

# Validación a microescala del método de ensayo 4-aminoantipirina para cuantificar compuestos fenólicos en cultivos microbianos

## *Microscale Validation of 4-Aminoantipyrine Test Method for Quantifying Phenolic Compounds in Microbial Cultures*

Lic. Ibrahín Justiz-Mendoza,<sup>1</sup> Lic. Isabel Aguilera-Rodríguez,<sup>2</sup> MSc. Irasema Pérez-Portuondo,<sup>2</sup>  
Dra. C. Arelis Ábalos-Rodríguez,<sup>2</sup> Dra. C. Rosa M. Pérez-Silva<sup>2</sup>  
*isabel@cebi.uo.edu.cu; iperez@cebi.uo.edu.cu; aabalos@cebi.uo.edu.cu; rmaria@cebi.uo.edu.cu*



<sup>1</sup>Unidad Empresarial de Base de Elaboración de la Empresa Cervecera "Hatuey", Santiago de Cuba, Cuba; <sup>2</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

### ● Resumen

La validación de métodos de ensayo a microescala es, actualmente, de mucha importancia debido a las ventajas económicas y ambientales que posee, lo que constituye una premisa para la realización de servicios, y una garantía de la calidad de los resultados para brindar al cliente. El presente trabajo aborda la validación a escala micro del método espectrofotométrico 4-aminoantipirina para la cuantificación de compuestos fenólicos en medio de cultivo, para lo cual se evaluaron los parámetros: linealidad, precisión, regresión, exactitud, límites de detección, de cuantificación y robustez; además del ensayo de comparación con un método no estandarizado para determinar polifenoles (Folin Ciocalteu). Los resultados mostraron que ambos métodos son factibles para la determinación de fenoles.

Palabras clave: compuestos fenólicos, validación de métodos analíticos; 4-aminoantipirina; medio de cultivo.

### ● Abstract

Validation of test methods microscale is currently of great importance due to the economic and environmental advantages possessed, which constitutes a prerequisite for the performance of services and quality assurance of the results to provide customer. This paper addresses the microscale validation of 4-aminoantipyrine spectrophotometric method for the quantification of phenolic compounds in culture medium. Parameters linearity, precision, regression, accuracy, detection limits, quantification limits and robustness were evaluated, addition to the comparison test with no standardized method for determining polyphenols (Folin Ciocalteu). The results showed that both methods are feasible for determining phenols.

Keywords: phenolic compounds, validation of analytical methods, 4-aminoantipyrine, culture medium.

### ● Introducción

Los fenoles y sus derivados clorados son contaminantes tóxicos que se presentan en varios efluentes como resultado de la fabricación de pulpa de papel, preservación de madera, fabricación y

utilización de insecticidas, manufactura de plásticos, pinturas, colorantes, desinfectantes, residuos de refinerías, entre otros. La contaminación que generan constituye un problema, por cuanto los desechos obtenidos son vertidos a cuerpos receptores de interés, sin el debido tratamiento previo antes de su descarga

/1, 2/. Su aparición en múltiples ambientes y peligrosidad hacen necesario el establecimiento de técnicas analíticas sencillas y fiables que permitan, de manera rápida, su control y monitoreo.

Los contaminantes orgánicos medioambientales en cuestión pueden ser metabolizados o mineralizados, bajo condiciones aerobias y/o anaerobias /3/, por muchos microorganismos, entre los que destacan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, por su demostrada habilidad para degradar dichos compuestos de manera eficaz /4, 5/.

Para la cuantificación de la degradación de compuestos fenólicos pueden emplearse varios métodos analíticos, cuya selección depende de la matriz a analizar. Entre estos se encuentran las técnicas colorimétricas Folin Ciocalteu, descritas fundamentalmente para muestras de fármacos /6, 7/; el método Folin Denis /8/ y el método de la 4-aminoantipirina, definido para el estudio de muestras de aguas y aguas residuales por medio de extracción con cloroformo (método directo) o sirviéndose del método indirecto /9/. Además, puede ser determinada por técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) /10/ y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) /11/, las cuales son utilizadas, también, para la caracterización estructural de estos compuestos.

El método 4-aminoantipirina es el establecido como método estándar para la cuantificación de fenoles totales en muestras ambientales. Se caracteriza por ser rápido y sencillo, ya que no requiere de instrumental sofisticado /10/. Su validación conduce a la obtención de resultados precisos y exactos, con un alto grado de seguridad dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

La química a microescala ha demostrado su gran utilidad en la práctica experimental de la química general y sintética, tanto orgánica como inorgánica; en cambio, en la química analítica no ha sido desarrollada al mismo ritmo, debido a que la instrumentación para el trabajo analítico con cantidades de muestras pequeñas y adecuada exactitud y precisión tiene, por lo general, altos costos de

adquisición y mantenimiento, cuestión que limita su uso en la investigación formal; no obstante, dadas las ventajas que deriva el trabajo a escala micro, en ocasiones es ventajoso su uso, fundamentalmente cuando se trabaja con reactivos altamente tóxicos y de elevado costo económico /12, 13/. Debido a que la certificación de laboratorios competentes no tiene funcionalidad con procedimientos analíticos no validados, constituye para los laboratorios un prerrequisito trabajar en la validación interna de métodos, según lo establecido en las normativas vigentes /14/.

Ofrecer servicios competitivos y fiables, teniendo en cuenta el creciente aumento de las investigaciones relacionadas con el medio ambiente por las universidades y organizaciones gubernamentales, constituye un objetivo central.

El presente trabajo tiene como propósito validar, por verificación, el método de ensayo espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina a microescala, para determinar fenoles y sus derivados en muestras de cultivos microbianos, previo y luego del tratamiento biotecnológico para su depuración.

## ● Materiales y métodos

### *Equipos y materiales*

Las determinaciones fueron realizadas utilizando equipos y cristalería calibrada y validada por la Oficina Territorial de Normalización (OTN). Los reactivos utilizados fueron de calidad apropiada para los ensayos ejecutados.

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 Merck UV-visible a 500 nm con celda de vidrio con paso de luz de 1,0 cm.

### *Reactivo 4-aminoantipirina*

El reactivo 4-aminoantipirina se preparó en el momento de realizar el análisis. Durante su empleo se conservó en frasco ámbar y protegido de la luz /8/.

### Método 4-aminoantipirina

El método de la 4-aminoantipirina seleccionado para la cuantificación de fenol fue el indirecto, según se reporta en el Estándar Methods, pero a un volumen de 5 mL. Para ello las muestras y patrones fueron ajustados a  $7,9 \pm 0,1$  unidades de pH, a los cuales se hace reaccionar con la 4-aminoantipirina en presencia de ferricianuro de potasio, para formar un compuesto antipirina coloreado que es mantenido en solución acuosa.

El ensayo se realizó según procedimiento descrito por APHA (2012)/8/. Se tomaron 125  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amonio y se añadieron a tubo de ensayo con 2,5 mL de muestra y blanco, posteriormente se adicionó solución de tampón fosfato hasta lograr pH de  $7,90 \pm 0,1$  unidades, luego se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de reactivo 4-aminoantipirina al 2 % y 50  $\mu\text{L}$  de reactivo ferrocianuro de potasio al 8 %; se homogeneizó la mezcla y una vez transcurrido el tiempo de reacción (15 min), se realizó la lectura en espectrofotómetro a 500 nm contra blanco de reactivos.

La determinación de la concentración se evaluó mediante curva de calibración. Para ello se utilizó una solución patrón del fenol a  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , a partir de la cual se prepararon patrones de  $1-5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , los cuales recibieron el mismo tratamiento que las muestras.

Previo la cuantificación, las muestras fueron centrifugadas a 5 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue disuelto para ajustar la concentración dentro del rango de la curva de calibración. Posteriormente se realizó la cuantificación como mismo se procedió en patrones.

### Metodología para la validación del método analítico 4-aminoantipirina

**Linealidad:** Se construyó una curva de calibración. Para ello se prepararon soluciones tomando de la solución patrón alícuotas correspondientes a 500, 1 000, 1 500, 2 000 y 2 500  $\mu\text{L}$ . Se realizó el mismo tratamiento para  $n = 10$  de un patrón de referencia de fenol. Se determinó el coeficiente de variación del factor respuesta. Se llevó a cabo un análisis de varianza en todos los niveles de concentración estudiados, así como el análisis de

regresión simple entre las variables cantidad recuperada y cantidad añadida. Además, se calculó el porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración.

**Precisión:** Se realizó por determinación de la desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de los resultados del análisis de muestras sintéticas para  $n = 10$  a 5 niveles de concentración en condiciones de repetitividad.

**Exactitud o veracidad:** Para determinar el grado de exactitud de un método analítico existen varias pruebas según la disponibilidad o no de un material o método de referencia. Cuando no se dispone de materiales de referencia, debe determinarse el porcentaje de recuperación /15/.

Se tomó la muestra y se determinó la concentración inicial de fenol previo al análisis de adición de estándar. Posteriormente se adicionó una cantidad conocida de fenol en correspondencia con la cantidad de fenol presente en la muestra. El porcentaje de recuperación del analito añadido se calculó como cien veces la diferencia entre las medias de las series dividida entre la cantidad de analito añadida:

$$\%_R = \frac{CA - SA}{A} \cdot 100 \quad (1)$$

donde:  $CA$  = cantidad ensayada (muestra con analito añadido);  $SA$  = cantidad original en la muestra (sin analito añadido) y  $A$  = cantidad de analito añadido.

Para determinar el porcentaje de recuperación se realizaron cinco determinaciones en muestras patrón, añadiendo 1,1; 2,1 y 3,1 de analito.

**Robustez:** Se realizó un diseño factorial  $2^2$ . Para ello se tomaron factores que pueden influir en el resultado final del método de análisis. En este caso se evaluaron cantidad del buffer a añadir y cantidad del reactivo 4-aminoantipirina. Se realizaron cuatro determinaciones.

**Límite de cuantificación:** Se realizaron determinaciones del blanco en muestras para blanco con  $n = 20$ .

*Límite de detección:* Se realizaron determinaciones del blanco en muestras para blanco con  $n = 20$ .

### ***Determinación de fenoles por el método Folin-Ciocalteu***

Para la cuantificación de fenoles en las muestras estudiadas se empleó el método Folin Ciocalteu como método de comparación no normalizado. El procedimiento se llevó a cabo según lo descrito por Rodríguez y col. (2011) /15/.

### ***Procesamiento estadístico***

Se realizaron pruebas de hipótesis para comparación de muestras, pruebas de Fisher para la comparación de varianzas y pruebas de regresión y correlación, para las que se empleó el programa computacional STARGRAPHIC TM.

## **● Resultados y discusión**

La presencia de especies químicas tóxicas en las muestras medioambientales da lugar a serios problemas cuya solución compete a la Química Analítica del Medioambiente, puesto que la toxicidad de una especie química está determinada por su concentración y por su forma química, que pueden dar origen a dos problemas de importancia inmediata: la determinación de la concentración total y/o de la forma química de las especies tóxicas en las muestras medioambientales y el control de la contaminación, es decir, la disminución de la concentración de especies tóxicas hasta niveles tolerables para la salud.

Ejemplo de lo anterior es la presencia de fenol y sus derivados en aguas y aguas residuales producto de la actividad antropogénica, las cuales pueden ser tratadas por vía biotecnológica para minimizar y/o eliminar su impacto al ambiente. Por tanto, para su estudio es necesario contar con métodos analíticos rápidos y fiables, de bajo costo y amigables con el ambiente. Como garantía estos métodos deben ser validados siguiendo los requerimientos establecidos por las normas actuales /16/. La validación a escala

micro resulta más factible por las ventajas que refiere al medioambiente: menores costo de operación, espacio de almacenamiento, cantidad de desechos, riesgo de operación y gasto de agua, disolventes y reactivos químicos.

La validación de un método aporta resultados fiables mediante parámetros como la linealidad, precisión, robustez, entre otros. Su verificación no es más que la acción realizada en el laboratorio previo a la introducción de un método en la rutina de trabajo, para comprobar y documentar que es competente para un estudio dado; es decir, el proceso a través del cual se obtiene evidencia documentada de que el método elegido es el adecuado /17/.

Seguidamente se valora la validación del método espectrofotométrico 4-aminoantipirina, estandarizado a escala micro.

### ***Linealidad***

La linealidad del método se determinó por la recta de mejor ajuste, por medio del análisis de regresión de los mínimos cuadrados. La figura 1 representa la curva de calibración a través de la cual se determina la linealidad del método al aplicar la regresión lineal para  $n = 10$  que dio origen a la recta de mejor ajuste. Se ensayaron muestras de concentraciones desde  $1-5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Los resultados reflejan un coeficiente de correlación y de regresión lineal por encima de los límites establecidos ( $r^3 0,998 9$  y  $r^2 3 0,997 8$ ), lo que indica una alta correspondencia entre la concentración y la respuesta analítica para las diez determinaciones realizadas, con 99 % de confiabilidad.

El estadístico  $r^2$  (coeficiente de determinación) indica que el modelo ajustado explica el 99,89 % de la variabilidad observada, y el coeficiente de correlación con un valor de 0,997 8 demuestra que existe una dependencia lineal entre la concentración y la señal analítica en el intervalo evaluado.

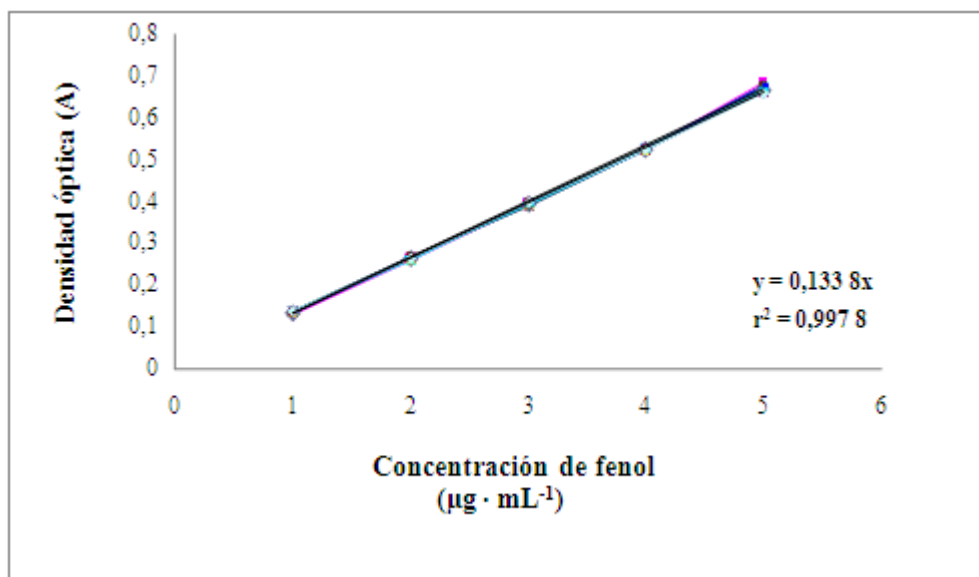


Fig. 1 Curva de calibración para la determinación de la concentración de fenol

La linealidad del método es corroborada por el gráfico de los residuos (diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo ajustado) en función de la concentración (figura 2). La figura revela que los puntos están distribuidos

al azar alrededor del eje X, lo que indica que la curva es realmente lineal hasta los  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de fenol, en correspondencia con lo reportado en otros trabajos /18, 19/, en los que se describe un comportamiento de linealidad hasta los  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

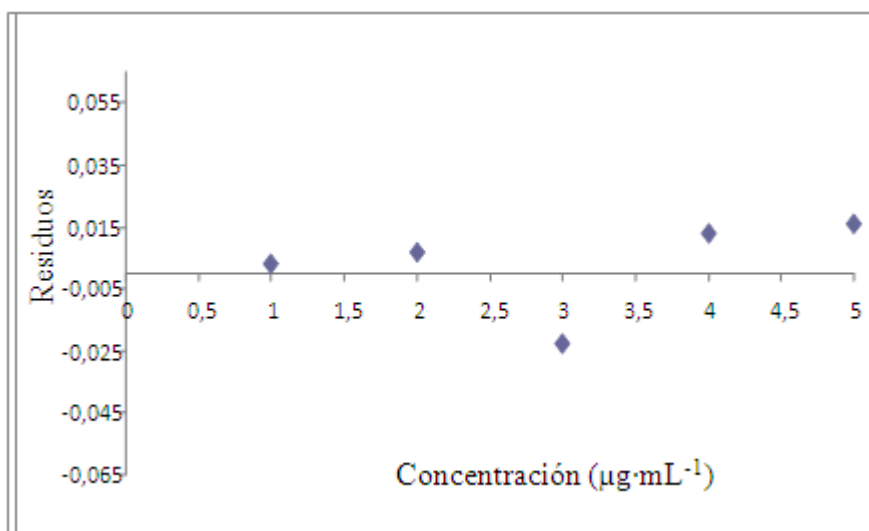


Fig. 2 Gráfico de residuos  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

La tabla 1 muestra el análisis de varianza (Anova) del modelo de regresión. Se observa que el  $F_{\text{calculado}} = 207,72$  y el  $F_{\text{tabulado}} (P = 0,05) = 4,7\text{E}-3$  por lo que  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ , lo que demuestra que

existe una buena correlación entre la absorbancia y la concentración, lo que permite evaluar la concentración de fenol por los valores de la absorbancia obtenidos.



TABLA 1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO DE REGRESIÓN OBTENIDO

	GL	SC	CM	F	Significación de F
Regresión	1	0,076 026 78	0,076 026 78	207,721 457 6	4,779 652 E-3
Residuos	2	0,000 732 01	0,000 366 00		
Total	3	0,076 758 79			

**Precisión y exactitud**

La precisión de un método solo depende de la distribución de los errores aleatorios, que no se encuentra asociada con el valor verdadero y se expresa generalmente como la desviación típica del resultado analítico. Tiene como objetivo conocer la variabilidad y los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo, los que no pueden ser siempre controlados (analista, equipo, instrumental, reactivos, tiempo, etcétera) /16/.

En el presente estudio la precisión fue determinada a través de la repetibilidad. Para ello se evaluó la variabilidad del método operado para el análisis a escala micro sobre la muestra, en las mismas condiciones de ensayo (analista, equipo y reactivos) y laboratorio. La determinación fue realizada a través de la desviación típica relativa (CV) para cinco niveles de concentración, que abarcaron el intervalo de concentración en que se encuentran las muestras a partir de una solución Stock de fenol ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y en condiciones de repetitividad (tabla 2).

TABLA 2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO 4-AMINOANTIPIRINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOL

Concentración de fenol ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Media ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (x) (n = 10)	Desviación estándar (D.E)	Desviación típica relativa (% C.V)
1	0,135 1	0,002 766 867	0,020 48
2	0,265 0	0,005 333 333	0,020 13
3	0,392 4	0,008 682 038	0,022 13
4	0,486 1	0,009 926 955	0,020 42
5	0,644 8	0,014 195 461	0,022 02

El coeficiente de variación obtenido para los cinco niveles de concentración evaluados fue de 0,02, mucho menor que lo permitido como límite para métodos espectrofotométricos (< 3 %), lo que evidencia que el método estandarizado a escala micro es preciso para las concentraciones establecidas en las condiciones de trabajo ensayadas.

La exactitud indica que los resultados que se obtienen con un método analítico se encuentran

próximos al valor verdadero o al que se acepta convencionalmente como valor verdadero. Para determinar la exactitud del método se realizó la prueba de recuperación a tres muestras con concentraciones iniciales de 1,06; 2,07 y 3,08  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , a las cuales se les añadió una cantidad conocida del analito (tabla 3).

Los porcentajes de recuperación obtenidos oscilan entre 99,1 y 100,9 %, sugiriendo que el método tiene buena exactitud. Para comprobar

que la recuperación es satisfactoria se realizó una prueba-t, donde se comparó la media de recobrado obtenida con respecto al 100 % (recobrado teórico). Debido a que el p-valor para esta prueba es mayor o igual a 0,05 ( $p = 0,064$ ), no se rechaza la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95,0 % y, por tanto,

se concluye que el porcentaje de recuperación obtenido (100,01) representa el 100 % de recuperación.

La veracidad del método fue evaluada para cada concentración estudiada con un tamaño de muestra de  $n = 10$  (tabla 3).

**TABLA 3. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN OBTENIDO EN EL ENSAYO DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO 4-AMINOANTIPIRINA A ESCALA MICRO**

Concentración patrón ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Cantidad añadida de analito ( $\mu\text{g}$ )	Conc. calculada ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	% recuperación
1,06	1,1	2,15	99,1
2,07	2,1	4,19	100,9
3,08	3,1	6,18	100
<b>Media</b>			100,01
<b>CV %</b>			0,000 36

#### **Límites de detección y cuantificación**

El límite de detección (LD) ha sido definido como la menor cantidad de analito detectable, pero no cuantificable por el método de análisis en una muestra, mientras que el límite de cuantificación o de determinación (LC) es el

valor mínimo de analito cuantificable por el método en una muestra /10/.

Para determinar los límites de cuantificación y de detección del método espectrofotométrico 4-aminoantipirina, se realizó la determinación de veinte muestras blanco de agua destilada. Los resultados se muestran en la tabla 4.

**TABLA 4. LÍMITES DE DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESTABLECIDOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES POR EL MÉTODO 4-AMINOANTIPIRINA A ESCALA MICRO (LÍMITES D Y C)**

Parámetros	Valores
Nº de muestras	20
Media ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0,047 9
Desviación estándar ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0,001 372 7
$X_{\text{máxima}}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0,049
$X_{\text{mínima}}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0,044
Límite de detección ( $x \pm 3$ D.E) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0,052 018 1
Límite de cuantificación ( $x \pm 10$ D.E) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0,061 627

El límite de detección calculado fue de  $0,052 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  y el límite de cuantificación fue  $0,62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Ambos resultados confirman la utilidad del método para cuantificar pequeñas cantidades de fenoles en medio de cultivo.

### Robustez

La robustez se define como la medida de la capacidad que posee un método analítico para permanecer inalterable ante pequeñas, pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros; es decir, la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto a las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización /14/, lo que proporciona idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en análisis de rutina.

Dado que el método de la 4-aminoantipirina se fundamenta en una reacción, donde el ajuste de pH

resulta fundamental para garantizar la formación del complejo coloreado entre el reactivo 4-aminoantipirina y el fenol presente en la muestra, condiciones significativas para la obtención de un buen resultado analítico, se comprobó la robustez del método por medio de un diseño factorial  $2^2$ , donde se evaluaron los factores volumen de buffer añadido y cantidad de reactivo como factores dependientes para el método ensayado, cuya variable de respuesta fue la concentración de fenoles totales.

Con los resultados del análisis ANOVA (tabla 5) se comprobó que ninguno de los factores estudiados, ni la combinación de estos, influye significativamente en los resultados analíticos del método ( $p\text{-valor} > 0,05$ ) con un nivel de confianza del 95 %, lo que demuestra que el método de la 4-aminoantipirina es robusto frente a los factores estudiados.

TABLA 5. RESULTADOS DEL ANOVA PARA EL ENSAYO DE ROBUSTEZ DEL MICROMÉTODO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Cantidad de 4-aminoantipirina	0,000 021 12	1	0,000 021 12	0,01	0,923 0
B: Cantidad de buffer	0,001 770 13	1	0,001 770 13	1,24	0,466 2
AB	0,001 770 13	1	0,001 770 13	1,24	0,466 2
Error total	0,001 431 13	1	0,001 431 13		
Total (corr.)	0,016 021 9	7			

También el método se ha empleado con varias modificaciones en cuanto a concentración del reactivo precursor (4-aminoantipirina)/20/.

### Comparación del micrométodo 4-aminoantipirina con el Folin Ciocalteu

La determinación de compuestos fenólicos en muestras de aguas puede ser cuantificada mediante

las variantes (3) descritas en la literatura. En este trabajo se evalúan dos que resultan similares para la determinación de fenoles totales.

Si bien se reconoce al método de la 4-aminoantipirina (método 1) como el método espectrofotométrico estándar para la cuantificación de fenoles en muestras de aguas y aguas residuales, se procedió a la comparación con el método establecido



para la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de plantas por el método de Folin Ciocalteu (método 2) ya estandarizado por Rodríguez y col. (2011). Se tuvo en cuenta el

ajuste del método estudiado, en cuanto a tamaño de muestra y reactivos utilizados, de escala convencional a microescala. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

**TABLA 6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Parámetros	Método de la 4-aminoantipirina	Método de Folin Ciocalteu
Media	0,135	0,136
Desviación estándar	0,002 553 886	0,002 898 275
Varianza	6,522 33E-06	8,4E-06
Grado de libertad	9	9

El análisis estadístico realizado refleja que no existen diferencias significativas entre los valores alcanzados en ambos métodos de cuantificación, lo que evidencia que ambos pueden determinar el contenido de fenoles en muestras ambientales.

#### **Determinación de compuestos fenólicos en muestras de medio de cultivo**

Los compuestos fenólicos son tóxicos para la mayoría de los microorganismos en concentraciones superiores a los  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , de ahí que se considere un éxito encontrar bacterias que degraden completamente concentraciones cercanas a estas. Lo anterior justifica la búsqueda de bacterias degradantes de dichos compuestos y su ensayo en concentraciones entre los  $100$  y  $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

/19-22/. Para el estudio se debe contar con métodos precisos que permitan de manera rápida y sencilla el monitoreo del proceso de degradación.

A partir de lo anterior, para la evaluación de la efectividad del método 4-aminoantipirina a microescala, se procedió a cuantificar los fenoles en muestras incubadas en medio mineral salino con  $80,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de 2-clorofenol, e inoculadas con cultivo de cepa RS-11 y RS-13.

La tabla 7 muestra los valores de concentración antes y después del proceso de degradación, cuantificado a través del método evaluado. La cuantificación fue realizada mediante evaluación de muestras de cultivo en tiempo cero y transcurridas 48 h de experimentación.

**TABLA 7. DETERMINACIÓN DE FENOLES EN MEDIOS DE CULTIVOS POR LOS MÉTODOS 4-AMINOANTIPIRINA A ESCALA MICRO, ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN POR CEPAS DEL GÉNERO *Bacillus***

Nº de muestras	Nº de determinaciones	C <sub>0</sub> (fenoles) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	C <sub>f</sub> (fenoles) ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	DS	CV (%)
1	5	80	32	0,016	0,004 1
2	5	80	24	0,016	0,003 8

Leyenda: C<sub>0</sub>-Concentración inicial, C<sub>f</sub>-Concentración final

Transcurridas 48 h la concentración de 2-clorofenol descendió a 40 y 30 % para RS-11 y RS-13, respectivamente. Ello demuestra que las cepas no adaptadas a un compuesto tóxico necesitan más tiempo para que su maquinaria enzimática degrade el compuesto orgánico evaluado, y minimice así su toxicidad o lo utilice como fuente de carbono. Resultados similares obtuvo Magdolna (2013) cuando observó que a medida que aumentaba la concentración de 4-CF (10, 100 y 1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) disminuía el porcentaje de degradación (88, 50 y 15 %, respectivamente), durante un tiempo de incubación de 164 h /23, 24/.

El coeficiente de variación de las determinaciones fue de 0,004 1 y 0,003 8 % para los cultivos con RS-11 y RS-13, respectivamente; lo que demuestra que el método es efectivo para la cuantificación de fenoles totales en cultivos bacterianos, los que requieren de técnicas precisas y poco volumen de muestra.



## Conclusiones

**Los resultados del estudio de la validación por verificación a microescala del método de la 4-aminoantipirina para la determinación de fenoles totales en muestras de cultivo microbiano indican que el mismo es adecuado y proporciona datos confiables para ser utilizado como análisis de rutina en la cuantificación de estas moléculas, con menor gasto de reactivos y, por tanto, mínima generación de residuos, lo que reporta ventajas económicas y medioambientales.**



## Bibliografía

- CHAUDHRY, M. Q.; SCHROEDER, P.; WERCK-REICHHART, D.; GRAJEK, W.; MARECIK, R. "Prospects and Limitations of Phytoremediation for the Removal of Persistent Pesticides in the Environment". *Environmental Science and Pollution Research*. 2002, 9, 1, p. 4-17.
- DEBARTI, P.; GUNJAN, P.; JANMEJAY, P.; RAKESH, K. J. "Assesing Microbial Diversity for Bioremediation and Environmental Restoration". *TRENDS in Biotechnology*. 2005, 23, 3, p. 135-142.
- AGARRY, S. E.; DUROJAIYE, A. O.; SOLOMON, B. O. "Microbial Degradation of Phenols: a Review". *Int. J. Environment and Pollution*. 2008, 32, 1, p. 12-28.
- JING, Li; YI, Li; WANG, Ch.; WANG, P. "Growth Kinetics and Phenol Biodegradation of Psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1". *Bioresource Technology*. 2010, 101, p. 6740-6744.
- AL-THANI, R.; ABD-EL-HALEEM, D.; AL-SHAMMARI, M. "Isolation, Biochemical and Molecular Characterization of 2-Chlorophenol Degrading *Bacillus* Isolates". *African J. of Biotechnol.* 2007, 6, 23, p. 2675-2681.
- United State Pharmacopeia Convention*. 30<sup>th</sup> Edition. USA: 2007.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products*. ICH Topic Q 1 A. New York: 2004.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Greenberg, Arnold, et al. (ed). 20<sup>th</sup> ed. Washington DC: 2012.
- MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. "Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection". *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, p. 3660-3667.
- INDU-NAIR, C.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, Sh. "Biodegradation of Phenol". *African Journal of Biotechnology*. 2008, 7, 25, p. 4951-4958.
- YANG, R.; HUMPHREY, A. "Dynamics and Steady State Studies of Phenol Degradation in Pure and Mixed Cultures". *Biotechnol Bioeng.* 1975, 17, p. 1211-1235.
- MAINERO, R. "¿Por qué microescala?". *Educación Química*. 1997, 8, 3, p. 166-167.
- VILLAR, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; MIRABAL, L. "Adaptación de métodos de análisis a microescala para bebidas alcohólicas". *Educación Química*. 2001, 12, 2, p. 113-115.
- AGUIRRE ORTEGA, L., et al. "Generalidades, materias primas y especialidades farmacéuticas". En: *Validación de métodos analíticos*. Barcelona, AEFI, 2001. p. 45-130
- RODRÍGUEZ AMADO, J. R.; ESCALONA ARRANZ, J. C; RODRÍGUEZ ROMERO, R.; RODRÍGUEZ BATISTA, Y. "Validación del método de cuantificación de polifenoles en el extracto fluido de *Tamarindus indica* L.". *Revista Cubana de Química*. 2011, XXIII, 1, p. 42-52.
- OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. *Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos*. NC TS 368. 2010.
- BANDEIRA, R., et al. "Development and Validation of a Method for the Analysis of Ochratoxin a in Roasted Coffee by Liquid Chromatography/Electrospray-Mass Spectrometry in Tandem (lc/esi-ms/ms)". *Quim. Nova*. 2012, 35, 1, p. 66-71.
- FONTMORIN, J. M., et al. "Combined Process for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Treatment-Coupling of an Electrochemical System with a biological treatment". *Biochemical Engineering Journal*. 2013, 70, p. 17-22.
- BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. "Isolation and Characterization of Hyper Phenol Tolerant *Bacillus* sp. from Oil Refinery and Exploration Sites". *Journal of Hazardous Materials*. 2010, 176, p. 85-91.

20. BOTRÉ, C.; BOTRÉ, F.; MAZZEI, F.; PODESTÁ, E. "Inhibition-Based Biosensors for the Detection of Environmental Contaminants: Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, 19, p. 2876-2881.
21. EL-SAYED, W.; ISMAEIL, M.; EL-BEIH, F. "Isolation of 4-Chlorophenol Degrading Bacteria *Bacillus subtilis* OS1 and *Alcaligenes* sp OS2 from Petroleum Oil-Contaminated Soil and Characterization of its Catabolic Pathway". *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009, 3, 2, p. 776-783.
22. FERREIRA GUEDES, S. "Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de *Penicillium*". Tesis en opción al grado de Maestro en Tecnología y seguridad alimentaria. Universidad de São Paulo, 2010.
23. MAGDOLNA, Z.; GRUIZ, K.; MOLNÁR, M.; FENYVESI, E. "Comparative Evaluation of Microbial and Chemical Methods for Assessing 4-Chlorophenol Biodegradation in Soil". *Chemical Engineering*. 2013, 57, 1-2, p. 25-35.
24. SINGH, S.; BAHADUR, B.; CHANDRA, R. "Biodegradation of Phenol in Batch Culture and Mixed Strains of *Paenibacillus* sp and *Bacillus cereus*". *Polish J. of Microbiol.* 2009, 58, 4, p. 319-325.