Trolox, 200 μM). La cuantificación de NO_2^- se realizó a diferentes tiempos de incubación con Trolox utilizando una curva de calibración (**Figura 12**), según lo descrito en Metodología. La **Figura 13** muestra que cada 20 minutos de reacción se generó una concentración de $\sim 40 \mu\text{M}$ de NO_2^- . Este resultado está de acuerdo con la velocidad de generación de $\bullet\text{NO}_2$ (1,8 $\mu\text{M}/\text{min}$) evaluada mediante el consumo de PGR.

Es importante destacar que el sistema de generación de $\bullet\text{NO}_2$ montado en el laboratorio requiere de una estandarización diaria. Adicionalmente, es necesario renovar cada una hora el sistema (Cu^0 , agua y HNO_3).

CONCLUSIONES

El sistema Cu^0 pulverizado con agua y HNO_3 es eficiente en la generación del NO_2 gaseoso, donde el $\bullet\text{NO}_2$ es la especie mayoritaria y la cantidad de NO generado es despreciable. La generación de $\bullet\text{NO}_2$ que presentó una mayor eficiencia es utilizando las siguientes condiciones: 20 mL de agua ultrapura, 30 mL de HNO_3 , 10 mg de Cu^0 utilizados y la velocidad de flujo de 45 mL/min.

La estandarización del sistema se debe realizar diariamente, en este estudio se utilizó como referencia la v_o de PGR 5 μM inducido por $\bullet\text{NO}_2$ (a pH 7,4 y 25°C, $v_o = 0,45 \mu\text{M}/\text{min}$).

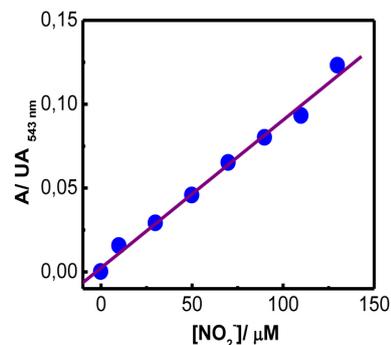


FIGURA 12

Curva de calibración de nitrito. Dependencia de la absorbancia (evaluada a $\lambda = 543 \text{ nm}$) con la concentración de nitrito. Las soluciones fueron incubadas a pH 7,4 y 25°C.

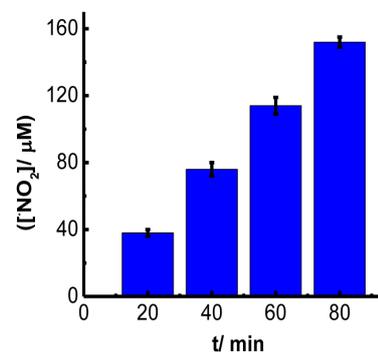


FIGURA 13

Concentración total (acumulada) de $\bullet\text{NO}_2$ generado por el sistema Cu^0/HNO_3 . La concentración de $\bullet\text{NO}_2$ fue evaluada por el método de Griess utilizando un exceso de Trolox. Las soluciones fueron incubadas a pH 7,4 y 25°C.

BIBLIOGRAFIA

- OMS, Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. 2005.
- Halliwell, B., Miao-LinHu, Louie, S., Duvall, T. R. Tarkington, B. K., Motchnik, P. *Febs Letters*. 313 (1992) 62-66.
- K. Sawa, Yoshihiro, Shibata, Hitoshi, Kono, Yasuhisa, Yamashita, Sumiko, Ochiai, Hideo, Tanaka, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1230 (1995) 45-50.
- E. Ford, M. N. Hughes, and P. Wardman, *Free Radical and Biological Medicine*, 32 (2002) 1314-1323.
- D. Tsikas, I. Fuchs, F. M. Gutzki, and J. C. Frölich, *Journal of Chromatography B*, 715 (1998) 441-448.
- K. Sawa, Yoshihiro, Shibata, Hitoshi, Kono, Yasuhisa, Yamashita, Sumiko, Ochiai, Hideo, Tanaka, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1230 (1995) 45-50.
- C. Vergara, C. Mardones, J. Reyes, R. A. Tapia, F. Quina, M. A. Mendes, H. Speisky, E. Lissi, M. S. Ureta-zan, A. Aspée, and C. López-Alarcón, *Journal of Physical Chemistry B*, 117 (2013) 4870-4879.
- E. Atala, *Interacción de fenoles y polifenoles con especies reactivas en medio ácido: un estudio cinético competitivo. Tesis para optar al grado de Doctor en Química, Pontificia Universidad Católica de Chile* (2014).
- A. A. Salem, A. A. Soliman, and I. A. El-Haty, *Analytical Chemistry Insights*, 6 (2011) 37-44.