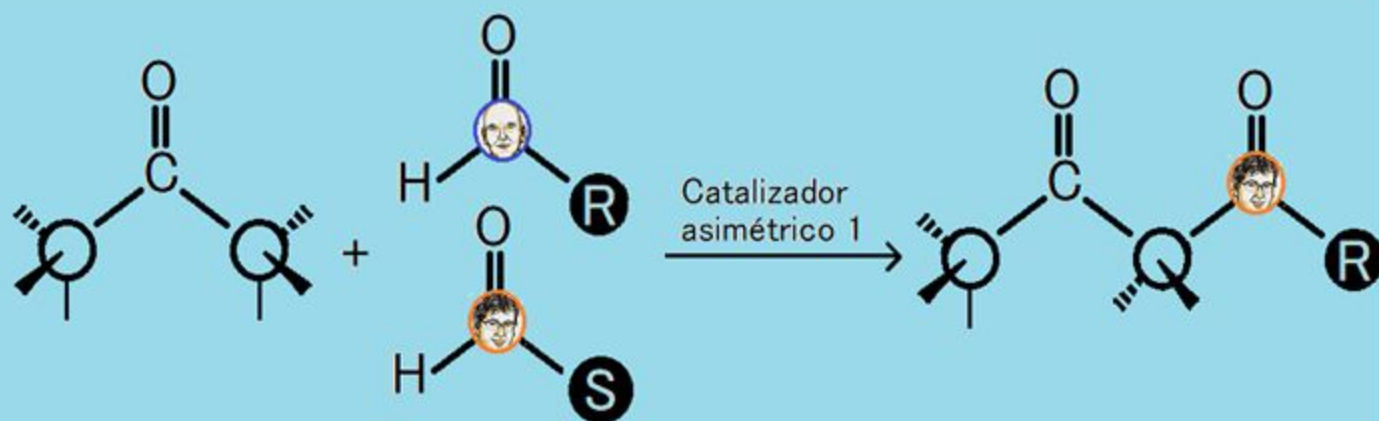


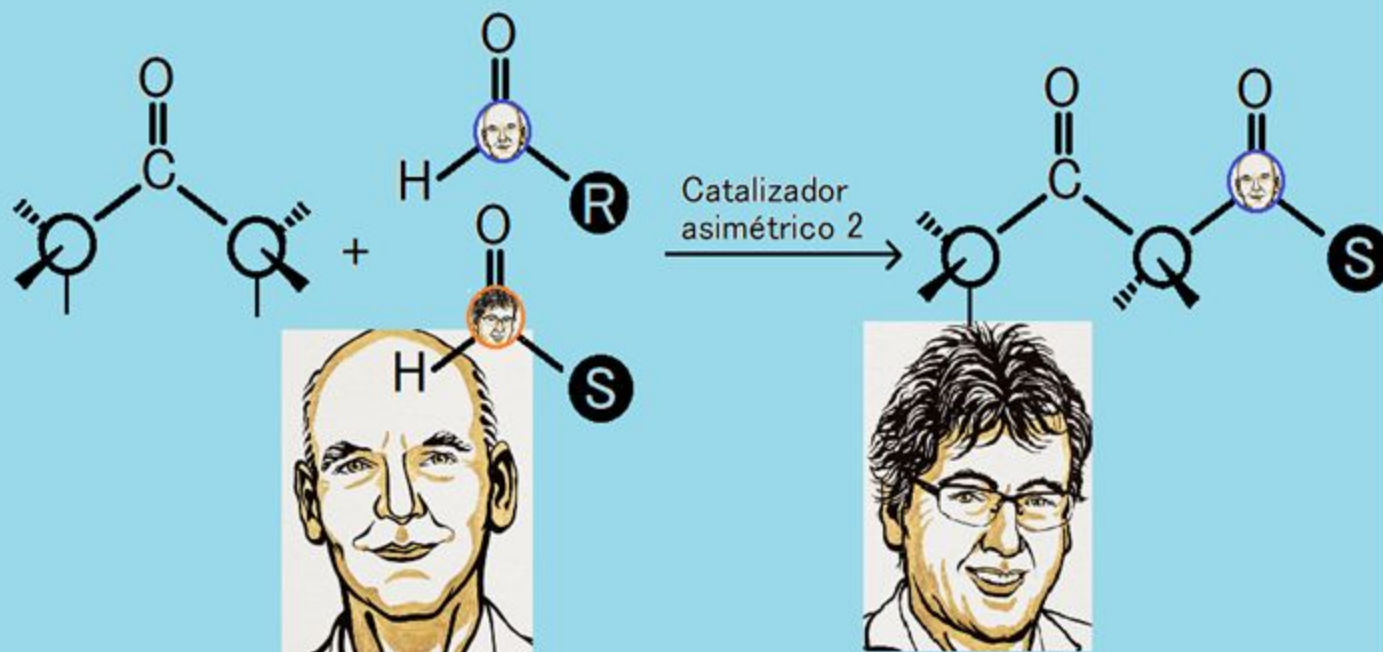


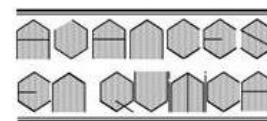
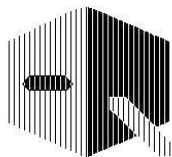
Avances en Química

Volumen 17, Número 2, mayo-agosto 2022



Mezcla
racémica





Simulación del proceso de producción de ácido láctico a partir de residuos alimentarios para la evaluación económica

**Alfredo Alexander Navia Penarrieta, Cynthia Roxana Macías Cajape,
Ricardo José Baquerizo-Crespo, María Antonieta Riera***

Departamento de Procesos Químicos, Alimentos y Biotecnología. Facultad de Ciencias
Matemáticas, Físicas y Químicas. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador

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

Recibido: 17/01/2022

Revisado: 24/03/2022

Aceptado: 01/04/2022

Resumen

El ácido láctico (AL) presenta una demanda creciente en Ecuador, aunque actualmente no existen industrias nacionales que lo produzcan. El objetivo de la investigación fue simular el proceso de obtención de AL a partir de residuos alimentarios para su evaluación económica. La selección de residuos consideró su disponibilidad a nivel nacional, así como la información disponible en la literatura. Se trabajó con cascarilla de arroz (CA) y bagazo de caña (BC). El software empleado para la simulación fue SuperProDesigner® V 10.0. Se incluyeron los balances de materiales y energía, el diseño de equipos y las estimaciones económicas correspondientes. Los resultados de la simulación para CA y BC muestran producciones superiores a 16 y 22 Ton AL/batch respectivamente, con un valor actual neto (VAN) cercano a 50 millones de USD y un tiempo de vida útil de 15 años. El BC ofreció mejores indicadores económicos para la producción de AL.

Palabras claves: balance económico; bagazo de caña de azúcar; cascarilla de arroz; simulación; sostenibilidad.

Abstract

Simulation of the production process of lactic acid from food residues for economic evaluation. Lactic acid (LA) presents a growing demand in Ecuador, although there are currently no national industries that produce it. The objective of the research was to simulate the process of obtaining AL from food waste for its economic evaluation. The selection of residues left their availability at the national level, as well as the information available in the literature. Rice husk (RH) and cane bagasse (CB) were used. The software used for the simulation was SuperPro Designer® V 10.0. Material and energy balances, equipment design, and corresponding economic estimates are included. The simulation results for RH and CB show productions greater than 16 and, 22 Ton LA/batch respectively, with a net present value (NPV) close to 50 million USD and useful life of 15 years. The BC offered better economic indicators for LA production.

Keywords: Economic balance; Sugar cane bagasse; Rice husk; Simulation; Sustainability.

Introducción

En la actualidad existe la tendencia de aprovechar residuos para utilizarlos como materia prima en la obtención de nuevos productos, como por ejemplo el ácido láctico (ácido 2-hidroxipropiónico), un ácido orgánico valorado por sus diferentes aplicaciones industriales; como acidulante, conservante y aromatizante. Los usos del AL incluyen la producción de polímeros, el curtido de textiles además de otras aplicaciones para las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosméticas debido a su biocompatibilidad¹.

Este ácido orgánico tiene dos isómeros ópticos, los cuales son el D(-) láctico y el L(+) láctico. Desde el punto de vista industrial es importante el uso de estos isómeros en su forma pura, ya que cada uno tiene funciones específicas independiente del otro. El L(+) láctico es de mayor interés para las industrias alimenticias y farmacéuticas, porque el organismo lo metaboliza completamente debido a la presencia de L-lactato deshidrogenasa². El ácido láctico es manufacturado por síntesis química

o por producción biotecnológica. Aproximadamente el 90% del ácido láctico se produce por métodos biotecnológicos o fermentación microbiana. Con el desarrollo de la bioconversión y el uso apropiado de microorganismos, la fermentación microbiana es el método dominante para la producción de ácido láctico debido a aspectos ambientales, bajas temperaturas de producción, bajos requerimientos de energía y alta pureza³.

Los residuos con alto contenido de material lignocelulósicos constituyen una alternativa como materias primas para la obtención de AL por vía biotecnológica. En el trabajo de Proaños y Piñeros⁴ se evaluó el potencial de la cascarilla de arroz para la obtención de AL con un rendimiento de 0,075 g AL/g CA, mientras que en la investigación de González *et al.*⁵ se obtuvo un rendimiento de 0,724 g AL/g BC en el estudio de bagazo de caña de azúcar para la producción de ácido láctico.

La demanda mundial de ácido láctico era de 1.220 kilotoneladas (kt) en el 2016, y con un crecimiento anual estimado del 16,2%, la proyección de la demanda para el 2025 es de 1.960

kt, equivalente a \$ 9.800 millones en el mercado mundial. Las principales empresas líderes productoras de ácido láctico son: Corbion – Purac (Países Bajos), Galactic (Bélgica), Nature Works LLC – Cargill (Estados Unidos), Musashino Chemical Laboratory, Ltd. (Japón), entre otras⁶. Actualmente en Ecuador no existen productores a escala industrial de AL⁷. En el año 2017 las importaciones de AL superaron las 27 toneladas métricas, por un costo de 47.000 dólares⁸.

Por otra parte, se encuentra la simulación de procesos la cual es una herramienta tecnológica que, a pesar de que su auge ha sido en las últimas décadas, se ha usado desde hace mucho tiempo⁹. Una simulación es una reproducción artificial de un modelo teórico de una situación, que analiza su comportamiento y planea las consecuencias de cambios similares dentro de un contexto real¹⁰. Actualmente la simulación se presenta como una herramienta de gran utilidad para la industria, que permite explorar las oportunidades para mejorar la gestión del rendimiento de los procesos en la ejecución de un plan de producción, formulando así las estrategias que apoyan el proceso de toma de decisiones¹¹.

De igual manera, la simulación contribuye con la toma de decisiones apropiadas para cualquier tipo de proceso, dado que permite considerar la implementación de nuevos procedimientos y condiciones de trabajo, teniendo en cuenta las incertidumbres y riesgos del proceso¹². En la actualidad resulta viable el uso de simuladores en trabajos de investigación para procesos de producción de ácido láctico empleando como sustratos residuos industriales, como el realizado por Méndez¹³, en donde se presenta una aproximación considerable para un posible proceso real de producción de ácido láctico de una manera sustentable y económicamente factible, partiendo del uso de materia prima renovable y de bajo costo para su posterior fermentación, purificación y separación.

En el Ecuador, el sector agroindustrial es de gran importancia económica, aportando en el 2019 un 7,74% al Producto Interno Bruto (PBI) del país, equivalente a \$ 8.370,7 millones¹⁴. Anualmente se producen en el país 1.668.523 toneladas (t) de arroz y 10.088.870 t de caña de azúcar¹⁵, equivalentes a 333.700 t de cascarilla de arroz (20% del peso total¹⁶) y 3.228.438 t de bagazo de caña (25 – 40% del peso total¹⁷). Al ser un país tradicionalmente agrícola, resulta razonable evaluar el potencial de estos residuos para la obtención de materiales de alto valor industrial, como lo es el ácido láctico.

Con base en lo expuesto, se planteó la simulación de un proceso para la obtención de ácido láctico a partir de residuos alimentarios, a fin de determinar la influencia que ejerce la materia prima y las condiciones de operación, en el rendimiento de la producción de ácido láctico y la economía del proceso. La importancia de la simulación reside en que, con los modelos utilizados, se podría explorar el funcionamiento de un sistema existente si se modifica, o cómo se comportaría un nuevo sistema antes de que el prototipo se complete, lo que ahorra costos y plazos de entrega¹⁸.

Materiales y métodos

Flujo de materiales

Los residuos agroindustriales seleccionados como materia prima para el proceso simulado fueron cascarilla de arroz y bagazo de caña. La composición para CA es de 44,09% celulosa; 26,31% hemicelulosa; 20,55 % lignina y 9,05% agua¹⁹ y para BC es de 45,50% celulosa; 27,00 % hemicelulosa; 21,10% de lignina y 6,40% correspondiente a cenizas²⁰.

Se utilizó una base de cálculo en el flujo de alimentación de 40000 kg de residuo/batch; para la selección de este flujo se tomó en cuenta el sector proveedor; el cual representa el uso del 2,33% de la producción nacional de cascarilla de arroz y el 0,24% de bagazo de caña, con materia prima suficiente para que no se interrumpa la producción.

Proceso de producción de ácido láctico

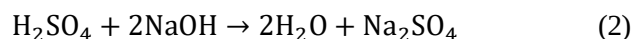
Se contemplaron 6 etapas para la bioproducción de ácido láctico: 1) pretratamiento, 2) neutralización, 3) hidrólisis enzimática, 4) inoculación, 5) fermentación, 6) separación y purificación¹³.

En el pretratamiento se descomponen la materia lignocelulósica en azúcares fermentables como glucosa y xilosa. Se utiliza H₂SO₄ al 10% (m/m) para la CA durante 2 h y al 5,4 % (m/m) para el BC durante 4 h. En ambos casos la temperatura de operación fue 121 °C. los residuos agroindustriales se trataron con el ácido en relación de 15% (p/p)²¹.

La ecuación de Arrhenius (1) fue el modelo para estimar la constante cinética de hidrólisis (k), en función de la temperatura (T). El factor de frecuencia (A) fue de 1.166,316 y la energía de activación (Ea) de 57.052 kJ/kmol para CA²². Para BC las constantes A y Ea fueron 2,3 x10⁹ y 85.000 kJ/kmol, respectivamente²³.

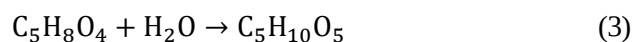
$$k = A * e^{-\left(\frac{E_a}{R \cdot T}\right)} \quad (1)$$

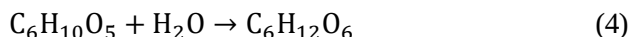
Posteriormente se requiere la separación de las fases sólida y líquida producidas en la hidrólisis. Una solución de NaOH 10 M neutraliza la fase líquida. La reacción de neutralización (2) es:



Después de la neutralización, el proceso varía con el residual. En el proceso CA, la corriente líquida neutralizada y el sólido se mezclan. El 5% de los azúcares fermentables de la mezcla ingresan a la etapa de inoculación y el 95% pasan a la etapa de hidrólisis enzimática. El procesamiento de BC no requiere hidrólisis enzimática. El 1% del líquido neutralizado va a la inoculación y el 99% de la corriente ingresa a un separador sólido/líquido donde la fase líquida ingresa al fermentador.

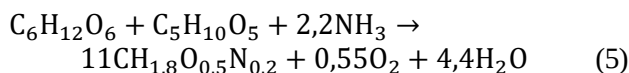
A continuación, está la hidrólisis enzimática donde la temperatura de sacarificación de CA pretratada con las enzimas fue de 50 °C durante 14 h. Las reacciones son (3) y (4):





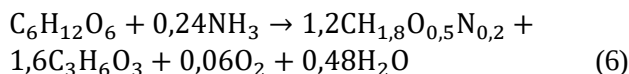
Las constantes cinéticas (k) de los procesos de transformación de glucosa y xilosa fueron $0,000128611 \text{ min}^{-1}$ y $0,000075 \text{ min}^{-1}$, respectivamente²⁴. Posteriormente, la fase líquida se separa de la sólida y se envía a fermentación.

Para la preparación del inóculo, se consideró el uso de los azúcares fermentables para el medio de cultivo y una fuente de nitrógeno, durante 10 h (CA) y 20 h (BC) a 37 °C. El crecimiento del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* por reacción (5):



La etapa de fermentación requiere la eliminación del ácido nítrico. El fermentador mezcla el producto con azúcares fermentables provenientes de la separación sólido/líquido y recirculación del reactor de precipitación. Las condiciones de fermentación fueron temperatura 45°C por 31 h (CA) y 39 h (BC). Las reacciones (6) y (7) corresponden a las etapas de transformación biológica a ácido láctico.

Posteriormente se separa el ácido nítrico, y la corriente resultante es llevada al fermentador, en donde se mezcla con los azúcares fermentables resultantes del separador sólido/líquido y una corriente de recirculación proveniente del reactor de precipitación. En la fermentación se consideró una temperatura de 45 °C durante 31 h (CA) y 39 h (BC). Las reacciones (6) y (7), son las etapas para la obtención del ácido láctico.

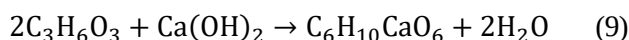


El consumo de sustrato utilizó el modelo de Monod (8) para la cinética de fermentación.

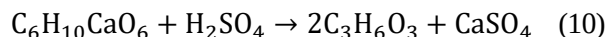
$$\mu = \left[\alpha \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \right] (B - \text{Term}) \quad (8)$$

Donde: μ es la tasa de crecimiento de la biomasa; K_s es la constante de Monod [mg/L]; α es la constante de proporcionalidad; $\mu_{\max}$ es la tasa máxima de crecimiento de la biomasa [h⁻¹]; y B-Term es una expresión de primer orden para la biomasa. Los valores estimados para K_s , α y μ fueron 45.700 mg/L, 0,596 y 0,136 h⁻¹, respectivamente²⁵.

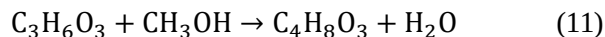
En la última etapa, un filtro separa el medio de cultivo de sus componentes sólidos y la biomasa. Posteriormente, una solución al 25% (p/p) de Ca(OH)₂ reacciona con el caldo para formar (9) un precipitado de lactato de calcio.



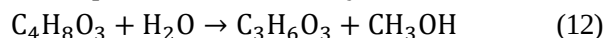
El 90% de los azúcares fermentables recirculan al fermentador. El lactato de calcio producido y una solución de ácido sulfúrico al 25% (p/p) alimentan un reactor de hidrólisis. La reacción de lactato de calcio y ácido sulfúrico (10) forma AL y sulfato de calcio²⁶.



El ácido láctico acuoso alimenta una columna preconcentradora para la eliminación del 56 % del agua. El concentrado circula a equipos de esterificación para la reacción de ácido láctico con metanol. Esta reacción produce lactato de metilo y utiliza Amberlyst 15® como catalizador. La reacción de esterificación (11) es:



La hidrólisis del lactato de metilo (12) produce ácido láctico y metanol. Este proceso utiliza Amberlyst 15® como catalizador.



El ácido sale por el fondo de la columna. El metanol ingresa a una sección de recuperación para la separación del agua y otras impurezas. Este alcohol vuelve a entrar en la sección de esterificación, mientras que el agua recircula a la sección de hidrólisis²⁷.

Análisis económico

El análisis económico del proceso utilizó los resultados de la simulación con ambos residuos de alimentos. La evaluación económica incluyó los indicadores: Capital Invertido (CI), Costo Operativo (CO), Ingreso (I), Retorno de la Inversión (RI), Tiempo de Recuperación (TR), Tasa Interna de Retorno (TIR), y Valor Presente Neto (VAN). Adicionalmente, el análisis de sensibilidad económica comparó escenarios con impacto directo en los indicadores económicos por variaciones en los costos de (i) materias primas, (ii) servicios auxiliares (energía estándar, agua de enfriamiento, vapor), (iii) equipos tecnológicos, y (iv) ácido láctico, así como (v) la frecuencia de reposición de insumos (catalizadores, membrana dft, matraz de agitación). Las variaciones de los factores corresponden a incrementos del 10% (A), 20% (B) y 30% (C) respecto a los casos base.

Software utilizado

Para realizar la simulación del proceso de obtención de ácido láctico, se utilizó el software SuperProDesigner® v.10.0. El modo de operación seleccionado fue tipo batch y el diagrama del proceso presentado, se realizó con base en investigaciones previas^{26,27}.

Discusión de resultados

Simulación del proceso de producción de ácido láctico

Las figuras 1 y 2 presentan los diagramas de proceso correspondientes a las simulaciones para la obtención de AL a partir de CA y BC, respectivamente. Los balances de masa indicaron producciones de ácido de 16.056,55 kg AL/lote y 22.672,78 kg AL/lote, equivalentes a rendimientos de 0,4 g AL/gCA y 0,56 g AL/gBC, respectivamente. En una investigación previa, se obtuvo un residuo de 0,075 g AL/g⁴ inferior al estimado en la simulación con CA. Otro trabajo reportó un residuo de BC 0,724 g AL/g⁵, superior al simulado. La simulación con BC presenta una mejor aproximación a los resultados experimentales que la simulación con CA.

Equipamiento

Las tablas 1 y 2 indican los equipos tecnológicos simulados en el procesamiento de CA y BC, respectivamente. El procesa-

Tabla 1: Equipos para el procesamiento de CA.

Nombre	Descripción	Cantidad
DC-101	Centrífuga decantadora	4
R-101	Reactor agitado	4
MX-101	Mezclador	1
DC-102	Centrífuga decantadora	21
R-103	Reactor agitado	13
R-102	Reactor agitado	2
SFR-101	Rejilla para matraces de agitación	1
CSP-102	Divisor de componentes	1
FR-101	Fermentador	26
MF-101	Microfiltro	1
R-105	Reactor agitado	2
R-104	Reactor agitado	4
C-101	Columna de destilación	1
R-106	Reactor agitado	2
R-107	Reactor agitado	2
C-102	Columna de destilación	1
CSP-101	Divisor de componentes	1
CSP-103	Divisor de componentes	1

Tabla 2: Equipos para el procesamiento de BC.

Nombre	Descripción	Cantidad
DC-101	Centrífuga decantadora	4
R-101	Reactor agitado	3
DC-102	Centrífuga decantadora	23
R-102	Reactor agitado	4
SFR-101	Rejilla para matraces de agitación	1
CSP-101	Divisor de componentes	1
FR-101	Fermentador	29
MF-101	Microfiltro	1
R-104	Reactor agitado	4
R-103	Reactor agitado	3
C-101	Columna de destilación	1
R-105	Reactor agitado	3
R-106	Reactor agitado	3
C-102	Columna de destilación	1
CSP-102	Divisor de componentes	1
CSP-103	Divisor de componentes	1

miento CA simuló 18 operaciones unitarias y procesos que incluyeron una etapa de mezclado y posterior hidrólisis enzimática para la idoneidad del sustrato. La simulación para el procesamiento de BC no requirió estas operaciones y procesos

+

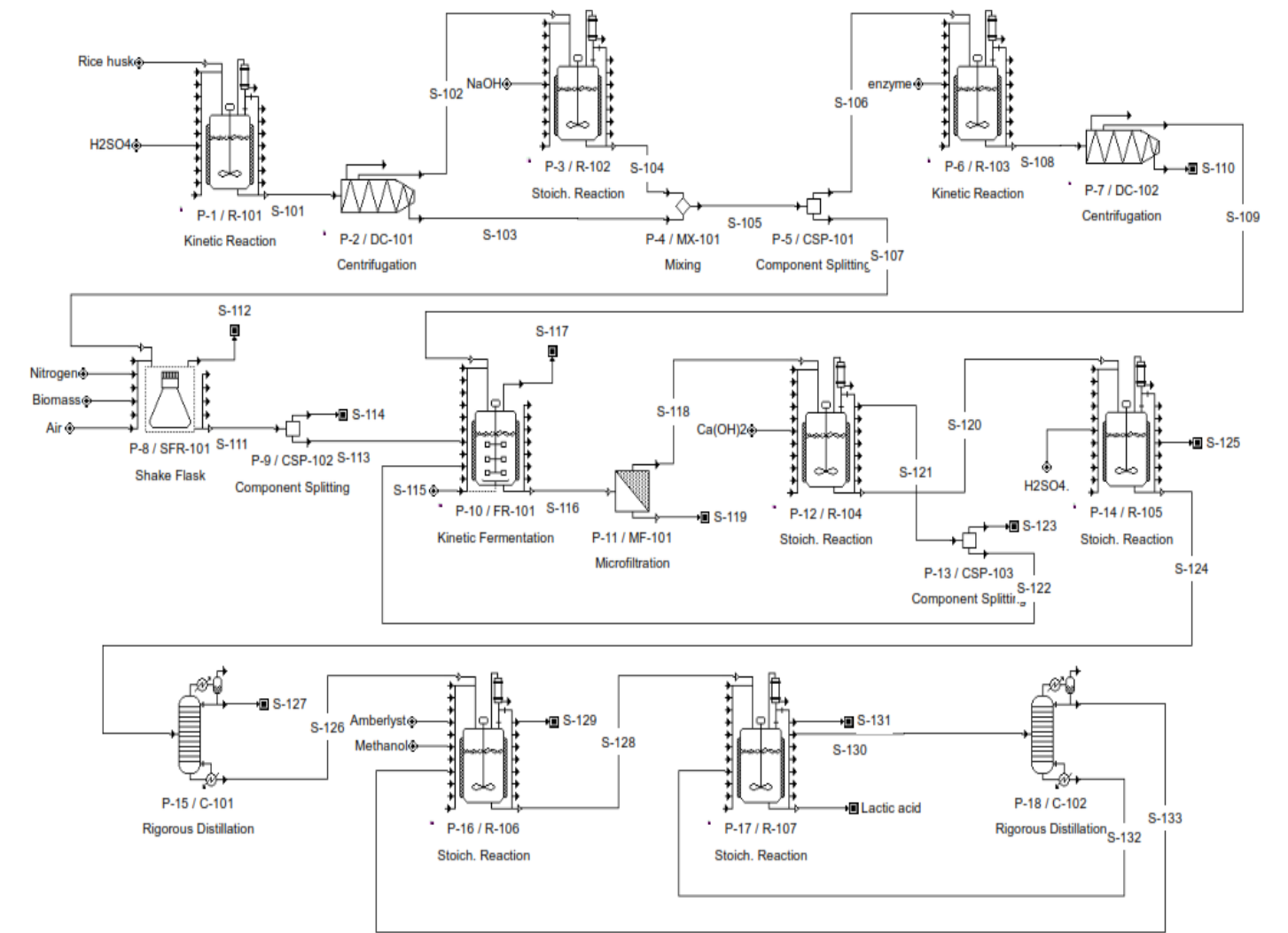


Fig. 1: Diagrama de producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz.

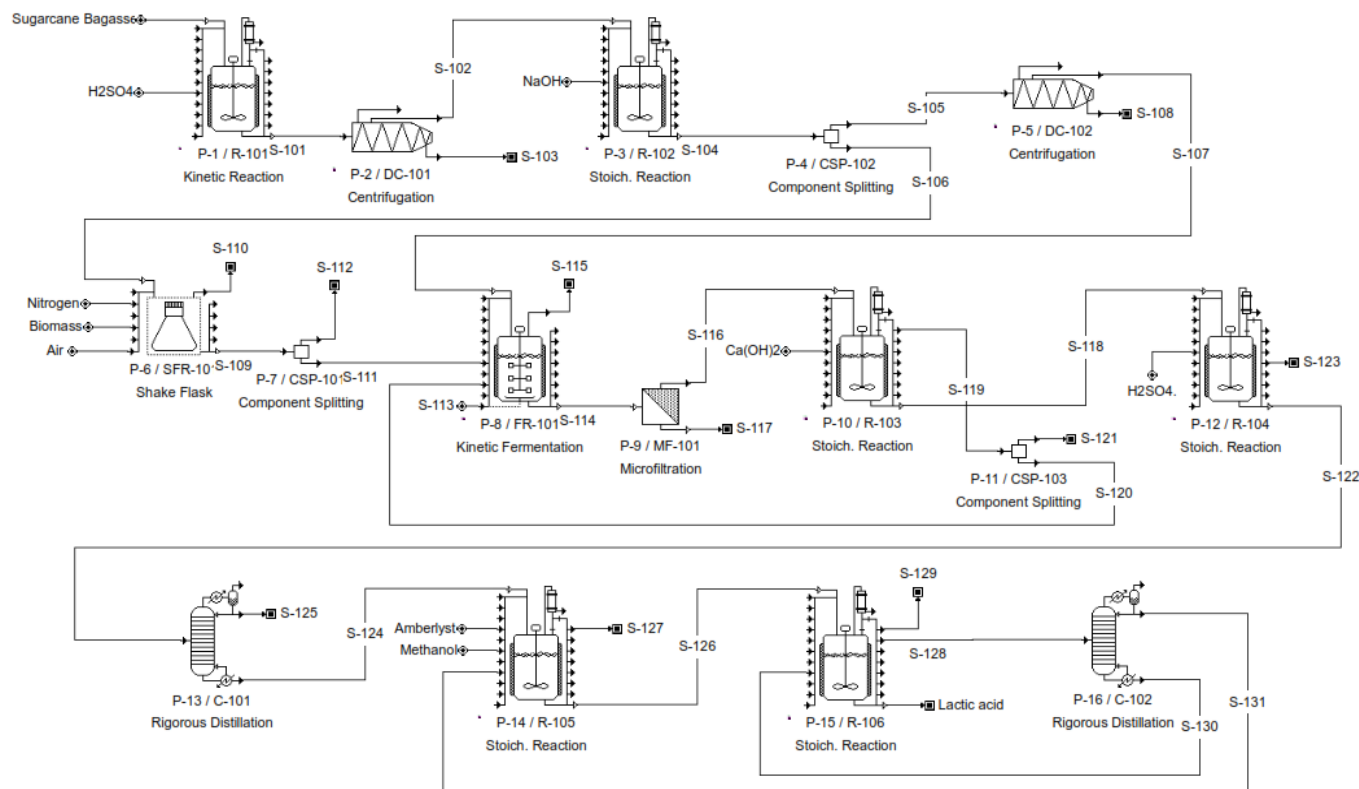


Fig. 2: Diagrama de producción de ácido láctico a partir de bagazo de caña.

unitarios (mezcla e hidrólisis enzimática) debido a los altos rendimientos reportados en la literatura. Por ello, se incrementa la cantidad de equipos necesarios en ciertos procesos de simulación de BC con respecto a CA, principalmente en el fermentador.

Tiempo de operación

Los diagramas de Gantt (figuras 3 y 4) delinean el tiempo de operación de los equipos para la transformación de la materia. Para CA, la simulación indica un tiempo operativo total de 142 h. Los tiempos de operación del reactor de hidrólisis enzimática (R-103), la inoculación (SFR-101) y el fermentador (FR-101) fueron los más largos debido a la preparación y transformación de azúcares fermentables, haciendo que el tiempo total de operación dependa de la cantidad de equipos necesarios en cada proceso de transformación. A pesar de no incluir el paso de hidrólisis enzimática, el tiempo de operación para el procesamiento de BC fue mayor (149,46 h) que el tiempo de operación para CA. Los tiempos de operación de la inoculación (SFR-101) y del fermentador (FR-101) fueron los más largos. El número de fermentadores simulados en el procesamiento de BC fue mayor que el número de fermentadores simulados para CA.

Comparación de los procesos CA y BC en la producción de ácido láctico

Los resultados del balance económico para cada simulación (tabla 3) presentan diferencias entre ellos. Los indicadores económicos (VAN, TIR y RI) para la producción de AL son favorables para los casos evaluados. Sin embargo, el procesa-

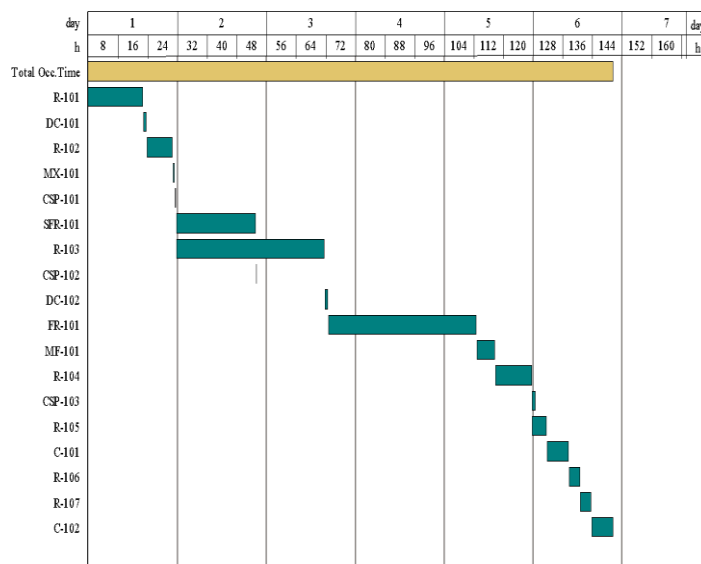


Fig. 3: Diagrama de Gantt del funcionamiento del equipo en el proceso – CA.

miento de BC genera más beneficios económicos debido a los menores costos operativos. La evaluación económica del proceso de obtención de ácido láctico tiene una estrecha relación con los precios y disponibilidad de las materias primas. Kwan *et al.*²⁸ indica valores de TIR y RI para la producción de LA a partir de desperdicios de alimentos de 31,1 % y 22,9 %, respectivamente. Manandhar & Shah²⁹ utilizaron granos de maíz y reportaron un RI y VAN de 13,1% y \$ 39,3 millones, respectivamente.

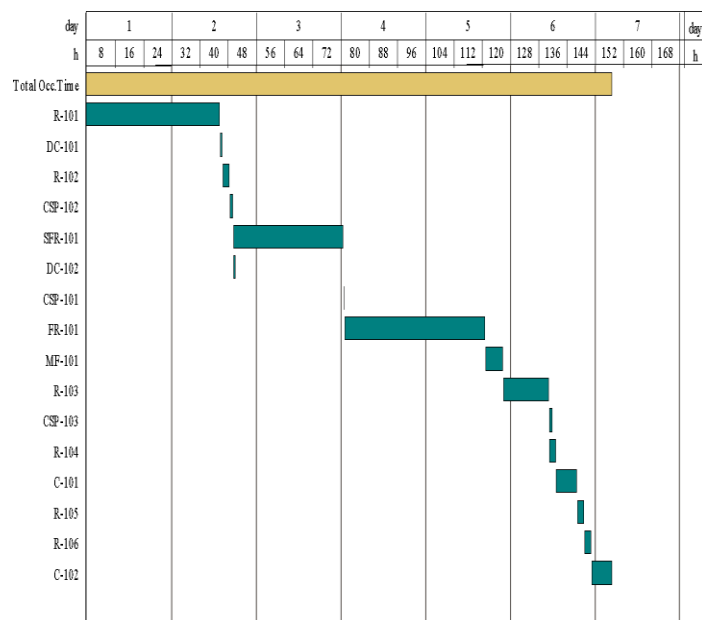


Fig. 4: Diagrama de Gantt del funcionamiento del equipo en el proceso – BC.

Tabla 3: Comparación de variables económicas de los residuos incluidos en esta investigación.

Variable	CA	BC
Capital (\$)*	44,21	40,60
Ingreso (\$)*	25,80	36,46
Costos de operación (\$)*	14,25	12,94
ROI (%)	24,60	43,70
IRR (%)	28,98	59,61
NPV (\$)*	50,38	111,64

RI: Retorno de la Inversión; TIR: Tasa Interna de Retorno; VAN: Valor Presente Neto; * Expresado en millones.

Análisis de sensibilidad

El análisis de sensibilidad es una herramienta para evaluar escenarios desde varias perspectivas de producción³⁰. Los factores materia prima, consumibles y utilidades no representaron variables que influyan en la evaluación económica (figuras 5-1, 5-2, 5-3, 6-1, 6-2 y 6-3). Sin embargo, las modificaciones en los costos de los equipos tecnológicos y el precio del LA fueron factores que afectaron la evaluación económica, los indicadores más afectados fueron el TR, la TIR y el VAN (figuras 5-4, 5-5, 6-4 y 6-5). La participación simultánea de todas las variables en un 30% disminuyó el VAN en un 50% y aumentó el TR en más de diez años con respecto al caso base (figuras 5-6 y 6-6) siendo viable, pero con menor rentabilidad. Estos resultados muestran el comportamiento de las variables analizadas ante posibles cambios en el mercado, relacionados con los precios de los equipos o productos contemplados en esta investigación. Asimismo, contribuye a futuras investigaciones, sirviendo de guía y mostrando los factores más influyentes en la evaluación financiera ante cualquier cambio económico dentro del proceso.

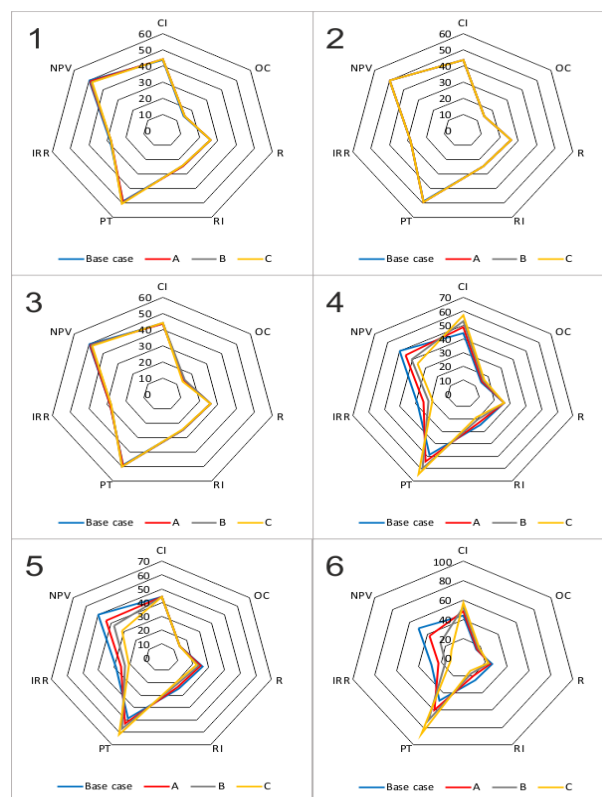


Fig. 5: Análisis de sensibilidad para el proceso de producción de ácido láctico con cascarilla de arroz como materia prima; parámetros a evaluar: 1. Materia prima, 2. Consumibles, 3. Utilidades, 4. Equipos, 5. Ácido láctico, 6. Análisis combinado.

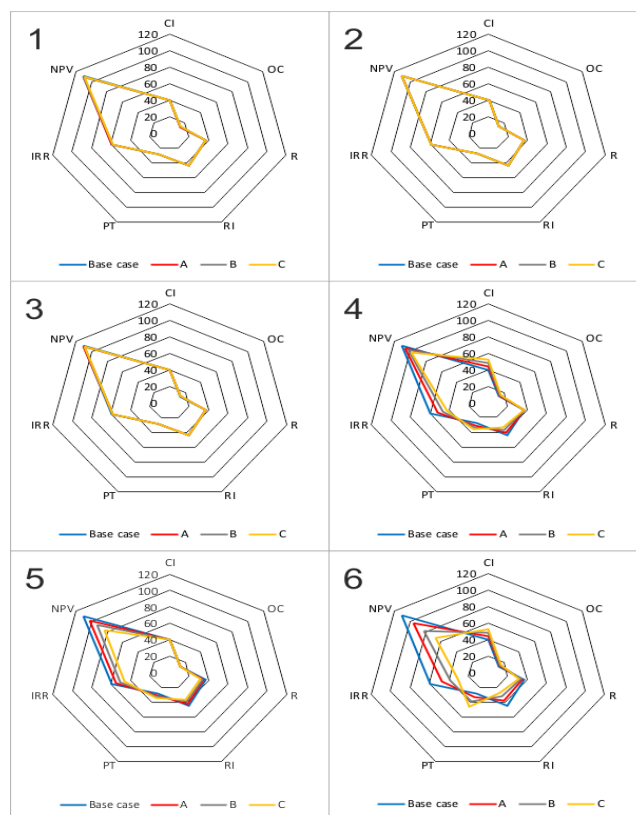


Fig. 6: Análisis de sensibilidad para el proceso de producción de ácido láctico con bagazo de caña como materia prima; parámetros a evaluar: 1. Materia prima, 2. Consumibles, 3. Utilidades, 4. Equipos, 5. Ácido láctico, 6. Análisis combinado.

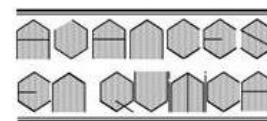
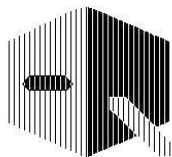
Conclusiones

CA y BC fueron los residuos alimentarios utilizados como materia prima para simular el proceso de obtención de AL por fermentación microbiana. Estos residuos son accesibles y pueden generar una cantidad importante de ácido láctico. Para determinar la viabilidad del proyecto se realizó un análisis de sensibilidad, las variaciones en el costo de los equipos y el precio del ácido láctico fueron los factores que influyeron en la factibilidad del proceso. Las simulaciones de los procesos productivos de LA estimaron indicadores económicos favorables para la implementación tecnológica. Basado en indicadores de rentabilidad económica VAN (\$111.649x10⁶), TIR (59,61%), RI (43,7%) y con un capital de \$40.598x10⁶; el BC fue el sustrato de mayor desempeño productivo y económico.

Referencias

1. M Biddy, C Scarlata, C Kinchin. Chemicals from biomass: a market assessment of bioproducts with near-term potential. En: *National Renewable Energy Laboratory* (2016). Disponible en: <https://www.osti.gov/biblio/1244312/>
2. E Cubas-Cano, C González Fernández, M Ballesteros, E Tomás-Pejó. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. **Biofuels Bio-products & Biorefining**, **12**(2), 290-303 (2018)
3. Y Wang, Y Tashiro, K Sonomoto. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **119**(1), 10-18 (2015)
4. J Proaños, Y Piñeros. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*. **Revista Mutis**, **4**(1), 33-39 (2014).
5. A González, M Bustos, G Rodríguez, L Rodríguez, A Del Ángel. Kinetics of lactic acid fermentation from sugarcane bagasse by *Lactobacillus pentosus*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, **19**(1), 377-386 (2020).
6. R Alves de Oliveira, A Komesu, C Vaz Rossell, R Maciel Filho. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design - from economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, **133**, 219-239 (2018).
7. A Castells Román. Evaluación del potencial de producción de ácido láctico mediante cepas de *Bacillus subtilis*. Trabajo de grado. Universidad San Francisco de Quito, Quito. Ecuador (2018).
8. C Novoa Arroyo. Obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*. Trabajo de grado. Universidad Técnica del Norte, Imbabura, Ecuador (2019).
9. M Álvarez, R García. La simulación en la industria. Ediciones UTN. Ecuador (2005).
10. M Penagos. Juegos con dados: una experiencia en aula desde la experimentación y simulación. En: *III Encuentro Colombiano de Educación Estocástica*. 2018: 264-273. Disponible: <http://funes.uniandes.edu.co/12948/1/Penagos2018Juegos.pdf> Consultado: 28/11/2021
11. D Zapata, J Oviedo. Modelo de simulación de alternativas de productividad para apoyar los procesos de toma de decisiones en empresas del sector floricultor antioqueño. **Información Tecnológica**, **30**(2), 57-72 (2019).
12. R Spann, K Gernaey, G Sin. A compartment model for risk-based monitoring of lactic acid bacteria cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, **151**, 107293 (2019).
13. J Méndez, E Pérez, R Morales. Diseño conceptual de una planta de producción de ácido láctico a partir de residuos de la industria azucarera. **Jóvenes en la ciencia**, **3**(2), 736-740, 2017.
14. <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/IEMensual.jsp> Consultado: 30/03/2021
15. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas> Consultado: 20/05/2021
16. E Tanguila Vargas, Aprovechamiento de la cascarilla de arroz en elaboración de bloques de alivianamiento, cantón Joya de los Sachas, Orellana, Joya de los Sachas, Orellana. Trabajo de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador (2018).
17. Z Pernalet, F Piña, M Suárez, A Ferrer, C Aiello. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. **Bioagro**, **20**(1), 3-10 (2008).
18. F Hosseinpour, H Hajihosseini. Importance of simulation in manufacturing. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, **3**(3), 285-288 (2009).
19. J Barreto Pico, R Macías Menéndez. Aprovechamiento de los residuos agroindustriales provenientes del procesamiento del arroz y de maíz para el desarrollo de bioplásticos. Trabajo de grado. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador (2020).
20. L Fuentes, S Rabelo, R Filho, A Costa. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **163**(5), 612-625 (2011).
21. B Saha, L Iten, M Cotta, V Wu. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, **21**(3), 816-822 (2015).
22. Megawati, W Sediawan, H Sulisty, M Hidayat. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: Effect of catalyst concentration. **Bioresource Technology**, **102**(2), 2062-2067 (2011).
23. S Kumar, P Dheeran, S Singh, I Mishra, D Adhikari. Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, **83**, 850-858 (2015).
24. M Nikzad, F Talebnia, K Movagharnejad, G Najafpour, M Esfahanian. Kinetic Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sorghum Bicolor and Rice Husk. **International Journal of Engineering**, **30**, 1622-1630 (2017).
25. K Dutta, A Mukherjee, P Chakraborty. Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **46**, 410-413 (1996).

26. J Méndez Alva, E Perez Cisneros, D Rodríguez Gómez, O Prado Rubio, B Ruiz Camacho, R. Morales Rodríguez. Computer-aided process simulation, design and analysis: lactic acid production from lignocellulosic residues. **Computer Aided Chemical Engineering**, **44**, 463-468 (2018).
27. O Prado-Rubio, R Gasca-González, J Fontalvo, F Gómez-Castro, E Pérez-Cisneros, R Morales-Rodríguez. Design and evaluation of intensified downstream technologies towards feasible lactic acid bioproduction. **Chemical Engineering and Processing**, **158**, 108174 (2020).
28. T Kwan, Y Hu, C Lin. Techno-economic analysis of a food waste valorisation process for lactic acid, lactide and poly(lactic acid) production. **Journal of Cleaner Production**, **181**, 72-87 (2018).
29. A Manandhar, A Shah. Techno-economic analysis of bio-based lactic acid production utilizing corn grain as feedstock. **Processes**, **8**, 199-213 (2020).
30. B Kaminski, M Jakubczyk, P Szufel. A framework for sensitivity analysis of decision trees. **Central European Journal of Operations Research**, **26(1)**, 135-159 (2018)



Diseño *in silico* de un bio-receptor peptídico para el reconocimiento de serotonina como biomarcador

**Karen Tatiana Holguín Hurtado, Mayra Julieth Méndez Bohórquez,
Luna Rodríguez-Salazar, James Guevara-Pulido***

INQA, Facultad de Ciencias, Universidad El Bosque, Bogotá - Colombia

(*) joguevara@unbosque.edu.co

Recibido: 26/05/2022

Revisado: 23/06/2022

Aceptado: 21/07/2022

Resumen

La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor, que actúa como biomarcador para patologías como la depresión y los tumores carcinoides del intestino delgado, por ello es de gran importancia y un desafío realizar su cuantificación *in situ*. Actualmente, existen biosensores enzimáticos para la cuantificación de serotonina, sin embargo, las enzimas presentan inestabilidad. Por esta razón, en este estudio, se diseñaron bio-receptores peptídicos *in silico*, de los cuales uno obtuvo una energía de interacción por la serotonina de -6,5 kcal/mol, distancias de interacción de los puentes de hidrógeno de 2,20 Å en promedio y alta selectividad del bio-receptor al comparar la energía de interacción obtenida con la serotonina frente a otras biomoléculas.

Palabras claves: afinidad química; biorreceptor; depresión; docking molecular; serotonina

Abstract

***In silico* design of a peptide bioreceptor for the recognition of serotonin as a biomarker.** Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter that acts as a biomarker for pathologies such as depression and carcinoid tumors of the small intestine, which is why it is of great importance and a challenge to quantify it *in situ*. Currently, there are enzymatic biosensors for serotonin quantification, however, the enzymes present instability. For this reason, in this study, peptide bioreceptors were designed *in silico*, of which one obtained an interaction energy for serotonin of -6.5 kcal/mol, hydrogen bond interaction distances of 2.20 Å on average and high bioreceptor selectivity when comparing the interaction energy obtained with serotonin versus other biomolecules.

Keywords: Chemical affinity; Bioreceptor; Depression; Molecular docking; Serotonin

Introducción

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina biogénica reconocida por su función como neurotransmisor y modulador de la motilidad gastrointestinal, el tono vascular periférico, el tono vascular cerebral y la función plaquetaria¹. También se conoce como un posible biomarcador donde se considera que en bajas concentraciones se asocia con depresión mayor², mientras que en concentraciones anormalmente altas se relaciona con tumores carcinoides del intestino delgado y otras patologías³. De acuerdo con lo anterior, se considera relevante contar con métodos bio-analíticos para la cuantificación de serotonina en relación con las patologías mencionadas.

Actualmente, la cuantificación de serotonina en el sector salud se hace mediante técnicas confiables como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), el método espectrofluorimétrico y la electroforesis capilar, estos métodos a pesar de ser sensibles no ofrecen una cuantificación de la concentración de serotonina en tiempo real y presentan dificultades debido a que requieren de un pretratamiento minucioso y costoso de las muestras⁴, a causa de que la serotonina presenta oxidación espontánea en

condiciones ambientales normales donde es tomada la muestra⁵. Por consiguiente, los métodos mencionados no brindan un análisis *in situ*, impidiendo un monitoreo constante e influyendo en el tratamiento personalizado sobre la medicación adecuada para el paciente depresivo. Teniendo en cuenta la situación descrita surgen los biosensores como un posible método para la detección y cuantificación de serotonina en tiempo real.

Los biosensores que se presentan como potenciales para el reconocimiento y cuantificación de serotonina hacen uso de bio-receptores enzimáticos como la tirosinasa⁴ y la monoamino oxidasa-A⁶, a pesar de ser una solución sensible, presentan limitantes como la inestabilidad de las enzimas cuando se someten a altas temperaturas y cambios de pH en el medio, lo que causa la desnaturalización de estas⁷.

Por lo tanto, se evidencia una falencia en la estabilidad y sensibilidad de este tipo de bio-receptores, no obstante, se ha desarrollado una nueva alternativa que son los bio-receptores peptídicos los cuales tienen una gran sensibilidad, un bajo peso molecular el cual les otorga mayor estabilidad en comparación con las enzimas, y además, pueden ser sintetizados químicamente,

lo que permite hacer modificaciones y diseños de acuerdo a la necesidad⁸.

En este estudio se diseñó un bio-receptor *in silico* capaz de reconocer serotonina, haciendo uso de herramientas bioinformáticas con el fin de modelar y evaluar la interacción bio-receptor-ligando. El diseño se fundamenta en la mimesis del reconocimiento enzimático, lo cual le otorga características de alta selectividad.

Diseño experimental

Identificación de proteínas y análisis del sitio activo

Se realizó la búsqueda de los receptores y enzimas característicos de las interacciones 5-HT en procesos fisiológicos del ser humano, luego, se llevó a cabo una revisión de dichas proteínas en el Protein Data Bank (PDB), seleccionando y descargando aquellas que cumplieran con criterios clave en cuanto a la calidad del cristal, como una alta resolución y su ubicación en el espectro.

Posteriormente se empleó el programa PyMOL para modificar cada una de estas proteínas eliminando cualquier molécula que no hiciera parte de la estructura del receptor y descargándolos en formato pdb. Por último, se analizó el sitio activo y los sitios de anclaje de cada una, reconociendo las secuencias de aminoácidos y la interacción de estas proteínas por medio del PDB.

Acoplamiento molecular

Para los receptores se llevó a cabo un acoplamiento molecular para calcular las interacciones de afinidad, cargándolos en el software AutoDockTools (versión 1.5.6), y guardando los archivos en formato pdbqt con su respectivo nombre. Para el modelamiento se buscó eliminar las moléculas de agua que se hubiesen podido haber incluido en el archivo protein.pdb, además se adicionaron hidrógenos polares a las proteínas, se eliminaron los hidrógenos no polares para reducir el número de átomos a simular⁹ y se añadieron las cargas de Gasteiger para el ligando y las de Kollman para las proteínas, esto con el fin de hacerle una preparación a la proteína para el *docking* molecular, posterior a esto, se guardaron como archivos pdbqt ya que los archivos en este formato almacenan las cargas parciales y tipos de átomos⁹.

Diseño de bio-receptores *in silico*

Se diseñaron en el software Avogadro, cuatro bio-receptores para cada proteína cristalizada en el PDB, siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Salazar (2020)¹⁰, y aplicando modificaciones estructurales a cada bio-receptor diseñado para lograr energías de interacción similares a las reportadas para las proteínas.

El primer bio-receptor consistió en una cadena peptídica secuencial constituida solamente por los aminoácidos identificados del sitio activo de cada proteína; el segundo se hizo a partir del bio-receptor anterior y se polimerizó en cada uno

de sus extremos con 30 unidades de estireno buscando aumentar el impedimento estérico; el tercer bio-receptor se diseñó adicionando puentes metilénicos, los cuales actuaron como espaciadores para reemplazar los aminoácidos de la secuencia que no tiene interacción con el sustrato, cabe aclarar que los puentes metilénicos no se añadieron a escala real sino en una proporción de un dígito que simulara los espacios. Finalmente, el cuarto bio-receptor se realizó polimerizando el bio-receptor anterior con unidades de estireno. Adicionalmente, se llevó a cabo un proceso de rediseño teniendo en cuenta que ningún receptor logró superar la afinidad objetivo que se determina como la calculada entre los receptores serotoninérgicos (tabla 3) 5-HT1A, SERT, 5-HT1D y el 5-HT1E frente a la serotonina, por lo que, en vez de polimerizar con 30 unidades de estireno, se aumentó el número a 50 unidades de estireno en cada extremo terminal buscando incrementar mucho más el impedimento estérico.

A cada estructura peptídica se le minimizó la energía usando la herramienta del software Avogadro Merck Molecular Force Field (MMFF94s) con cuatro pasos de actualización y la opción de algoritmo por gradiente descendente, esto fue fundamental ya que la minimización en Avogadro permite que la longitud de enlace, ángulo de enlace y de torsión entre los distintos átomos sea la adecuada garantizando la mecánica molecular, debido a que hay fuerzas fisicoquímicas de interacción y repulsión características de cada enlace¹¹.

Determinación del bio-receptor *in silico*

Debido a que varios bio-receptores lograron superar la energía de interacción objetivo (tabla 3) se evaluaron criterios adicionales con el fin de escoger el bio-receptor *in silico* más apropiado.

Entre los criterios adicionales evaluados se encuentra la selectividad de los bio-receptores por otros sustratos, esto se realizó calculando la energía de interacción mediante AutoDock Vina teniendo en cuenta interferentes comunes como la dopamina, adrenalina y noradrenalina, además de moléculas que se encuentran en fluidos biológicos como glucosa y lactato entre otras¹², cada uno de estos sustratos fue modelado en Avogadro.

Asimismo, se calcularon las distancias de interacción (Puentes de hidrógeno) por medio de Discovery Studio entre la serotonina y los bio-receptores seleccionados teniendo como línea de comparación las distancias de interacción analizadas previamente de la serotonina y las proteínas descargadas del PDB correspondientes a los bio-receptores.

Discusión de resultados

A partir de la búsqueda de los principales receptores involucrados en las interacciones 5-HT en procesos fisiológicos del ser humano, la búsqueda en el PDB y los criterios definidos en la metodología tenidos en cuenta para la selección de estos, se seleccionó el 5-HT1A, SER

T, 5-HT1D y el 5-HT1E debido a que son los receptores relacionados con el reconocimiento y recaptación de serotonina en el sistema nervioso¹³. Después de la selección y como se mencionó en la metodología los receptores estaban acompañados por un complejo proteico y en otros casos por fármacos, por ello se requirió de su adecuación en PyMOL con el fin de eliminar dichas moléculas que no hacían parte del receptor, los resultados de las estructuras 3D se pueden evidenciar en la tabla 1.

En cuanto al reconocimiento del sitio activo de cada receptor, se presentan los resultados en la tabla 2, donde se evi-

dencian cada una de las proteínas con los aminoácidos del sitio activo resaltados y la posición de cada uno de ellos arrojados por el PDB.

Al contar con los sitios activos de las proteínas se registraron los datos del Grid Box para realizar el *docking* molecular en el programa AutoDockTools, estos se pueden observar a continuación en la tabla 3. Luego con los datos ya registrados se procedió a evaluar las energías de interacción por triplicado entre la serotonina y los receptores serotoninérgicos mencionados anteriormente.

Tabla 1. Receptores serotoninérgicos seleccionados y estructura cristalizada modificada.

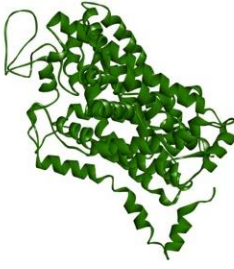
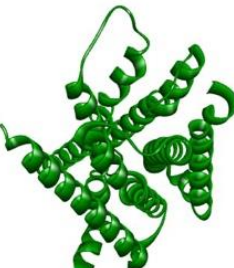
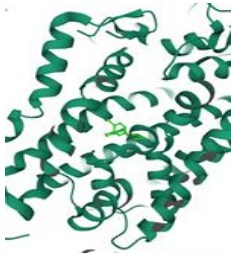
Nombre común del receptor	Nombre estructura en el PDB	Estructura cristalizada modificada en PyMOL
5-HT1A	7E2Y	
SERT	6VRK	
5-HT1D	7E32	
5-HT1E	7E33	

Tabla 2. Sitios activos de los receptores serotoninérgicos seleccionados en el PDB.

Nombre común del receptor	Sitio activo	Posición de los aminoácidos	Aminoácidos
5-HT1A		116	D (Asp)
		117	V (Val)
		120	C (Cys)
		121	T (Thr)
		189	I (Ile)
		199	S (Ser)
		200	T (Thr)
		203	A (Ala)
		358	W (Trp)
		361	F (Phe)
		362	F (Phe)
		365	A (Ala)
		390	Y (Tyr)
SERT		94	G (Gly)
		96	A (Ala)
		97	V (Val)
		101	N (Asn)
		336	S (Ser)
		368	N (Asn)
		434	L (Leu)
		437	D (Asp)
5-HT1D		118	D (Asp)
		119	I (Ile)
		122	C (Cys)
		123	T (Thr)
		169	I (Ile)
		190	V (Val)
		201	S (Ser)
		202	T (Thr)
		205	A (Ala)
		314	W (Trp)
		317	F (Phe)
		318	F (Phe)
		321	S (Ser)
5-HT1E		346	Y (Tyr)
		102	D (Asp)
		103	M (Met)
		106	C (Cys)
		107	T (Thr)
		153	I (Ile)
		177	H (His)
		183	T (Thr)
		186	S (Ser)
		187	T (Thr)
		190	A (Ala)
		304	W (Trp)
		307	F (Phe)
		308	F (Phe)
		311	E (Glu)
		330	T (Thr)
		334	Y (Tyr)

Al contar con los sitios activos de las proteínas se registraron los datos del Grid Box para realizar el *docking* molecular en el programa AutoDockTools, estos se pueden observar a continuación en la tabla 3. Luego, con los datos ya registrados, se procedió a evaluar las energías de interacción por triplicado entre la serotonina y los receptores serotoninérgicos mencionados anteriormente.

La desviación estándar reportada para los datos de energía de interacción está basada solamente en el primer conformero de las ocho opciones presentadas en cada uno de los resultados, teniendo en cuenta que se hizo por triplicado para cada receptor.

Tabla 3. Energías de interacción promedio entre los receptores serotoninérgicos seleccionados en el PDB y la serotonina.

Nombre común del receptor	Energía de interacción promedio (kcal/mol) / Desviación estándar
5-HT1A	-6,1
SERT	-6,6
5-HT1D	-6,3
5-HT1E	-6,1

Para finalizar, se observó que el receptor SERT presentó una mayor afinidad por la serotonina con un valor de -6,6 kcal/mol promedio de los resultados por triplicado, en cambio, los receptores 5-HT1A y 5-HT1E demostraron una menor afinidad de -6,1 kcal/mol. Tras haber obtenido las afinidades entre las proteínas descargadas del PDB y la serotonina. El siguiente paso fue diseñar en el software Avogadro los cuatro bio-receptores inicialmente propuestos junto con la etapa de rediseño para cada una de las 4 proteínas seleccionadas.

En la tabla 4, se encuentran los bio-receptores diseñados para la 5-HT1A junto con el promedio de los resultados de las afinidades por triplicado entre la serotonina y cada uno de estos por medio de AutoDock Vina, se pueden observar polimerizaciones de 30 y 50 unidades de estireno dado que con la primera no se logró superar la energía de interacción objetivo, por ende, se realizó un rediseño buscando aumentar el volumen estérico.¹⁰

Los bio-receptores anteriormente mostrados se diseñaron con el fin de lograr alcanzar o superar la afinidad-objetivo establecida entre la serotonina y la proteína 5-HT1A descargada del PDB, la cual tenía un valor de -6,1 kcal/mol. En la tabla 4 se evidencia que el bio-receptor que logró superar esta afinidad fue el número 2.1 rediseño 5-HT1A, que se encontraba constituido por los aminoácidos del sitio activo y una polimerización de 50 unidades de estireno en sus extremos terminales obteniendo así una afinidad de -6,7 kcal/mol. No obstante, los demás bio-receptores no consiguieron superar este objetivo aun teniendo en cuenta que algunos pasaron por etapas de rediseño. En la tabla 5, se pueden observar

los bio-receptores diseñados para SERT junto con el promedio de los resultados de las energías de interacción por triplicado entre la serotonina y cada uno de estos.

Los bio-receptores anteriormente mostrados se diseñaron con el fin de lograr alcanzar o superar la afinidad-objetivo establecida entre la serotonina y la proteína SERT descargada del PDB, la cual tenía un valor de -6,6 kcal/mol. En la tabla 5 se evidencia que el bio-receptor que logró superar esta afinidad fue el número 4.1 rediseño SERT, que se encontraba constituido por los aminoácidos del sitio activo, puentes metilénicos y una polimerización de 50 unidades de estirenos en sus extremos terminales obteniendo así una afinidad de -6,7 kcal/mol. Es evidente que tanto en estos resultados como los de la tabla 4, la afinidad aumenta en todos los casos donde el volumen estérico es mayor debido a las polimerizaciones. En la tabla 6, se pueden observar los bio-receptores diseñados para la 5-HT1D junto con el promedio de los resultados de las afinidades por triplicado entre la serotonina y cada uno de estos.

Los bio-receptores diseñados con el fin de lograr alcanzar o superar la afinidad-objetivo establecida entre la serotonina y la proteína 5-HT1D descargada del PDB, la cual tenía un valor de -6,3 kcal/mol. En la tabla 6 se evidencia que ningún bio-receptor logró superar esta afinidad, sin embargo, el bio-receptor que estuvo más cerca de hacerlo con una diferencia de -0,6 fue el número 2 con una afinidad promedio de -5,7 kcal/mol. No se procedió a hacer más rediseños teniendo en cuenta que otros bio-receptores diseñados para otras proteínas ya lograron superar la afinidad objetivo y con ellos se puede seguir la investigación.

En la tabla 7, se pueden observar los bio-receptores diseñados para la 5-HT1E junto con el promedio de los resultados de las afinidades por triplicado entre la serotonina y cada uno de estos.

Los bio-receptores anteriormente mostrados se diseñaron con el fin de lograr alcanzar o superar la afinidad-objetivo establecida entre la serotonina y la proteína 5-HT1E descargada del PDB, la cual tenía un valor de -6,1 kcal/mol. En la tabla 7 se evidencia que el bio-receptor que logró superar esta afinidad fue el número 2.1 rediseño 5-HT1E, que se encontraba constituido por los aminoácidos del sitio activo y una polimerización de 50 unidades de estireno en sus extremos terminales obteniendo así una afinidad de -6,5 kcal/mol.

Para esta proteína en específico (5-HT1E) se diseñaron solamente cinco bio-receptores y no seis como en los otros casos debido a que su tamaño era extenso y como se mencionó en el primer requerimiento de restricción el número de aminoácidos estaba limitado al software, en este caso AutoDock generaba error con el bio-receptor 4.1 rediseño, debido a que contaba con puentes metilénicos que aumentaban su tamaño y restringía que el Grid Box tomara todo el sitio activo, alternando los resultados y obteniendo una afinidad anormalmente baja.

Tabla 4. Energías de interacción promedio entre los bio-receptores diseñados en Avogadro de la proteína 5-HT1A y la serotonina.

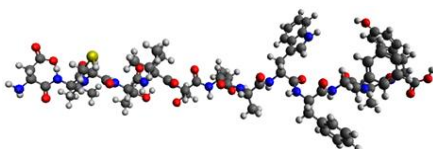
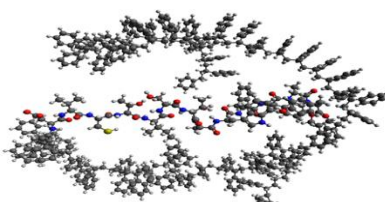
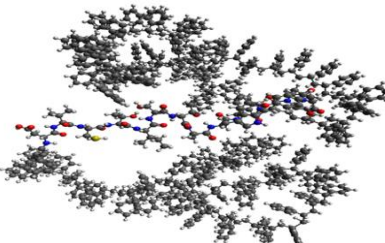
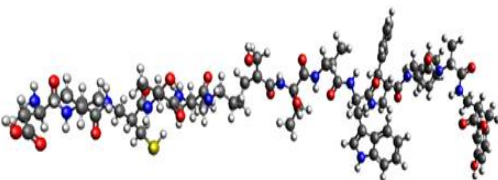
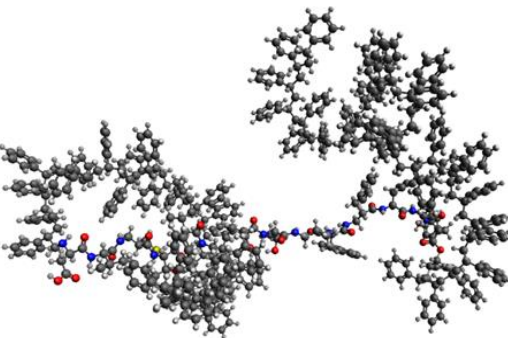
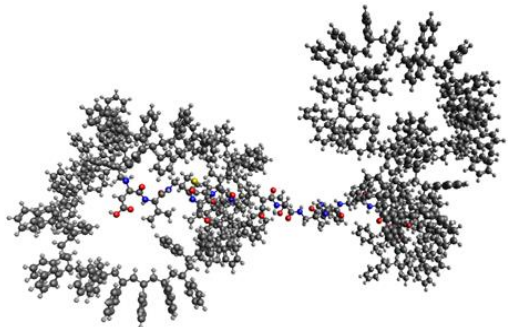
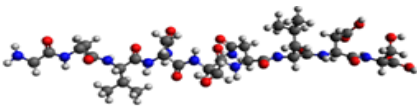
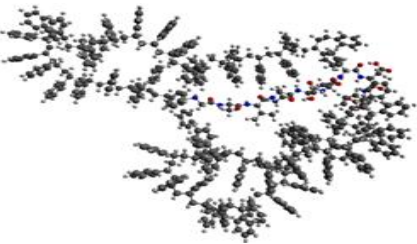
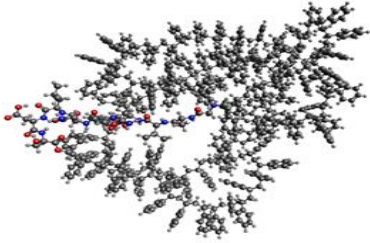
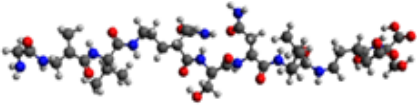
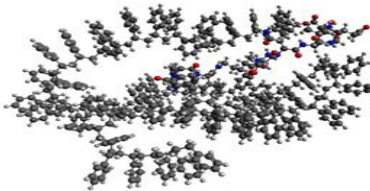
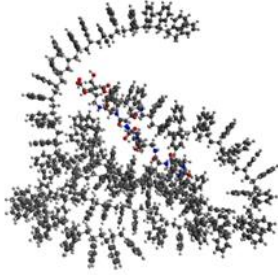
Bio-receptores para 5-HT1A	Diseño en Avogadro	Energía de interacción entre cada bio-receptor y la serotonina (kcal/mol) / Desviación estándar
Bio-receptor 1 5-HT1A (Sitio activo)		$-4,0 \pm 0,0$
Bio-receptor 2 5-HT1A (Sitio activo polimerizado con 30 unidades de estireno)		$-5,4 \pm 0,0$
Bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1A (Sitio activo polimerizado con 50 unidades de estireno)		$-6,7 \pm 0,1$
Bio-receptor 3 5-HT1A (Sitio activo y puentes metilénicos)		$-3,6 \pm 0,0$
Bio-receptor 4 5-HT1A (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 30 unidades de estireno)		$-5,6 \pm 0,0$
Bio-receptor 4.1 rediseño 5-HT1A (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 50 unidades de estireno)		$-5,5 \pm 0,0$

Tabla 5. Energías de interacción promedio entre los bio-receptores diseñados en Avogadro de la proteína SERT y la serotonina.

Bio-receptores para SERT	Diseño en Avogadro	Energía de interacción entre cada bio-receptor y la serotonina (kcal/mol) / Desviación estándar
Bio-receptor 1 SERT (Sitio activo)		$-3,1 \pm 0,0$
Bio-receptor 2 SERT (Sitio activo polimerizado con 30 unidades de estireno)		$-4,7 \pm 0,0$
Bio-receptor 2.1 rediseño SERT (Sitio activo polimerizado con 50 unidades de estireno)		$-6,1 \pm 0,0$
Bioreceptor 3 SERT (Sitio activo y puentes metilénicos)		$-3 \pm 0,0$
Bio-receptor 4 SERT (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 30 unidades de estireno)		$-6,2 \pm 0,0$
Bio-receptor 4.1 rediseño SERT (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 50 unidades de estireno)		$-6,7 \pm 0,0$

En los resultados presentados en las cuatro tablas anteriores, se observó que solamente tres bio-receptores superaron la energía objetivo (tabla 3) (2.1 rediseño 5-HT1A, 4.1 rediseño SERT y 2.1 rediseño 5-HT1E), por ende, fueron seleccionados para continuar en la siguiente etapa, todos estos contaban con polimerizaciones de un valor de 50 unidades de estireno las cuales ayudaron a aumentar el volumen estérico y a limitar

los lugares de interacción del bio-receptor, aumentando así su especificidad por la serotonina como está descrito en la literatura¹⁰, lo que conllevó a obtener las energías de interacciones más altas. Sin embargo, se presenta el bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1A como el de mayor afinidad por la serotonina teniendo en cuenta que superó la energía objetivo en 0,6 kcal/mol.

Tabla 6. Energías de interacción promedio entre los bio-receptores diseñados en Avogadro de la proteína 5-HT1D y la serotonina.

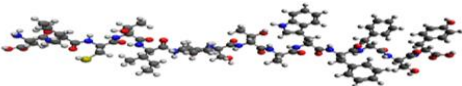
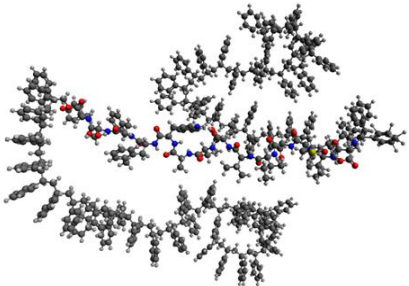
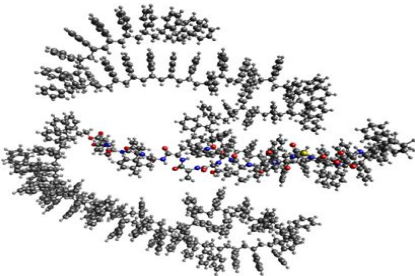
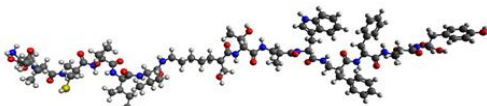
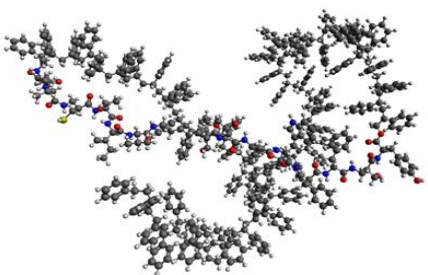
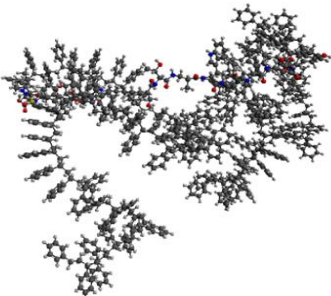
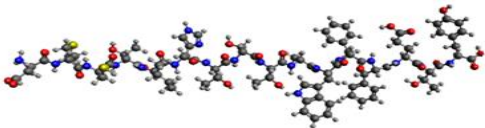
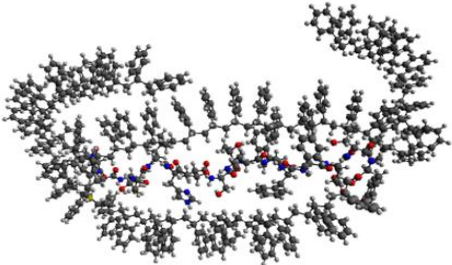
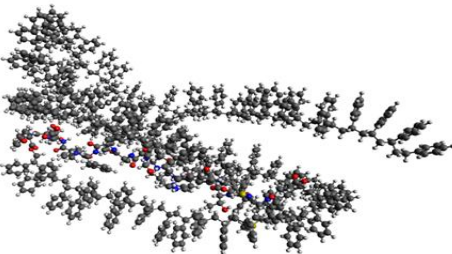
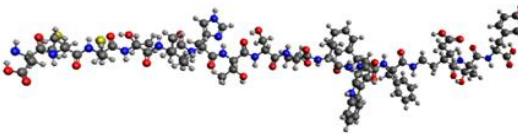
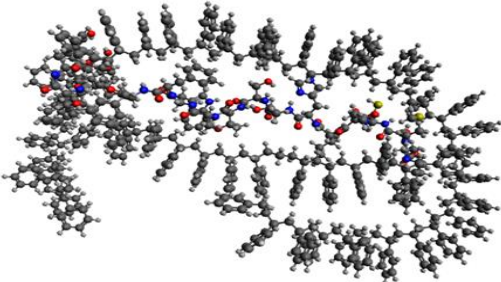
Bio-receptores para 5-HT1D	Diseño en Avogadro	Energía de interacción entre cada bio-receptor y la serotonina (kcal/mol) / Desviación estándar
Bio-receptor 1 5-HT1D (Sitio activo)		$-4,0 \pm 0,0$
Bio-receptor 2 5-HT1D (Sitio activo polimerizado con 30 unidades de estireno)		$-5,7 \pm 0,0$
Bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1D (Sitio activo polimerizado con 50 unidades de estireno)		$-5,4 \pm 0,3$
Bio-receptor 3 5-HT1D (Sitio activo y puentes metilénicos)		$-3,8 \pm 0,0$
Bio-receptor 4 5-HT1D (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 30 unidades de estireno)		$-5,2 \pm 0,0$
Bio-receptor 4.1 rediseño 5-HT1D (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 50 unidades de estireno)		$-4,9 \pm 0,0$

Tabla 7. Energías de interacción promedio entre los bio-receptores diseñados en Avogadro de la proteína 5-HT1E y la serotonina.

Bio-receptores para 5-HT1E	Diseño en Avogadro	Energía de interacción entre cada bio-receptor y la serotonina (kcal/mol) / Desviación estándar
Bio-receptor 1 5-HT1E (Sitio activo)		$-4,8 \pm 0,0$
Bio-receptor 2 5-HT1E (Sitio activo polimerizado con 30 unidades de estireno)		$-5,1 \pm 0,0$
Bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1E (Sitio activo polimerizado con 50 unidades de estireno)		$-6,5 \pm 0,0$
Bio-receptor 3 5-HT1E (Sitio activo y puentes metilénicos)		$-3,6 \pm 0,0$
Bio-receptor 4 5-HT1E (Sitio activo, puentes metilénicos y polimerización con 30 unidades de estireno)		$-5,1 \pm 0,0$

Para finalizar, los demás bio-receptores diseñados, especialmente los compuestos por puentes de metileno no presentaron un patrón asociado al aumento en la energía de interacción por la serotonina. Con el objetivo de corroborar la selectividad de los tres bio-receptores escogidos se decidió evaluar la afinidad entre cada uno de estos por sustratos diferentes a la serotonina. A continuación, se muestran los resultados organizados en la tabla 8.

Con base en la afinidad de unión obtenida, es evidente que los

bio-receptores presentan mayor afinidad por la serotonina que por los demás sustratos, cumpliendo así con el requisito de selectividad propuesto para el bio-receptor. Además, se puede observar que con las demás aminas biógenas los bio-receptores presentan una mayor energía de interacción en comparación con la glucosa y lactato, esto debido a la similitud estructural que hay entre la serotonina y las aminas. Para dar continuación a la elección del mejor bio-receptor, se evaluaron las distancias de los puentes de hidrógeno formados a partir de la interacción

Tabla 8. Evaluación de la afinidad de los bio-receptores por distintos sustratos.

Bio-receptor	Energía de interacción (kcal/mol)					
	Serotonina	Dopamina	Adrenalina	Noradrenalina	Glucosa	Lactato
2.1 rediseño 5-HT1A	-6,7	-5,9	-5,8	-5,4	-3,9	-3,1
4.1 rediseño SERT	-6,7	-6,2	-5,8	-5,7	-4,4	-3,6
2.1 rediseño 5-HT1E	-6,5	-5,8	-5,9	-5,8	-4,5	-4,0

entre la serotonina y las respectivas proteínas descargadas del PDB, a través de una interfaz gráfica que muestra los modelos de interacción calculados, esto se realizó por medio del software Discovery Studio.

La primera proteína analizada fue la 5-HT1A (7E2Y), como se observa en la figura 1, en la interacción de la serotonina y la proteína, se determinaron las distancias de cuatro puentes

de hidrógeno (líneas punteadas amarillas). En cuanto a los aminoácidos involucrados en esta interacción, se encuentra el ácido aspártico en la posición 116 (2,11 Å), la valina en 117 (2,25 Å), la treonina en la 121 (2,12 Å) y la tirosina en la 390 (2,58 Å). Solo fueron analizadas las interacciones presentadas en la imagen dado que eran las más cercanas a la proteína.

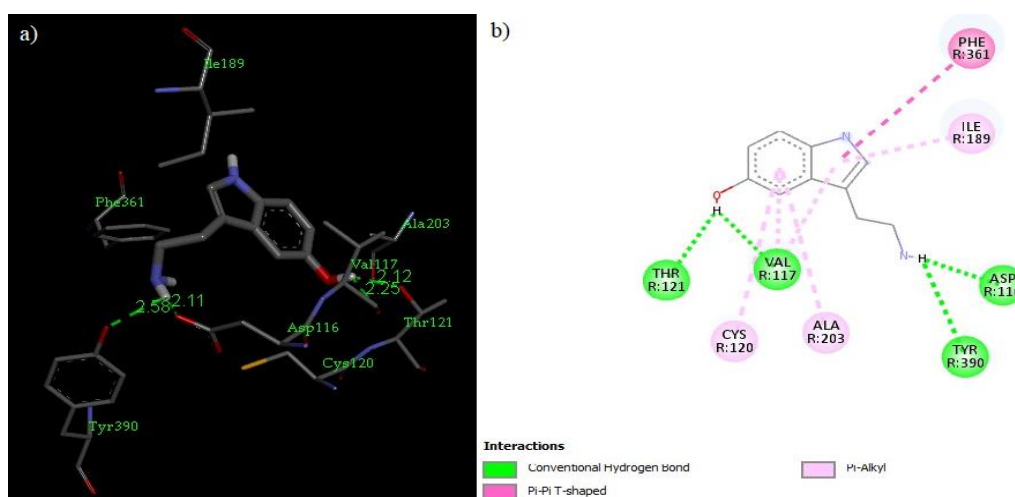


Fig. 1: a) Distancias de interacción 3D entre la serotonina y la proteína descargada PDB 5-HT1A. b) Distancias de interacción 2D entre la serotonina y la proteína descargada PDB 5-HT1A.

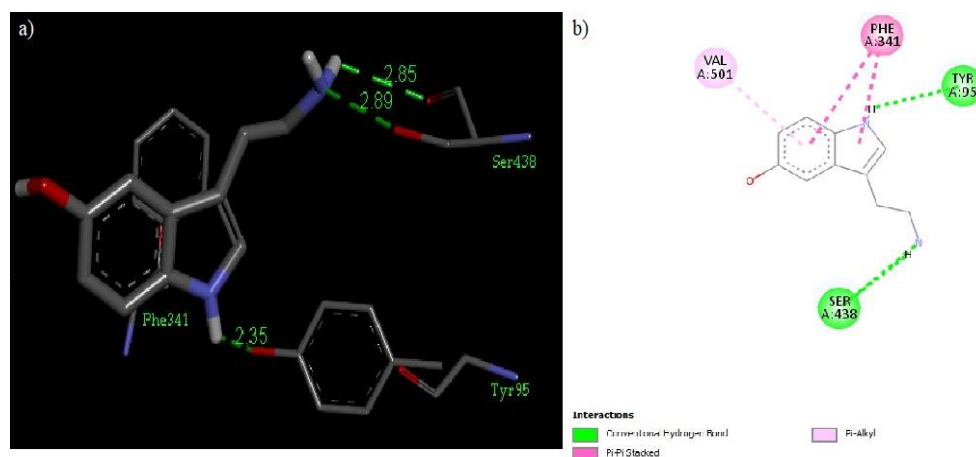


Fig. 2: a) Distancias de interacción 3D entre la serotonina y la proteína descargada por PDB SERT. B) Distancias de interacción 2D entre la serotonina y la proteína descargada por PDB SERT.

La segunda proteína analizada fue SERT (6VRK), como se muestra en la figura 2, se determinaron las distancias de tres puentes de hidrógeno en los cuales se vieron involucrados los

aminoácidos tirosina en la posición 95 (2,35 Å), y dos de serina en la posición 438 (2,89 Å y 2,85 Å respectivamente).

La última proteína analizada fue 5-HT1E (7E33), como se muestra en la figura 3, se determinaron las distancias de un puente de hidrógeno en el cual se vio involucrada la serina en la posición 186 (2,77 Å). Adicionalmente, se presentan otros tres aminoácidos los cuales generan otro tipo de interacciones de Van der Waals, estos son la metionina en la posición 103, la cisteína en la posición 105 y la alanina en la posición 190.

Teniendo en cuenta los aminoácidos presentes en las interacciones entre la serotonina y las proteínas anteriores, se observó su capacidad de aceptar y donar enlaces de hidrógeno. El ácido aspártico es un aminoácido polar que tiene la capacidad de donar tres y aceptar cinco enlaces de hidrógeno¹⁴. Por otro lado, se encuentra la valina como un aminoácido alifático de cadena ramificada y un grupo isopropilo, la cual dona dos y acepta tres

enlaces de hidrógeno¹⁵, la treonina es un aminoácido polar, que al igual que la anterior, dona dos y acepta tres enlaces de hidrógeno¹⁶.

Otros aminoácidos polares involucrados en las interacciones anteriores son la tirosina¹⁷ y la serina, caracterizadas por donar tres y aceptar cuatro enlaces de hidrógeno¹⁸.

Con respecto a los tres bio-receptores seleccionados, se analizó de la misma forma que como se describió para las proteínas anteriores, teniendo como línea de base los resultados obtenidos. Desde la figura 4 hasta la figura 6, se pueden observar las distancias de interacción entre la serotonina y los tres bio-receptores seleccionados.

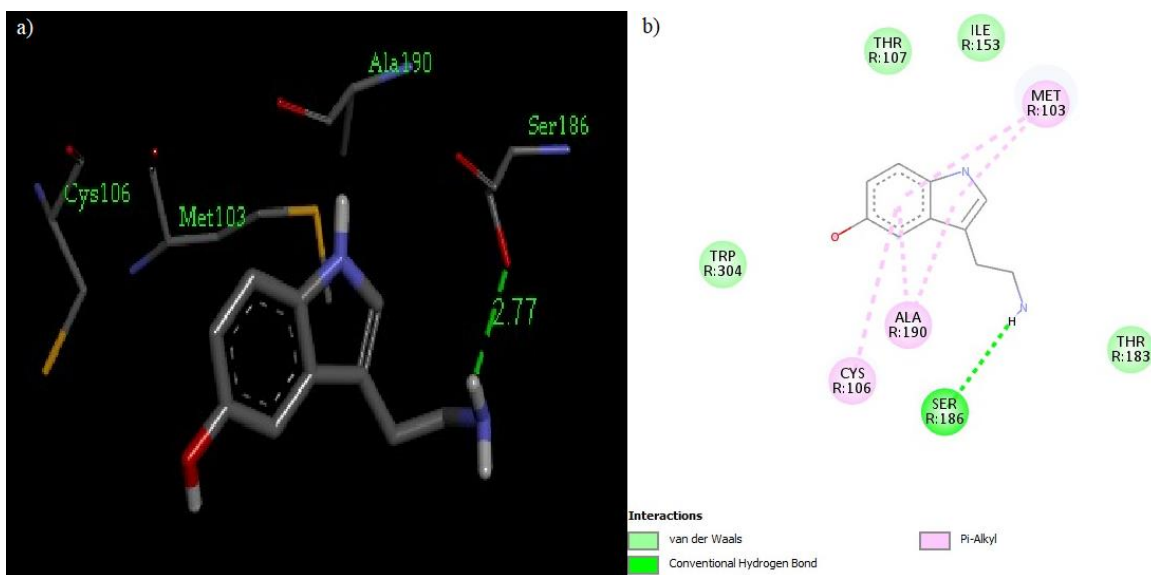


Fig. 3: a) Distancias de interacción 3D entre la serotonina y la proteína descargada PDB 5-HT1E. b) Distancias de interacción 2D entre la serotonina y la proteína descargada PDB 5-HT1E.

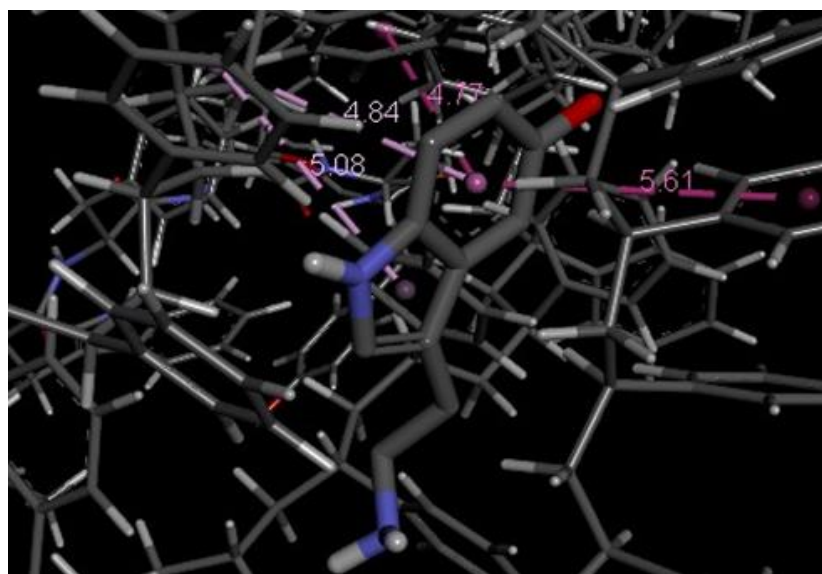


Fig. 4: Distancias de interacción entre la serotonina y el bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1A.

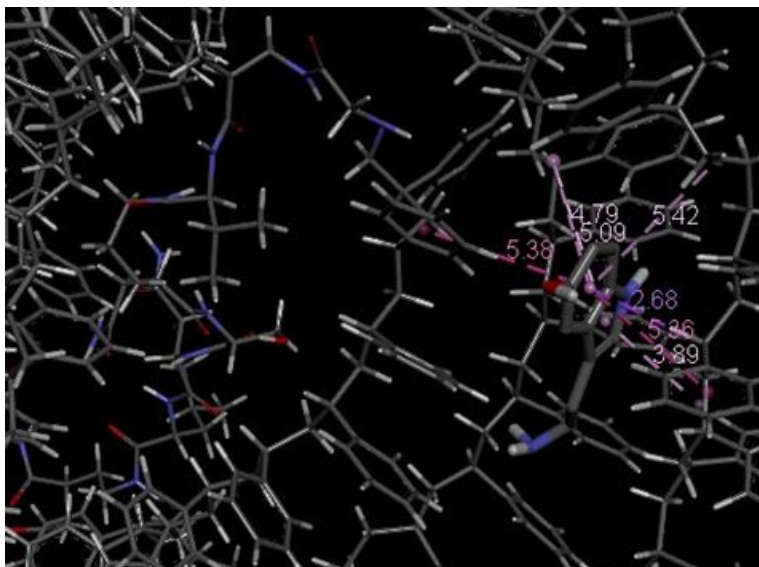


Fig. 5: Distancias de interacción entre la serotonina y el bio-receptor 4.1 rediseño SERT.

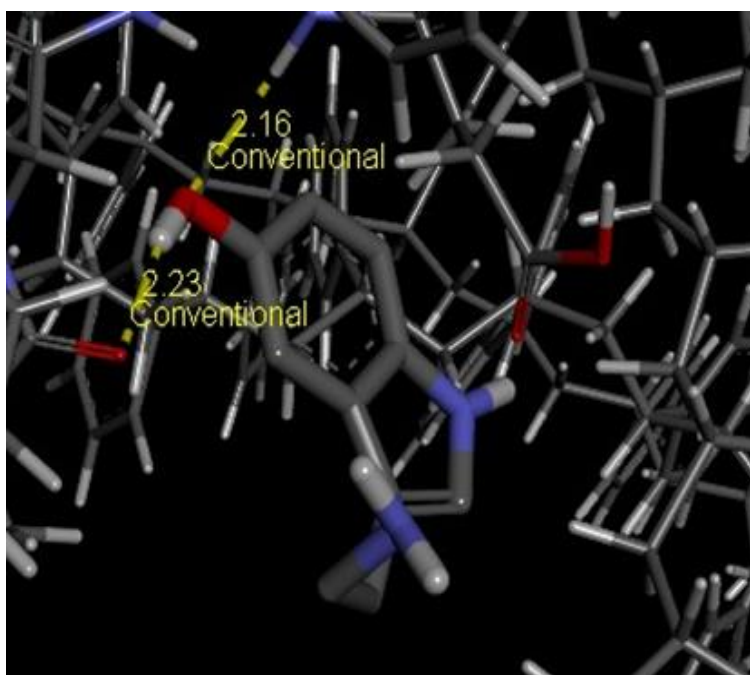


Fig. 6: Distancias de interacción entre la serotonina y el bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1E.

En las figuras 4 y 5, se evidencia que los bio-receptores 2.1 rediseño 5-HT1A y 4.1 rediseño SERT respectivamente, no presentan interacciones de puentes de hidrógeno entre la serotonina y el sitio activo, en comparación con los receptores descargados del PDB (editados en PyMOL), sin embargo, se generaron otro tipo de interacciones con las cadenas de polimerización.

En cuanto al bio-receptor 2.1 rediseño 5-HT1E, observado en la figura 6, se presentan dos puentes de hidrógeno entre la serotonina y dos aminoácidos del sitio activo, con una distancia de 2,23 y 2,16 Å clasificados como donador-receptor fuertes en

su mayoría covalentes¹⁹, indicando una menor distancia con respecto al receptor original teniendo en cuenta su valor de 2,77 Å.

El bio-receptor que se presenta como mejor opción es el 2.1 rediseño 5-HT1E conformado por los aminoácidos del sitio activo y polimerización con 50 unidades de estireno en sus terminales, debido a que cumplió con cada uno de los criterios mencionados anteriormente, obteniendo una energía de interacción por la serotonina de -6,5 kcal/mol, una alta selectividad por cada uno de los sustratos evaluados y distancias de interacción de los puentes de hidrógeno de 2,20 Å en promedio.

Conclusiones

El análisis del sitio activo de las proteínas involucradas en los procesos serotoninérgicos permitió el diseño de bio-receptores peptídicos logrando una energía de interacción que sugiere la mimetización de los receptores naturales 5-HT_{1A}, SERT, 5-HT_{1D} y el 5-HT_{1E}.

En cuanto al diseño de los bio-receptores se observó que los modelos propuestos con polimerizaciones de 50 unidades de estireno presentaron una mayor energía de interacción por la serotonina debido al aumento de su volumen estérico y la limitación de los lugares de interacción. Asimismo, los bio-receptores diseñados, especialmente con puentes de metileno, no presentaron un patrón concluyente en su energía de interacción por la serotonina.

La selección del bio-receptor dejó como mejor bio-receptor *in silico* al 2.1 rediseño 5-HT_{1E} constituido por los aminoácidos del sitio activo y 50 unidades de estireno en sus extremos terminales. En términos estructurales se logró una miniaturización del receptor 5-HT_{1E} el cual cuenta con 365 residuos, mientras que el bio-receptor diseñado dispone de 16 aminoácidos. En cuanto a las interacciones simuladas, se observó un aumento en la energía de interacción por la serotonina, al pasar de -6,1 kcal/mol a -6,5 kcal/mol.

Así mismo, el bio-receptor seleccionado obtuvo distancias de interacción de los puentes de hidrógeno de 2,20 Å en promedio y demostró tener una alta selectividad por la serotonina discriminando los interferentes comunes presentados en el medio como los son la dopamina, adrenalina, noradrenalina, glucosa y lactato. Es importante aclarar que hasta no hacer los ensayos y hallar las constantes de asociación y disociación, continúa siendo una predicción desde la bioinformática.

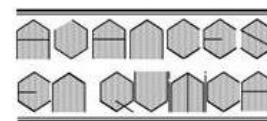
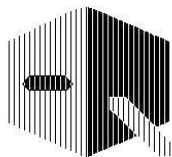
Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación, Colombia, con el proyecto “Diseño de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) por una metodología QSAR. Síntesis enantioselectiva y evaluación de su actividad citotóxica”, Contrato 400-2020.

Referencias

1. L Mohammad, L Moses, S Gwaltney. Serotonin: a review. **Journal Of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, **31**, 187-189 (2008).
2. E Jesulola, P Micalos, I Baguley. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **In Behavioural Brain Research**, **341**, 79-90 (2018).
3. A Athie, J Gómez, J Zárate, M Sanabria, A Diaz, J Correa, et al. Tumores carcinoides gastrointestinales, experiencia en Médica Sur. **Scielo Analytics**, **34**, (2012).

4. I Apetrei, C Apetrei. Amperometric tyrosinase based biosensors for serotonin detection. **Romanian Biotechnological Letters**, **18**, 8253-8262 (2013).
5. J Oni, T Nyokong. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and serotonin on carbon paste electrodes modified with iron (II) phthalocyanine complexes. **Analytica Chimica**, **434**, 9-21 (2001).
6. AB Hernández. Diseño y caracterización de un Bioelectrodo basado en la monoamino oxidasa-A, para la detección de serotonina en un fluido corporal simulado. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias en Neurometabolismo. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México (2018).
7. A Macías, J Hurtado, D Cedeño, F Vite, M Scott, P Vallejo, M Macías, J Santana, M Espinoza, S Ubillús, S Arteaga, O Torres, J Pigüave, L Mera, D Chavarría, K Intrigo. **INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA**. Editorial Área de Innovación y Desarrollo, S.L. Alcoy (2018).
8. I Bazin, S Tria, A Hayat, J Marty. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins. **Biosensors And Bioelectronics**, **87**, 285-298 (2017).
9. G Morris, R Huey, A Olson. Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking. **Current Protocols In Bioinformatics**, **24**, (2008).
10. L Rodriguez Salazar, J Guevara Pulido, A Cifuentes. In Silico Design of a Peptide Receptor for Dopamine Recognition. **Molecules**, **25**, (2020).
11. Y Ishigaki, T Shimajiri, T Takeda, R Katoono, T Suzuki. Longest C-C Single Bond among Neutral Hydrocarbons with a Bond Length beyond 1.8 Å. **Chem**, **4**, 795-806 (2018).
12. E Rand, A P
13. eriyakaruppan, Z Tanaka, D Zhang, M Marsh, R Andrews, et al. A carbon nanofiber-based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. **Biosensors And Bioelectronics**, **42**, 434-438 (2013).
14. D David, A Gardier. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique: application à la réponse antidépressive [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]. **L'Encephale**, **42**, 255-263 (2016).
15. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5960> Consultado: 27/03/2022
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1182> Consultado: 27/03/2022
17. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6288> Consultado: 27/03/2022
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6057> Consultado: 27/03/2022
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5951> Consultado: 27/03/2022
20. GA Jeffrey. An introduction to hydrogen bonding. En: *Topics in Physical Chemistry* - Oxford University Press, Vol. 12, New York (1997).



Manejo integral del formaldehído como residuo peligroso generado en petroquímica: un caso práctico

Carlos M. Morales-Bautista, Quirino Torres-Sauret, Marcia E. Ojeda-Morales, Sugely López-Martínez, Juan G. Álvarez-Ramírez, José R. Laines-Canepa, Carlos E. Lobato-García*

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Cunduacán-Jalpa Km 1
Col. La Esmeralda CP. 86690, Cunduacán, Tabasco, México

(*) carlos.lobato@ujat.mx

Recibido: 06/08/2022

Revisado: 17/08/2022

Aceptado: 29/08/2022

Resumen

Se reporta el manejo integral del formaldehído presente en antiguos tanques de almacenamiento del Complejo Petroquímico Pajaritos, Veracruz, México. Se consideraron aspectos de: muestreo, caracterización y compatibilidad química, así como procedimientos de extracción, trasiego y disposición final. Se encontraron riesgos potenciales por procesos aledaños. Los productos de los estudios de compatibilidad química fueron negativos para autoignición, pero positivos para prueba de chispa con NH_4OH , H_2SO_4 y NaOH a partir de 90°C . El análisis infrarrojo mostró que el residuo es similar al formaldehído patrón. Para el manejo y disposición se considera obligatorio el uso material de seguridad y equipo de detección apropiados.

Palabras claves: manejo y gestión de residuos; residuo industrial tóxico; corrosivo

Abstract

Comprehensive management of formaldehyde as a hazardous waste generated in petrochemicals: a practical case. The comprehensive management of formaldehyde present in old storage tanks of the Pajaritos Petrochemical Complex, Veracruz, Mexico, is reported. Aspects of sampling, characterization and chemical compatibility, as well as extraction, transfer and final disposal procedures were considered. Potential risks were found due to neighboring processes. The products of chemical compatibility studies were negative for autoignition, but positive for the spark test with NH_4OH , H_2SO_4 and NaOH above 90°C . Infrared analysis showed the residue to be like standard formaldehyde. For handling and disposal, the use of appropriate security material and detection equipment is considered mandatory.

Keywords: Waste Management Plan; Toxic and Corrosive Industrial Waste; Corrosive

Introducción

A nivel mundial, diariamente se generan toneladas de residuos que pueden ocasionar efectos negativos en el medio ambiente y, aunque existen diversos reglamentos que coadyuvan a reducirlos, aún existen grandes retos en esta materia^{1,2}. Por ejemplo, en los distintos derrames añejos de hidrocarburos la variabilidad de los componentes es alta, en consecuencia, no existen herramientas específicas para su disposición final y remediar los sitios contaminados^{3,4}. Algunos estudios mencionan que esta variabilidad podría depender de las condiciones ambientales de cada región^{5,6}.

De lo anterior, un caso especial son los derrames de residuos y productos de la industria petrolera, específicamente, porque éstos varían según la fuente de generación y las condiciones a las que son expuestos. Por ejemplo, se ha observado que la concentración y disposición de algunos contaminantes variaban después de su intemperización, encontrándose además que los efectos eran diferentes entre un periodo y otro^{7,8,9}. Algunos reportes mencionan que para reducir estos riesgos, sumado a la concentración del contaminante, las tecnologías a aplicar deben considerar la compatibilidad química y el nivel de toxicidad, así

como el tipo de matriz donde está depositado y las condiciones ambientales a la que fue expuesto^{10,11}.

En México, se han identificado sitios con este tipo de problemas, específicamente en refinerías y activos petroleros que se reactivaron en los últimos años, así como zonas con presencia de derrames relacionados con tomas clandestinas¹². Cabe resaltar que, a pesar de haberse establecido diversas estrategias para la remediación de estas áreas, hasta la fecha la mayoría de la información generada está enfocada en atender derrames de petróleo crudo y combustibles, siendo escasos los estudios de derrames de agua de producción, lodos de perforación y productos secundarios de refinería. Por estas razones, existe la necesidad de crear herramientas específicas que coadyuven en la gestión, evaluación y remediación de sitios contaminados con este tipo de residuos^{13,14}.

En este estudio, se presenta un caso particular dentro del Complejo Petroquímico Pajaritos, ubicado en Veracruz, México^{15,16}. En este lugar, durante los trabajos de restauración y rediseño de las diversas plantas industriales, se generaron varios residuos que formaban parte de infraestructura. Entre ellos, se encontraban diversos tanques de almacenamiento que contenían mate-

riales peligrosos y que estaban sujetos a disposición final. En específico, aquí trataremos de los mecanismos implementados para dos de ellos etiquetados con la leyenda de “formaldehído”, ubicados en la línea de producción de urea, el cual es uno de los procesos más comunes de la industria petroquímica^{17,18}.

Históricamente, en las petroquímicas mexicanas han existido diversos derrames de productos y residuos que han derivado en emergencias ambientales, causando impactos negativos sobre el medio ambiente y la salud; por estas razones, en las instalaciones petroleras se han implementado planes de manejo de sus productos y residuos, pero no se encontraron reportes para formaldehído¹⁹. No obstante, este compuesto es considerado peligroso debido a su bajo punto de ebullición y su incompatibilidad con ácidos y bases fuertes (las cuales son utilizadas dentro de los procesos de tratamiento del hidrocarburo)²⁰, además de ser tóxico y explosivo (al calentarse por encima de los 80-90 °C este compuesto desprende vapores), especialmente en atmósferas confinadas ya que en ellas aumenta el riesgo por contacto e inhalación, a lo que habría que agregarle que, si se presenta calentamiento excesivo, el formaldehído puede descomponerse térmicamente y producir hidrógeno, el cual es altamente explosivo^{21,22}. Lo anterior está especificado en algunas normas mexicanas como la NOM-052-SEMARNAT-2005 y la NOM-018-STPS-2015, así como de otros reglamentos internacionales tales como las regulaciones de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) de los Estados Unidos de Norteamérica, país que tiene relación comercial directa con las petroquímicas mexicanas²³⁻²⁵.

También, algunos reportes especifican que este compuesto posee incompatibilidad química con sustancias corrosivas (generalmente se hidroliza y polimeriza para formar metilenglicol o polioximetileno), así como con aminas, carbonatos, metales alcalinotérreos, peróxidos orgánicos, sulfuros, alifáticos insaturados y agentes oxidantes fuertes^{26,27}; también, se ha reportado que a ciertas temperaturas reacciona consigo mismo para generar paraformaldehído²⁸.

Conforme a las anteriores especificaciones y las actividades dentro de la planta, se identificaron cuatro factores de riesgo^{29,30}: 1) incompatibilidad del residuo con algunos procesos aledaños que empleaban como materia prima HNO₃, NaOH, estireno, amoníaco y urea; 2) explosión e incendios, ya que adyacente al sitio se encuentran calderas, sistemas de enfriamiento, incineradores de residuos y desfogue de la refinería Lázaro Cárdenas, también en este rubro se encuentran los diversos trabajos de mantenimiento de las obras e infraestructura aledañas, en los que se emplean motores a combustión, esmeriles y soldaduras; 3) intoxicación por contacto o inhalación para los trabajadores y 4) derrames y su posible desplazamiento al alcantarillado.

Diseño experimental

Considerando estas circunstancias, se estableció una metodología para el manejo integral del residuo en cuatro pasos: 1) me-

didias de seguridad para la operación; 2) muestreo, caracterización y análisis de compatibilidad química del residuo peligroso (RP); 3) extracción, trasiego y envío a disposición final y 4) determinación de concentración de formaldehído en los tanques vacíos.

Medidas de seguridad

Aunque se conocía la capacidad volumétrica de cada tanque (470 m³), no se tenía certeza sobre la cantidad de residuo dentro de los mismos. Por estas razones, alrededor de la base de cada tanque se colocó una geomembrana de plástico de alta densidad (10 m de diámetro) que contaba con un borde de 0,2 m de alto hecho con el mismo material cuyo fin era contener los posibles derrames. Seguidamente, se colocó una segunda geomembrana de 5 m de radio y a partir del perímetro de la primera, esta contaba con un borde de 0,1 m y su función era contener el material que pudiera escaparse del primer radio de seguridad, además de servir como barrera para el acceso del residuo al alcantarillado. Por último, una tercera membrana de 3 m de diámetro y con borde de 0,1 m, fue colocada como área de seguridad para el trasiego de material, trabajos de armado de ductos y apertura de bridas.

Es importante mencionar que todas las membranas contaban con una pendiente dirigida hacia un tanque cisterna acoplado con una bomba de alto vacío para que, en el caso de un eventual derrame, se contara con un mecanismo para la recolección del residuo. Además, cada membrana representaba radios de seguridad según los niveles de exposición y contacto.

Con base en estos radios, las infraestructuras adyacentes, caminos de acceso y la dirección del viento, se diseñó un diagrama de operación, estaciones de trabajo y rutas de evacuación, el cual se presenta en la figura 1^{20,31}.

En términos de operación, el primer radio se destinó para el personal capacitado y encargado para el manejo del residuo. En el segundo radio, se ubicó al personal de ayudantía para el manejo de la plataforma elevada, el acceso a los tanques, control de fugas en mangueras y bridas, extinguidores y rociadores de agua manuales. En el tercer perímetro, se ubicaron los operadores de los camiones cisterna con el equipo de bombeo, repuestos de respiradores autónomos, equipo de primeros auxilios, los contenedores IBC (*Intermediate Bulk Container*, por sus siglas en inglés), también aquí se ubicó el personal de seguridad que vigilaba la dirección del viento y el encargado de las alarmas de accidentes e incendios³².

En materia de seguridad en el trabajo, todo el personal dentro de los radios de seguridad contaba con Equipo de Protección Personal (EPP, por sus siglas en español), el cual constaba de Equipo de Respiración Autónoma (ERA, por sus siglas en español) acoplada con un respirador 3M 6800, Equipo de Seguridad para Trabajos Verticales, vestimenta para el manejo de sustancias peligrosas Tipo 1, así como un detector portátil de gases explosivos (Gasman N) y uno de formaldehído (PCE-HFX205 LD > 10 mg/L). El EPP para el personal fuera de los

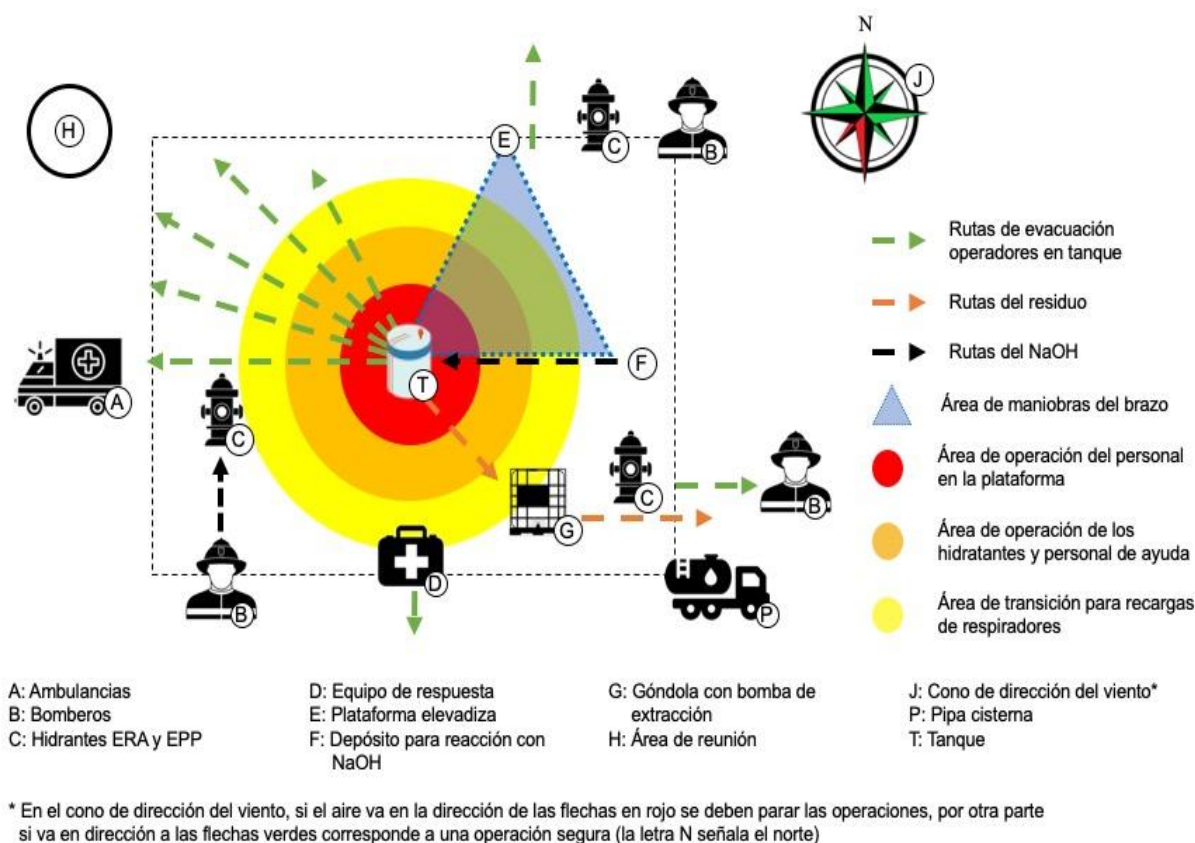


Fig. 1: Diagrama de operaciones para disposición de formaldehído en tanques.

radios de seguridad fueron vestimenta Tipo 2, guantes y botas de nitrilo, mascarilla con doble filtro (3 M 6000 y 6075, respectivamente) y gafas protectoras de policarbonato (SAFEYEAR SG007c). Cabe mencionar que, aunque este personal también portaba ERA, estos estaban desactivados, previéndose su uso solo cuando la alarma de dirección de viento o de derrames así lo indicaran³³⁻³⁵.

Muestreo, caracterización y análisis de compatibilidad química del residuo

Debido a los riesgos asociados, el muestreo se realizó por la noche y se suspendió toda operación en la planta (en el turno nocturno se registró menor temperatura y las actividades son menores con respecto al diurno). Primero, en la plataforma, dos operarios fueron colocados en la parte superior de los contenedores (acompañados de hidratante y extinguidor clase B); apoyados con herramientas, retiraron una brida del domo, en este punto, el detector de formaldehído se activó dentro de los dos primeros perímetros de seguridad; en el caso de gases explosivos, no se obtuvieron lecturas dentro del límite de detección del equipo.

Para la toma de muestra, se introdujo la barrena y se tomaron muestras al azar con respecto al diámetro y a la altura, el residuo obtenido fue depositado en un recipiente de plástico de 20 L, este se homogeneizó con la misma barrena y se construyó una muestra compuesta (por triplicado y por cada tanque), la cual

se preservó en un recipiente de vidrio color ámbar de 1 L. Las muestras se etiquetaron y conservaron en frío para finalmente enviarlas al laboratorio para su análisis²⁰.

Para identificar el formaldehído, las muestras problemáticas fueron analizadas mediante la técnica de infrarrojo con transformada de Fourier (1 g de muestra diluida en 1 mL de diclorometano, equipo Biocompare IRAffinity-1S FTIR Shimadzu), este mismo procedimiento se llevó a cabo tomando como patrón de referencia al formaldehído grado reactivo (Baker, 50-00-00, estabilizado con metanol 15%); las señales en el infrarrojo de todas las muestras se compararon entre sí para estimar diferencias entre patrón y muestras problema^{36,37}.

Posteriormente, se determinaron la peligrosidad y condiciones de manejo, con la finalidad de estimar los riesgos de operación. Para ello, se tomaron alícuotas del residuo (5 g) y se pasaron a sendos tubos de ensayo para realizar por triplicado los ensayos que se describen a continuación^{20,38,39}.

1. Ensayo directo a la ignición: el tubo de ensayo con la muestra problema se sometió a un calentamiento en rampas de 5 °C cada 2 min, partiendo de 15 °C hasta 100 °C, se verificó la presencia de autoignición y si ésta no ocurría, en cada cambio de temperatura se colocaba una chispa eléctrica a la boca del tubo de ensayo para observar si se producía reacción.

2. Reactividad con hidróxido de amonio y ensayo a la ignición: al tubo de ensayo con la muestra problema se añadió 1 mL de una disolución acuosa de NH_4OH (28% Baker 1336-21-6), se observó si existían cambios en la mezcla, para posteriormente proceder al ensayo a la ignición como se describe en el paso 1.
3. Reactividad con ácido sulfúrico y ensayo a la ignición: se agregó 1 mL de H_2SO_4 (98% Baker 7664-93-9) al tubo de ensayo con la muestra problema y se observó si existían cambios en la mezcla de reacción y se procedió al ensayo a la ignición como se describe en el paso 1.
4. Reactividad con NaOH y ensayo a la ignición: se agregaron 0,1 g de NaOH (98% en perlas Baker 1310-73-2) sobre la muestra problema contenida en el tubo de ensayo y se observó si existían cambios en la mezcla de reacción, posteriormente se procedió al ensayo a la ignición como se describe en el paso 1.

Cabe señalar que todas estas pruebas también se realizaron con el formaldehído grado reactivo como referencia.

Extracción, trasiego y disposición final del residuo peligroso

Para la extracción del RP de cada tanque se empleó un camión cisterna equipado con una bomba de alto vacío (NOM-010-SCT2-2009); el sistema incluyó mangueras anticorrosivas, así como una plataforma elevadiza para los trabajos de acceso y control⁴⁰. Para iniciar el proceso, dos operarios colocados en la plataforma ingresaban la manguera conectada a la bomba, ésta era encendida y succionaba el RP redirigiéndolo hacia la cisterna, es importante mencionar que, por debajo del camión, también fue colocada una membrana plástica de alta densidad con los bordes de 25 cm como medida de prevención en caso de derrames⁴¹.

Una de las problemáticas que se encontró al extraer el residuo, fue que en el fondo del tanque el RP se encontraba en estado semisólido (posiblemente paraformaldehído), por lo que se calentó 1 m³ de agua a 50 °C en un IBC y se recirculó al tanque. Con esta medida, inicialmente fue posible extraer entre 7 y 10 m³ de RP por cada ciclo; sin embargo, conforme avanzaba el proceso se recuperaba cada vez menos RP, por lo que se planteó realizar una reacción que permitiera la disgregación del sólido revirtiendo la polimerización del formaldehído mediante tratamiento alcalino³⁹.

Para determinar la concentración adecuada de álcali para la disgregación del sólido, se tomó como base el ensayo de compatibilidad química número 4 descrito previamente ya que con esta prueba se observó la disolución del RP. El ensayo consistió en reacciones directas del RP (10 g) con disoluciones acuosas (1 mL) de NaOH al 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0% y 3,5% con agitación mecánica y se observó si ocurría la disolución del sólido (cada prueba se realizó por triplicado).

Los resultados de la prueba de álcali mostraron que la disolución de NaOH al 2,5 % generó una mayor solubilización, pero

con reacción exotérmica con el RP y temperatura de 60-70 °C. Debido a que en el ensayo de compatibilidad 4 se encontró que, si la temperatura se elevaba más allá de los 80 °C, la prueba de ignición con chispa era positiva, se decidió no trabajar con motores de combustión interna dentro de los perímetros de seguridad, desplazando el carro cisterna fuera de estos^{31,38}.

A partir de lo anterior, se preparó 1 m³ de disolución acuosa de NaOH al 2,5 % en un recipiente IBC siguiendo las medidas de seguridad referidas en la NOM-007-SCT2-2010⁴², esta disolución se bombeó y recirculó varias veces hasta observar la disolución completa del RP generando una mezcla líquida homogénea de color marrón la cual se bombeó hacia el carro cisterna. En los procesos de adición de la disolución de NaOH al tanque y del tanque al camión cisterna, se cuidó de no exceder una temperatura mayor a los 70 °C, así como la vigilancia de emisión de gases explosivos y de formaldehído en aire, la cual resultó en ambos casos negativa.

El manifiesto de transporte y seguridad fue realizado con base en la NOM-002-SCT2/2011 en lo referente a la disposición de RP como mezcla de alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos⁴³ y las recomendaciones de seguridad referidas descritas en la literatura⁴², el transporte e incineración la realizó un particular autorizado con base en la NOM-098-SEMARNAT-2002 y la NOM-028-SCT2-2010^{44,45}.

Determinación de la concentración de formaldehído en los tanques vacíos

Los tanques vacíos fueron tratados con lavado de 0,5 m³ de agua adicionada con 5% de dispersante de espuma empleando una unidad de lavado de alta presión, según lo refiere la norma NOM-019-SCT2-2015⁴⁶ y adoptando las medidas de seguridad pertinentes^{47,48}; después del lavado, se tomaron muestras de agua residual (1 L, n = 3) para cuantificar la concentración de formaldehído.

La detección de formaldehído en el agua se realizó por cromatografía de líquidos con detector UV-Vis (10 μL de muestra, 70 °C, 360 nm), disolvente A: H_2O (4 mg del RP/mL agua ultrapura), disolvente B: Acetonitrilo (500 mg de RP/mL de acetonitrilo, columna analítica Agilent Zorbax XDB-C18, modo isocrático (equipo Agilent Serio 1200 con límite de detección (LD) = 0,0341 $\mu\text{g/mL}$). Se utilizó como estándar una mezcla acuosa con concentraciones conocidas de los siguientes aldehídos: formaldehído (15 mg/mL), acetaldehído (15 mg/mL), butanal (15 mg/mL) y hexanal (15 mg/mL), dicho estándar fue analizado en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras problemas, la cuantificación se realizó por triplicado^{49,50}.

Resultados y discusión

Identificación de componentes en el residuo

El análisis cualitativo por FTIR indica que todas las muestras presentan espectros de infrarrojos similares (figura 2). Por ejemplo, presentan bandas de tensión simétricas en 2980 cm^{-1} y

asimétricas en 2910 cm^{-1} y de flexión a 1270 cm^{-1} y 1427 cm^{-1} ; en todos los casos, estas señales han sido asociadas al grupo H-C-H. Así mismo, se observó una banda ancha entre 3371 y 3392 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de tensión del enlace O-H del alcohol^{36,37}.

Es importante resaltar que la banda de tensión del grupo carbonilo se encontró desplazada a números de onda menores al intervalo donde se encuentran generalmente las bandas de absorción del grupo aldehído (por arriba de 1700 cm^{-1})^{36,37}. Tanto en el espectro del estándar como en los de las muestras problemas, esta banda se encontró en 1637 cm^{-1} , este efecto de desplazamiento se atribuye a la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares entre el formaldehído y el alcohol⁵¹.

Con respecto a este tema, la hoja de seguridad del formaldehído patrón empleado, menciona en su composición la presencia de alcohol como estabilizante y agua como diluyente (37-38% de

pureza, estabilizado con metanol 10-15%)⁵². Por otro lado, para el caso de los residuos analizados, la preparación se realizó a partir del sólido blanco encontrado en el fondo de los tanques, el cual se diluyó con agua. Dada la polaridad de los sistemas empleados para el registro de los espectros de FTIR, el desplazamiento encontrado en la banda de absorción del carbonilo puede ser explicado por las interacciones tipo puente de hidrógeno que experimenta el formaldehído en sistemas polares⁵¹. Por último, la presencia de bandas en la región de 1000 cm^{-1} , que se atribuyen a vibraciones del enlace C-O^{36,37}, son consistentes con la presencia de metanol en el patrón de referencia y en el caso de la muestra proveniente de los tanques, es posible considerar que parte del formaldehído haya polimerizado a paraformaldehído, por lo que se permitió establecer la hipótesis de que los residuos presentes eran una mezcla de formaldehído, paraformaldehído, alcohol y agua^{28,53,54}.

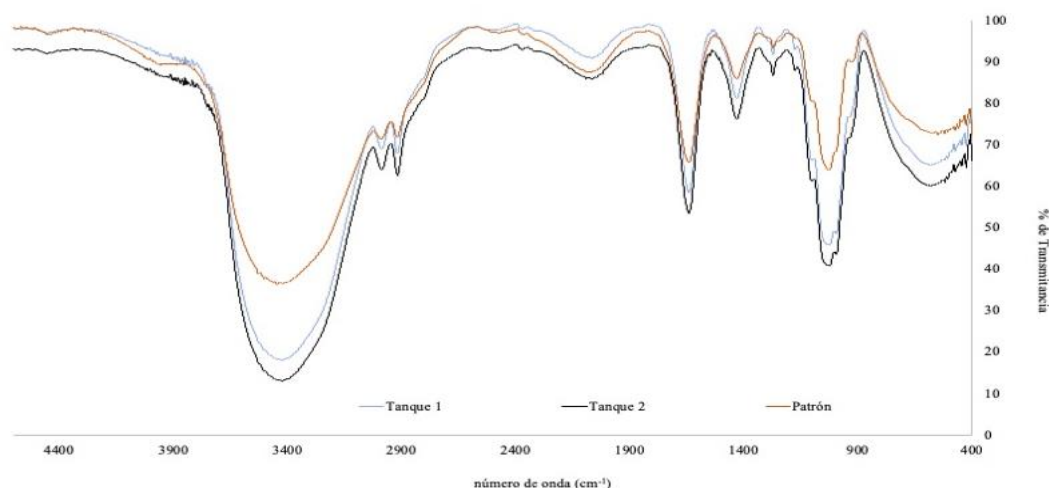


Fig. 2: Espectros de FTIR de las muestras tomadas en los tanques 1 y 2 comparadas contra el formaldehído grado reactivo (patrón).

Tabla 1. Prueba de ignición a diferentes temperaturas para las muestras de los tanques y sus productos de reacción.

	Temperatura (°C)																
	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	
1) Ensayo directo a la ignición																	
T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
R	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
2) Reactividad con NH ₄ OH y prueba a la ignición																	
T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
R	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
3) Reactividad con H ₂ SO ₄ y prueba a la ignición																	
T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
R	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
4) Reactividad con NaOH y prueba a la ignición																	
T1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
T2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
R	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	

T1 y T2 representan los tanques 1 y 2, respectivamente; R es la referencia (formaldehído grado reactivo). En las pruebas N es negativo, P es positivo para ignición por inducción con chispa eléctrica.

En materia de residuos peligrosos, las Normas Oficiales Mexicanas NOM-052-SEMARNAT-2005 y NOM-054-SEMARNAT-1993^{20,55}, enlistan al formaldehído y el paraformaldehído como tóxicos (T), inflamables (I) y reactivos (R). Debido a lo anterior, se procedió a realizar los ensayos de reactividad e inflamabilidad descritos en la metodología para estimar los riesgos de operación.

Pruebas de compatibilidad química

Los resultados de los ensayos de compatibilidad química e ignición realizadas a las muestras de los tanques 1 y 2 (T1 y T2, respectivamente), indican que éstas presentan comportamientos similares con la de referencia (R) ya que todas presentan reacciones negativas en la autoignición y, a partir de 90 °C, todas son positivas para las pruebas de las reacciones con NH₄OH (P2), H₂SO₄ (P3) y NaOH (P4) (ver tabla 1).

Al no encontrarse autoignición en las pruebas realizadas, se coincide con lo reportado con la literatura, la cual menciona que este proceso ocurre a partir de los 430 °C para el formaldehído en 37% alcohol^{52,53}. Por otro lado, la norma mexicana en materia de residuos indica incompatibilidad del formaldehído con NH₄OH, H₂SO₄ y NaOH^{20,38,29}, cuyos productos esperados son CO₂ y H₂O, por lo que se plantea la hipótesis de que podría haber formaldehído remanente que no ha reaccionado y, que debido a su punto de inflamabilidad (50 °C), podría ocasionar que la prueba de chispa sea positiva^{27,28}.

Además, aunque ya se habían establecido áreas de seguridad, condiciones de operación y tipo de vestimenta para realizar los trabajos de extracción del RP, con base en las características de formaldehído, los resultados de compatibilidad química permitieron marcar como margen de operación una temperatura máxima de 90 °C. En este sentido, los reportes de la Comisión Nacional del Agua, mencionan que en el Complejo Petroquímico Pajaritos, la temperatura promedio máxima al exterior de 39 °C, pero en algunos lugares con baja cobertura vegetal se han registrados hasta 50 °C⁵⁶. No obstante, la infraestructura de la planta (concreto, metal) y los procesos aledaños sumado a la radiación solar, podrían provocar aumentos de temperatura más allá de los valores reportados, por estas razones se agregaron detectores de temperatura a los equipos de seguridad de los operadores⁵⁷.

Además, los detectores de formaldehído solo presentaron lectura hasta el segundo radio de seguridad (15 m), por estas razones se realizó un monitoreo con estos equipos en un radio de 500 m posterior al radio mencionado y según la dirección el viento y, en todos los casos, no se detectó presencia del residuo. Algunos reportes señalan la capacidad de difusión del formaldehído y que podría representar menor riesgo, no obstante, otros autores mencionan que en concentraciones por debajo del límite de detección (LD) de equipos de campo, se generan irritaciones en garganta, por lo que se mantiene el uso obligatorio de mascarillas en los primeros dos radios de seguridad^{20,58-60}.

Debido a lo anterior, se optó por agregar un anemoscopio como indicador de la dirección del viento hacia el personal fuera de los radios de seguridad, para que en función de la dirección del viento se hiciera obligatorio del ERA en las estaciones de trabajo. Además, se optó por trabajar en el turno nocturno por las menores temperaturas, menos actividad en la planta y menor presencia de personal. También se consideró la restricción de maquinaria de combustión interna y de lámparas incandescentes dentro de los tres radios de seguridad. En el caso del agregado de la solución oxidante, se hidrataba constantemente la superficie del tanque y se supervisaba que la temperatura no rebasara los 90 °C^{61,62}.

Caracterización del agua de lavado de los tanques

Según los resultados de los análisis realizados al agua residual después de cada lavado de los tanques, se observó que la muestra testigo difiere en diversos componentes de las muestras problemas ya que en estas últimas tanto acetaldehído como butanal o hexanal están por debajo del LD (ver tabla 2).

También se observó que las concentraciones del formaldehído presente en el agua residual van disminuyendo después de cada lavado, de tal modo que de valores iniciales de 11,2 y 17 mg/L llegan hasta 0,7 y 0,5 mg/L (en T1 y T2, respectivamente).

En materia de residuos, la normativa mexicana señala las condiciones de transporte y de disposición final para cada uno de ellos, debido a los resultados presentados en el FTIR y en la cromatografía, para ambas operaciones el residuo de los tanques y el agua residual de lavado se etiquetaron como mez-

Tabla 2. Concentraciones encontradas en agua residual de los tanques T1 y T2

Compuesto	TR (min)	Concentración de Formaldehído (mg/L)								
		T	L1T1	L2T1	L3T1	L4T1	L1T2	L2T2	L3T2	L4T1
Formaldehído	6,1	55 ± 0,59	11,2 ± 0,010	2,1 ± 0,012	1 ± 0,01	0,7 ± 0,002	17 ± 0,01	3 ± 0,02	1,1 ± 0,01	0,5 ± 0,002
Acetaldehído	7,8	37 ± 0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Butanal	16,1	5,1 ± 0,02	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Hexanal	25,7	1 ± 0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

TR es tiempo de lavado; T es testigo; LD es límite de detección y L1, L2, L3 y L4 son el número de lavados. Se presenta el promedio de la concentración ± desviación estándar de tres determinaciones.

cla de formaldehídos según lo refieren la NOM-098-SEMAR NAT-2002 y la NOM-028-SCT2-2010^{44,45}. Además, debido a que otros reglamentos como la NOM-52-SEMARNAT-2005²⁰ indican que cualquier material que tenga contacto con un residuo peligroso también debe ser considerado como tal, los tanques deben de disponerse como un RP, por lo que deben establecerse medidas de manejo de estos para reducir los riesgos de trabajo y para el medio ambiente⁵⁸⁻⁶⁰.

En este sentido, para medir la toxicidad del formaldehído existen varios reglamentos, cuyas concentraciones varían, en México la NOM-201-SSA1-2002 considera que el **límite máximo permitido (LMP)** es de 0,9 mg·L⁻¹ de formaldehído en hielo de uso industrial⁶³. Considerando este valor, el cuarto lavado (1 m³ de agua) ya cumple con este parámetro. No obstante, otros reportes encontraron toxicidad aguda en concentraciones por encima de 0,58 mg·L⁻¹ en aire; si bien, esto no representa un riesgo para los trabajadores ya que estos mantienen el uso de los EPP y ERA, las posibles descargas al alcantarillado podrían tener consecuencias, por lo se recomienda colocar un método de extracción que dirija el residuo hacia la cisterna^{61,62}.

Conclusiones

Se estableció un procedimiento para la gestión integral de un residuo industrial potencialmente peligroso (formaldehído), presente en tanques de almacenamiento del Complejo Petroquímico Pajaritos en Veracruz, México. Dentro del procedimiento, se consideraron: medidas de seguridad para la operación, muestreo, caracterización y compatibilidad química del residuo peligroso; manipulación del residuo para disposición final y por último la determinación del formaldehído residual en los tanques vacíos. Las pruebas de identificación y compatibilidad química del residuo mostraron que se encuentra presente formaldehído dentro de la composición del mismo, lo que llevó a proponer esquemas de trabajo y manipulación acordes con los riesgos asociados a éste. El agua de lavados de tanques mostró también la presencia de formaldehído residual, lo que implica la necesidad de establecer métodos de extracción que dirijan las aguas de lavado hacia cisternas de tratamiento, además de que los tanques deben ser considerados también como residuos peligrosos en su manejo y disposición.

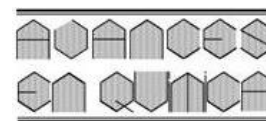
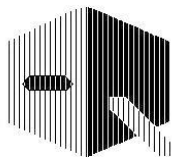
Referencias

1. J Zhao, L Huang, DH Lee, Q Peng. Improved approaches to the network design problem in regional hazardous waste management systems. **Transportation Research Part E: Logistics and Transportation Review**, **88**, 52-75 (2016).
2. IMSK Ilankoon, Y Ghorbani, MN Chong, G Herath, T Moyo, J Petersen. E-waste in the international context—A review of trade flows, regulations, hazards, waste management strategies and technologies for value recovery. **Waste Management**, **82**, 258-275 (2018).

3. RM Laino-Guanes, R Bello-Mendoza, M González-Espinosa, N Ramírez-Marcial, F Jiménez-Otárola, K Musálem-Castillejos. Concentración de metales en agua y sedimentos de la cuenca alta del río Grijalva, frontera México-Guatemala. **Tecnología y Ciencias del Agua**, **6(4)**, 61-74 (2015).
4. VE Akpan, DO Olukanni. Hazardous waste management: an African overview. **Recycling**, **5(3)**, 15 (2020).
5. EE Cordes, DOB Jones, TA Schlacher, DJ Amon, AF Bernardino, S Brooke, R Carney, *et al.* Environmental impacts of the deep-water oil and gas industry: a review to guide management strategies. **Front. Environ. Sci.**, **4**, 58 (2016).
6. K Sam, F Coulon, G Prpich. Management of petroleum hydrocarbon contaminated sites in Nigeria: Current challenges and future direction. **Land Use Policy**, **64**, 133-144 (2017).
7. S Jafarinejad, Sc Jiang. Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters. **J. Environmental Chemical Engineering**, **7(5)**, 103326 (2019).
8. D Vázquez-Luna, E Hernández-Acosta, J Zavala-Cruz, M Vázquez-Luna, DA Lara-Rodríguez. Risk Indicators for Agricultural Use in Oil-contaminated Soils. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, **36(4)**, 813-824 (2020).
9. AY Gómez-Mellado, CM Morales-Bautista, IM De la Garza-Rodríguez, SA Torres-Sánchez, I Sánchez-Lombardo. Evaluation of two remediation techniques applied to a site impacted by petroleum production waters. **Terra Latinoamericana**, **38(1)**, 77-89 (2020).
10. S Jafarinejad. Petroleum waste treatment and pollution control. Elsevier: Butterworth-Heinemann. Oxford (2016).
11. C Hein. "Old Refineries Rarely Die": Port City Refineries as Key Nodes in The Global Petroleumscape. **Canadian Journal of History**, **53(3)**, 450-479 (2018).
12. R González-López, M Giampietro. Relational analysis of the oil and gas sector of Mexico: Implications for Mexico's energy reform. **Energy**, **154**, 403-414 (2018).
13. I Alpizar-Castro, C Rodríguez-Monroy. Review of Mexico's energy reform in 2013: Background, analysis of the reform and reactions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **58**, 725-736 (2016).
14. F Castro-Alvarez, P Marsters, DP Ponce de León-Barido, DM Kammen. Sustainability lessons from shale development in the United States for Mexico and other emerging unconventional oil and gas developers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **82(1)**, 1320-1332 (2018).
15. LI Ruiz-Flores, R Castellanos-Bustamante, JG Calderon-Guizar. Operational Reliability and Modernization of Refineries in Mexico: How?, Why? and Where? En: *Conference Proceedings: ASME Power Conference* (2016). <https://doi.org/10.1115/POWER2016-59146>
16. SH Baker. Mexican energy reform, climate change, and energy justice in indigenous communities. **Natural Resources Journal**, **56 (2)**, 369-390 (2016).

17. A Duhalt. The Urea Value Chain in Mexico: From Natural Gas Supply to Imports of Basic Food Staples. James A. Baker III Institute for Public Policy of Rice University. Issue Brief 09.28.18. Rice University. Houston (2018).
18. JG Speight. Refinery Feedstocks. CRC Press. Boca Ratón (2020). <https://doi.org/10.1201/9780429398285>
19. HM Aquino-Gaspar, CO Díaz-Ovalle, A López-Molina, C Conde-Mejía, LM Valenzuela-Gómez. Incident analysis of the "Pajaritos" petrochemical complex. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, **70**, 104404 (2021).
20. H Reingruber, LB Pontel. Formaldehyde metabolism and its impact on human health. **Current Opinion in Toxicology**, **9**, 28-34 (2018).
21. CM Tseng, M Fushitani, A Matsuda, A Hishikawa. Coincidence momentum imaging of four-and three-body Coulomb explosion of formaldehyde in ultrashort intense laser fields. **J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, **228**, 25-30 (2018).
22. S Nader, F Guzman, R Becar, C Segovia, C Fuentealba, M Peirera, *et al.* Lignocellulosic Micro and Nanofibrillated Cellulose Produced by Steam Explosion for Wood Adhesive Formulations. **J. Renewable Materials**, **10**(2), 263 (2022).
23. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. SEMARNAT. México (2005). http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/2006/052_semarnat.pdf
24. Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS). Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015. Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. STPS. México (2015). <https://www.ilo.org/dyn/natlex/docs/ELECTRONIC/101271/121935/F299513823/NOM-018-STPS-2015.pdf>.
25. Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Occupational Safety and Health Standards. Toxic and Hazardous Substances. Formaldehyde (Standards-eCFR). 1910.1048. OSHA. Estados Unidos de América (2022). <https://www.osha.gov/laws-regs/regulations/standardnumber/1910/1910.1048>
26. L Shuai, MT Amiri, YM Questell-Santiago, F Héroguel, Y Li, H Kim, *et al.* Formaldehyde stabilization facilitates lignin monomer production during biomass depolymerization. **Science**, **354**(6310), 329-333 (2016).
27. CJ Na, MJ Yoo, DC Tsang, HW Kim, KH Kim. High-performance materials for effective sorptive removal of formaldehyde in air. **Journal of Hazardous Materials**, **366**, 452-465 (2019).
28. CJ Johnston, TR Nielsen T.R., J Toftum. Comparing predictions by existing explicit emission models to real world observations of formaldehyde emissions from solid materials. **Build. Simul.**, **13**(1), 185-195 (2020).
29. M Santiago. Oil and Environment in Mexico. En: *Oxford Research Encyclopedia of Latin American History*. Eds. LR Derby, B. Elsey y G. Palacios. Oxford University Press (2016). <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199366439.013.319>
30. CS Hsu, PR Robinson. Petroleum Processing and Refineries. En: *Petroleum Science and Technology*. Eds CS Hsu y PR Robinson. Part 3. Springer Nature. (2019). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16275-7>
31. A Mendoza-Cantú, IAR Ize-Lema (2017). Las sustancias químicas en México. Perspectivas para un manejo adecuado. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, **33**(4), 719-745.
32. W Hogland, J Stenis. Assessment and system analysis of industrial waste management. **Waste Management** **20**, 537-543 (2000).
33. Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS). Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008. Equipo de protección personal-Selección, uso y manejo en los centros de trabajo. STPS (2008). https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5072773&fecha=09/12/2008#gsc.tab=0
34. A García, G Neaves, J Solís, J Ángel J. Estudio para determinar el uso del equipo de protección personal de acuerdo a la NOM-017-STPS-2008. Ciencias Administrativas y Sociales Hand-book T-II. En: *Memorias del Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos. Valle de Santiago, Guanajuato*. 2013: 24-36. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4785106>
35. A Oviedo. Compendio de Normas de Organización: Seguridad Industrial. Editorial E-duca, México (2018).
36. E Pretsch, P Bühlmann, M Badertscher. Structure Determination of Organic Compounds 4th. Edition. Berlin: Springer-Verlag (2009).
37. JM Thompson. Infrared spectroscopy. Oxford: CRC Press (2018).
38. RO Gallegos-Jara. Evolución del contenido de etanol, metanol, aldehídos, alcoholes superiores y furfural durante la destilación del Pisco Italia, y su relación con los puntos de corte. **Ñawpa-risun-Revista de Investigación Científica** **2**(1), 13-24 (2019).
39. M Lewis. Incompatible trends-Hazardous Chemical Usage in Building Products Poses Challenges for Functional Circular Construction. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, **225**, 012046 (2019). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/225/1/012046>
40. Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT). Norma Oficial Mexicana NOM-010-SCT2/2009. Disposiciones de compatibilidad y segregación para el almacenamiento y transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos. SCT. México (2009). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/680128/NOM-010-SCT2-2009.pdf>
41. GA Tolentino-Huamán. Medidas de control y preventivas como factores de riesgo de contaminación ambiental en el transporte de sustancias peligrosas de la ciudad de Tacna, 2017. Tesis de Maestría en Ciencias (*Magister Scientieae*) con Mención en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna, Tacna, Perú (2018).

42. Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT). Norma Oficial Mexicana NOM-007-SCT2/2010. Marcado de envases y embalajes destinados al transporte de sustancias y residuos peligrosos (2010). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/680153/NOM-007-SCT2-2010.pdf>
43. Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT). Norma Oficial Mexicana NOM-002-SCT/2011. Listado de las sustancias y materiales peligrosos más usualmente transportados. SCT. (2012). <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4623/SCT2a/SCT2a.htm>
44. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-098-SEMARNAT-2002. Protección ambiental-Incineración de residuos, especificaciones de operación y límites de emisión de contaminantes. SEMARNAT. (2004). <http://www.profepa.gob.mx/inovaportal/file/1309/1/nom-098-semarnat-2002.pdf>
45. Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT). Norma Oficial Mexicana NOM-028-SCT2/2010. Disposiciones especiales y generales para el transporte de las sustancias, materiales y residuos peligrosos de la clase 3 líquidos inflamables. SCT. (2010). <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4044/sct/sct.htm>
46. Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT). Norma Oficial Mexicana NOM-019-SCT2/2015. Especificaciones técnicas y disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos. SCT. (2016). https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/5897/sct14_C/sct14_C.html
47. KT Rim. Reproductive Toxic chemicals at work and efforts to protect workers' health: a literature review. **Safety and Health at Work**, **8(2)**, 143-150 (2017).
48. S Olvera-Lobo. Limpieza de Instalaciones y Equipamientos Industriales. 2da. Ed. Antequera: IC Editorial (2018).
49. AN Alekseenko, OM Zhurba, NV Efimova, VS Rukavishnikov. Headspace gas-chromatographic determination of formaldehyde in urine. **J. Analytical Chemistry**, **72(1)**, 83-86 (2017).
50. FB De Freitas-Rezende, AM de Souza-Santos-Cheibub, AD Pereira-Netto, F Ferreira-de Carvalho-Marques. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal** **134**, 383-389 (2017).
51. V Lochař. FT-IR study of methanol, formaldehyde and methyl formate adsorption on the surface of Mo/Sn oxide catalyst. **Applied Catalysis A: General**, **309**, 33-36 (2006).
52. Formaldehído. Merck Chemicals. Ficha de datos de seguridad de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1907/2006. Versión 3.0. Merck México (2017).
53. KK Barakoti, P Subedi, F Chalyavi, S Gutierrez-Portocarrero, MJ Tucker, MA Alpuche-Aviles. Formaldehyde Analysis in non-Aqueous Methanol Solutions by Infrared Spectroscopy and Electrospray Ionization. **Frontiers in Chemistry**, **9**, 678112 (2021).
54. PH Barros-Zarante, JR Sodré. Comparison of aldehyde emissions simulation with FTIR measurements in the exhaust of a spark ignition engine fueled by ethanol. **Heat and Mass Transf**, **54(7)**, 2079-2087 (2018).
55. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Revisión 2021. (2003). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/680165/NOM-054-SEMARNAT-1993.pdf>
56. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Revisión 2021. (2003). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/680165/NOM-054-SEMARNAT-1993.pdf>
57. Normales Climatológicas por Estado: Veracruz. Comisión Nacional del Agua [en línea]. <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=ver>
58. M Marquès, JL Domingo, M Nadal, M Schuhmacher. Health risks for the population living near petrochemical industrial complexes. 2. Adverse health outcomes other than cancer. **Science of The Total Environment**, **730(15)**, 139122 (2020).
59. A Brand, KE McLean, SB Henderson, M Fournier, L Liu, T Kosatsky, *et al.* Respiratory hospital admissions in young children living near metal smelters, pulp mills and oil refineries in two Canadian provinces. **Environment International**, **94**, 24-32 (2016).
60. M Yamada, S Funaki, S Miki. Formaldehyde interacts with RNA rather than DNA: Accumulation of formaldehyde by the RNA-inorganic hybrid material. **Int. Journal of Biological Macromolecules**, **122**, 168-173 (2019).
61. T Salthammer. Formaldehyde sources, formaldehyde concentrations and air exchange rates in European housings. **Building and Environment**, **150**, 219-232 (2019).
62. JDCJ Morales, KP Díaz, CAS Sierra. Riesgos toxicológicos por la exposición ocupacional al formaldehído en sala de anatomía patológica. **Ciencia y Salud Virtual**, **6(2)**, 141-152 (2014).
63. LA Herrera, JCS Calvo. Formalina: características y mecanismos de control ante la exposición del personal en los servicios de anatomía patológica a nivel hospitalario. **Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica**, **69(602)**, 235-239 (2012).
64. Secretaría de Salud (SSA). Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015. Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados ya granel. Especificaciones sanitarias. SSA (2015). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5420977&fecha=22/12/2015#gsc.tab=0



Selection of titration indicators in Analytical Chemistry

Roberto Fernández-Maestre

Universidad de Cartagena, Campus de San Pablo, Programa de Química, Cartagena, Colombia

rfernandezm@unicartagena.edu.co

Recibido: 15/05/2022

Revisado: 15/06/2022

Aceptado: 26/09/2022

Resumen

La selección de indicadores para titulación en Química Analítica. Los libros de texto de química analítica se centran en trazar curvas de titulación y solo se calcula el error de titulación. No se enfocan en seleccionar indicadores para una titulación dada, una situación que los profesionales podrían enfrentar en el trabajo. Los ejemplos sobre este tema están incompletos y la teoría no cubre el material necesario. En este estudio se resuelven ejemplos de selección de indicadores para valoraciones ácido-base, complexométricas y oxidación-reducción. Se muestran los fundamentos teóricos de estos ejemplos y se resuelven algunos problemas. Las valoraciones clásicas son precisas y exactas a altas concentraciones, no necesitan calibración, tienen un alto valor didáctico y constituyen muchos métodos estandarizados.

Palabras claves: Indicadores ácido-base; indicadores de iones metálicos; indicadores redox; enseñanza; educación universitaria

Abstract

Analytical chemistry textbooks are focused on plotting titration curves and only the titration error is calculated. They do not focus on selecting indicators for a given titration, a situation that professionals might face at work. Examples on this topic are incomplete and the theory does not cover the necessary material. In this study, examples of indicator selection for acid-base, complexometric, and oxidation-reduction titrations are solved. The theoretical foundations of these examples are shown and some problems are solved. Classical titrations are precise and accurate at high concentrations, do not need calibration, have a high didactic value, and make up many standardized methods.

Keywords: acid-base indicators; metal ion indicators; redox indicators; teaching; university education

Introduction

Indicators are substances used to determine the endpoint of titrations in classical analytical chemistry. One of the first indicators used was phenolphthalein, to determine the endpoint in acid-base titrations. Other indicators, such as methyl orange, soon followed^{1,2}. The establishment of the pH scale by Sorensen (1909) provided a rigorous means for comparing visual indicators³. The determination of acid-base dissociation constants made the calculation of theoretical titration curves possible, as outlined by Bjerrum in 1914⁴. For the first time, a rational method existed for selecting visual indicators, establishing acid-base titrimetry as a useful alternative to gravimetry².

There are fast and efficient instrumental methods for the determination of the endpoint of a titration that dominate today in analytical laboratories. These methods include electrochemical, spectrometric^{5,6}, and thermometric⁷ endpoints, among others. Classical methods of analysis have disadvantages such as low sensitivity and throughput for which they can be rarely used with analyte solutions <1.00 mM and are time-consuming when there are many samples. Also, indicators cannot be used by color-blind analysts. However, knowledge of the classical methods is important for their application in small laboratories where a limited number of

samples is analyzed or when electrochemical, spectroscopic, or similar instruments are not available for endpoint detection. Other reasons why classical titrations remain part of the chemistry curriculum are that⁸:

- Yield high precision and accuracy results at high concentrations (> 1.00 mM), where instrumental methods have a lower performance.
- Do not need a calibration If a primary standard is used as titrant; if not, standardization of the titrant is required. That is why they are called primary or absolute methods. This represents an advantage of simplicity and speed if there are few samples.
- Have a high didactic value in the teaching of chemical balances.
- Make up many important standardized methods.

The selection of indicators must be carried out in a systematic way including explanations (theory), solved examples, and proposed problems. Kahlert *et al.* recognized that the available textbooks study indicator selection in an incomplete or disjointed manner, with rules of thumb that fail in many cases⁸. The theory should cover what is necessary for students to learn the selection of indicators. The problems proposed in these books regarding indicators only calculate

the titration error but not which indicator is suitable for a certain titration. Most of these texts do not solve examples on selecting an indicator for a given titration, a situation that professionals might face at a laboratory when performing at work. In these situations, the aim is not only to calculate a titration curve but also to determine which indicators are suitable for it depending on the reagents used and their concentration. This is the kind of theory, examples and problems that are rarely, if ever, found in textbooks.

For example, in Skoog's Analytical Chemistry textbook⁵, the chapter on metal ion titrations has no examples on indicator selection, but there is a solved example where the error when using a certain indicator is calculated. However, that example does not mention that the formation constant of the metal-ligand complex must be more than 10,000 times greater than that of the metal-indicator complex⁹ nor is it requested to select an indicator from a list.

An indicator that is suitable for a certain titration must transition within the inflection of the equivalence point and the titrant must react with the indicator only at the equivalence point. The latter implies that the indicator must:

- be much weaker than the analyte in acid-base titrations. This is true if the pK_a value of the indicator is within the pH values of the inflection of the titration curve,
- form a complex with the analyte with a formation constant 10,000 times lower, at least, than the titrant-analyte complex (metal ion titrations)⁹ or
- have a standard potential that allows a color transition within the inflection (redox titrations).

To minimize a given titration error, the entire pH range of the indicator must be within the rapid pH change near the equivalence point. Harvey has a solved acid-base exercise on this, exercise 9.2.5, but it only gives approximate calculations².

This information on indicator selection, although scarce, can be found in scientific journals. Gorin (1956) describes the method for selecting appropriate indicators and the teaching of this subject¹⁰. Kalbus *et al.* (1976) propose an experiment where students are presented with the problem of selecting a suitable indicator for specific acid-base titrations. Two methods to accomplish this are discussed.¹¹ Also, an experiment to evaluate four indicators for a strong acid-strong base titration using conductivity is presented¹². Other approaches have been used to select indicators for a given titration. Kahlert *et al.* used color maps to show how a suitable color indicator has to be chosen, and what color changes happen at the inflection point of a titration⁸. pH-log_{c_i} diagrams (Hagg or Sillen diagrams) have been used to determine the equivalence points of different acid-base titrations and thus select a suitable indicator for them¹³. Expressions to calculate the indicator error in redox titrations and examples of the use of these expressions have been published¹⁴. It has

been shown that the pH and potential calculation at the equivalence point in acid-base and redox titrations, respectively, are not required to choose the titration indicator but calculating points immediately after and before the curve inflection. Also, those complexometric and precipitation curve calculations are not required to select indicators for complexometric and precipitation titrations. Finally, methods to calculate titration errors in complexometric and precipitation titrations that are simpler than those in the literature are presented¹⁵.

Most analytical chemistry textbooks are focused on teaching the construction of titration curves and, sometimes, the errors made when using a certain indicator. However, in real life, not only must the error of an indicator be calculated, but the procedure to select an indicator for a given titration must be known. In this study, we solve examples of indicator selection for acid-base, metal ion, and oxidation-reduction titrations. We also demonstrate that the selection of indicators mainly involves the calculation of the titration curve inflection and checking that the color transition of the indicator falls exactly within this zone. In addition, we recommend the theoretical treatment related to this topic and propose some problems.

Methods

Recent editions of the most widely used and popular Analytical Chemistry textbooks were reviewed. Skoog's Analytical Chemistry book was chosen since its first edition dates from 1963 and, at this moment, it is in its tenth edition and in these almost 40 years it has been significantly improved. An internet search of the text "best analytical chemistry textbooks" was carried out. From these results, the selections of the textbooks of Analytical Chemistry recommended by academic websites such as Research gate and Chemistry Hall were chosen.

Chemistry Hall¹⁶ included, among its top four, the books by Skoog *et al.*⁵, Fifield and Kealey¹⁷, Christian¹⁸ and Harris⁶. In Research gate¹⁹, 112 responses were recorded to the question "What is the best book for understand the basic analytical chemistry?" (sic). The responses came from teachers and researchers in this area of chemistry and suggested the following as the best five books: Fundamentals of Analytical Chemistry by Skoog *et al.*⁵ 52 votes, Analytical Chemistry by Christian¹⁸ 24 votes, Quantitative Chemical Analysis by Harris⁶ 20 votes, A textbook of Quantitative Chemical Analysis by Vogel⁹ 12 votes, and Modern Analytical Chemistry by Harvey² 12 votes. The difference between these and the following ones was large in terms of the number of votes obtained, so only these five books were selected in this way.

The list of the 25 most cited books in analytical chemistry (1980-1999)²⁰ includes only the textbook by Vogel. Finally, in the Amazon bestseller list in analytical chemistry²¹ only the books by Harris and Skoog *et al.* appear in the first 24

positions. However, out of these 25 books only these two are textbooks of analytical chemistry. For all these reasons, the books by Harris, Skoog *et al.*, Christian, Harvey, Vogel, and Fifield and Kealey, among others, were selected for this study. These texts were searched for theory, examples, and problems on how to find the right indicator to perform a given titration. The same was done by searching Google Scholar in the titles of the results for the terms "metal ion indicator", "metallochromic indicator", "complexometric indicator", "acid-base" indicator, "redox" indicator, "oxidation-reduction" indicator, and EDTA indicator. In addition, acid-base, complexometric, and redox titration problems were solved by determining the feasibility of the titration using a given indicator or by selecting one from a table.

Results and discussion

Analytical chemistry textbooks undertaking a systematic and coherent study of the selection of indicators for classical titrations with problems and exercises on this subject are required. Table S1 evaluates the content of the most popular and best-selling analytical chemistry textbooks. It details the explanations, problems, or examples of the general procedure of indicator selection for acid-base, metal ion, or redox titrations. Some of these books have solution manuals that may contain additional information but they were not reviewed.

To determine that an indicator is suitable for a certain titration, it must be shown that its color transition lays within the inflection of the equivalence point and that the titrant reacts with the indicator only at this point. The latter implies that the indicator must be weaker than the titrant so that no appreciable errors occur due to consumption of the titrant by the indicator before the equivalence point.

Acid-base Titrations

Indicators are generally selected with their pK_a matching the titration pH at the equivalence point¹⁸. This is correct for the titration of concentrated strong acids and bases. However, with dilute solutions and weak acids or bases, errors can be made because the color transition of the indicator can occur outside the inflection of the titration curve even though its pK_a is at this inflection.

To select an indicator for an acid-base titration, it should be checked that the transition range of the indicator does not go beyond the inflection of the equivalence point. This implies that the titrant reacts with the indicator only at the equivalence point (the indicator must be weaker than the analyte).

Harris states referring to acid-base titrations: "we seek an indicator whose transition range overlaps the steepest part of the titration curve as closely as possible"⁶. We have to determine the inflection to verify that this transition does not fall outside of it. The inflection is delimited by calculating the pH 0.10 ml before and 0.10 ml after the equivalence point in

a 25-ml-titration or less, in the case of autotitrators or micro-burettes. This procedure can lead to a maximum error of 0.5% in a titration that consumes 20 ml of the titrant. This is illustrated in the following example:

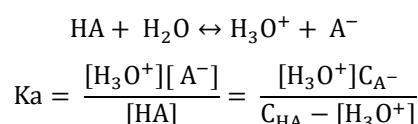
Example 1. Choose acid-base indicators for the titration of 50.00 ml of chloroacetic acid, HA, 0.100 M, with 0.200 M NaOH, at 25°C. K_a chloroacetic acid = 1.36×10^{-3}

Here we must A) look for the pH range of the inflection of the titration curve and B) an indicator whose color transition occurs completely in this range.

The number of moles, n , of the titrant is calculated: $n = 50.00 \text{ ml} \times 0.100 \text{ M} = 0.500 \text{ mmol}$ and the volume of titrant at the equivalence point, $V = 50.00 \text{ ml} \times 0.100 \text{ M} / 0.200 \text{ M} = 25.00 \text{ ml}$.

A) To find the pH range of the titration inflection, the pH 0.1 ml before and 0.1 ml after the equivalence point is calculated, corresponding to 24.90 ml and 25.10 ml of titrant, respectively.

A1) pH 0.1 ml before the equivalence point, when adding 24.90 ml of NaOH:



Where C stands for the initial concentration before dissociation. Because $\frac{\text{C}_{\text{HA}}}{K_a} < 1000$, $[\text{H}_3\text{O}^+]$ in the denominator cannot be neglected and a quadratic equation must be solved returning $[\text{H}_3\text{O}^+] = 5.35 \times 10^{-6} \text{ M}$ and pH 5.271.

A2) pH 0.1 ml after the equivalence point when 25.10 ml of NaOH is added

At this point there is an excess of 0.10 ml of NaOH in the solution:

$$[\text{OH}^-] = \frac{0.100 \text{ ml} \times 0.200 \text{ M}}{75.1 \text{ ml}} = 2.66 \times 10^{-4} \text{ M}$$

This concentration returns a pOH of 3.575 and pH of 10.422. Then, the inflection of the titration curve goes from pH 5.271 to 10.422.

B) Looking at a table of acid-base indicators (Table 14.1 from Skoog *et al.*⁵, see Appendix 3), we find that phenolphthalein has a pK_a of 9.4 and changes in the pH range ~ 8.3 to ~ 10.0 . This transition range is effectively within the pH range of the inflection, 5.271 to 10.422 so phenolphthalein can be used in this titration. Thymolphthalein has a higher pK_a and a transition range between pH ~ 9.3 to ~ 10.5 . This indicator could produce an endpoint determination error since $10.5 > 10.422$ and it could be observed after the equivalence point when there is an excess of NaOH. The error made if thymolphthalein is used in this titration is 0.5% (Appendix 1). Other indicators with more basic pK_a cannot be used because they produce larger errors.

In the table of acid-base indicators, with a pK_a less basic than phenolphthalein, we find bromothymol blue (pK_a 7.10), which changes in the pH range of ~ 6.2 to ~ 7.6 . This range falls within the inflection of the titration curve so this indicator can be used in this titration. Bromothymol violet has a more acidic pK_a , in the pH range ~ 5.2 to ~ 6.8 . This indicator could produce an error in the determination of the endpoint since 5.2 is lower than 5.271, the lowest limit of the titration curve inflection. Therefore, this endpoint could be observed when the equivalence point has not yet been reached. However, the error made if bromothymol violet is used in this titration is only 0.1% (Appendix 2) and, therefore, could be used in the titration. Other indicators with more acidic pK_a cannot be used because they produce larger errors. Indicators with pK_a between those of bromothymol blue and phenolphthalein (between 9.4 and 7.10) can be used for this titration and include thymol blue, phenol red, and cresol violet.

Harris' problem 11-J⁶, which was used to solve this example, approaches an adequate treatment of the selection of an acid-base indicator. It asks to find the indicator error for a titration curve using thymol blue as the indicator, which changes between pH 8.0 and 9.6. Harris calculates the titration error from the difference between the volume of titrant to reach the equivalence point, 10.00 ml, and the volume needed to reach pH 9.6. However, he did not take into account that the color transition of the indicator is between 8.0 and 9.6, and that pH 8.0 appears to be outside the inflection. Because of this, an early transition might be observed. However, when solving as in problem 11Jb⁶, an error of only 0.006% is found, but one should not forget to check the pH change of the indicator at both limits of the inflection.

Metal Ions Titrations

The selection of metallochromic indicators can be done by checking that:

- The formation constant of the titrant-analyte complex is at least 10 000 times higher than that of the indicator-analyte complex. In this way, the titrant does not displace the indicator from the complex before the equivalence point giving an early color transition. However, the indicator-analyte formation constant should not be too weak ($<10^4$) to prevent an early or diffuse endpoint.¹⁸
- The amount of untitrated analyte when the indicator changes should be negligible. This implies that the indicator transition is within the inflection of the equivalence point. This could also be checked assuring that the color transition of the indicator falls exactly within the inflection of the titration curve. However, the color transitions of these indicators are not reported in most textbooks.
- The metallochromic indicator meets other properties such as strong absorbance, stability and more.

These principles are applied in the following example.

Example 2. A sample of 25.00 mL of 0.00987 M copper (II) chloride is titrated with 0.0198 M EDTA (Y). Find the error of the titration at pH 11.000 and show that the indicator HIn^{2-} is suitable for the titration, at 25°C. Dissociation constant of the indicator, K_a , $10^{-11.41}$. Metal-indicator formation constant (K_{fCuIn}) $10^{7.6}$.

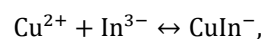
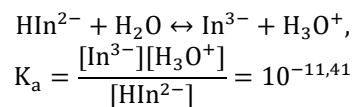
The following should be checked:

- A) $K_{fCuY} \gg K_{fCuIn}$ (Conditional formation constants)
- B) The indicator-analyte constant should not be too weak
- C) The amount of untitrated Cu(II) when the indicator changes is negligible.

A) $K_{fCuY} \gg K_{fCuIn}$: $6.3 \times 10^{18} \gg 10^{7.6}$. Therefore, EDTA displaces In^{3-} from the complex only at the equivalence point.

B) The indicator-analyte constant should not be too weak ($<10^4$): $K_{fCuIn} = 10^{7.6} \gg 10^4$

C) The amount of untitrated Cu(II) when the indicator changes and the indicator error are calculated:



$$K_{fCuIn} = \frac{[CuIn^-]}{[Cu^{2+}][In^{3-}]} = 10^{7.6}$$

Let us say $CuIn^-$ is red and HIn^{2-} is blue. Before the equivalence point, the color of the solution is red due to the presence of $CuIn^-$ and after the equivalence point, EDTA releases In^{3-} from the complex with the analyte giving the solution a blue color due to the formation of HIn^{2-} .

$$K_a \times K_{fCuIn} = \frac{[In^{3-}][H_3O^+]}{[HIn^{2-}]} \times \frac{[CuIn^-]}{[Cu^{2+}][In^{3-}]} \\ = \frac{[H_3O^+][CuIn^-]}{[HIn^{2-}][Cu^{2+}]} = 1.55 \times 10^{-4} \\ [Cu^{2+}] = \frac{[CuIn^-][H_3O^+]}{[HIn^{2-}]1.55 \times 10^{-4}}$$

An average human being can detect the color of an indicator species when that species has a concentration 10 times higher than the other one. Then, the solution will be red if $[CuIn^-]/[HIn^{2-}] \geq 10$ and blue if $[CuIn^-]/[HIn^{2-}] \leq 0.1$. Replacing these values and $[H_3O^+]$ by 1.00×10^{-11} M in the copper concentration expression, we obtain the concentrations of Cu (II) at which the color transition is observed:

$$[Cu^{2+}] = 10 \times \frac{1.00 \times 10^{-11}}{1.55 \times 10^{-4}} = 6.46 \times 10^{-7} \text{ M} \\ \text{red solution before the end point}$$

$$[Cu^{2+}] = 0.1 \times \frac{1.00 \times 10^{-11}}{1.55 \times 10^{-4}} = 6.46 \times 10^{-9} \text{ M} \\ \text{blue solution after the end point}$$

The titration error, calculated as the percent difference between the original Cu(II) concentration and 6.46×10^{-7} M, is 0.0065%.

Because the two factors gave positive results, the indicator can be used for this titration. However, there are other factors to check: the analyte should not precipitate at the titration pH, the indicator-analyte reaction must be reversible, the indicator concentration must be negligible, and more. Under these conditions, other factors would dictate the uncertainty of the titration: uncertainty in reading burette volumes, burette calibration tolerances, droplet volume, etc. These are also missing from the discussion in modern texts, but that does not detract from their significance.

From this example, it follows that the concentration of metal (M^{n+}) remaining when the indicator (In) changes color is calculated as:

$$[M^{n+}] = 10 \times \frac{[H_3O^+]}{(K_{aHIn})(K_{fMIn})}$$

Using this equation, the problems on the selection of metal ion indicators in Appendix 3 were solved.

Although indicators can be selected in this way, it is still a less simple procedure than in the case of acid-base titrations. There is a visual guide for selecting conditions of EDTA titrations^{5,22} that is addressed to those inexperienced in the use of EDTA. It shows a chart that guides the selection of proper conditions for EDTA titrations of metal ions, the pH range where EDTA reacts quantitatively with metal ions, the pH range where a specific metal indicator may be used, and the pH range where an auxiliary complexing agent is required to avoid metal ion precipitation as hydroxide²². However, when using the procedure in this section, some metals that can be titrated with EDTA according to the chart gave the opposite result. This is the case with barium, calcium, and magnesium metal ions. A confirmation of this result is found in Skoog *et al.* where Figure 17.9 shows that calcium cannot be titrated with eriochrome black T⁵. This demonstrates the need for further research in this field. Therefore, for metal ion titrations is better to rely on experience rather than only on calculations or literature reports.

Redox Titrations

Redox indicators present fewer selection problems than indicators for acid-base titrations since their color transition is within a very small range of potentials compared to the large size of the equivalence point inflection of most titrations. For example, in the titration of a 0.1 M weak acid with a 0.1 M strong base, the pH change at the equivalence point inflection is ~2, ~4, and ~6 units if the pK_a of the acids is 6, 4, and 2, respectively, compared to the ~2 pH units of the indicator color transition, a ratio (inflection pH range)/(two pH units) of 1, 2, and 3, respectively. In redox titrations, this ratio is ~13.3 when the difference in standard potentials of the titrant

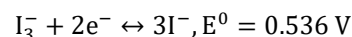
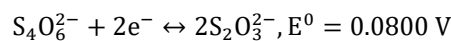
and analyte is one volt. This ratio can be higher as these potential differences can be greater than 2 V, leaving a wide variety of indicators that can work for one of these titrations.

To determine that an indicator is suitable for a certain titration, it must be shown that:

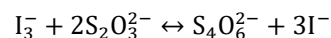
- The indicator changes within the inflection of the equivalence point (the indicator undergoes oxidation/reduction only at the equivalence point). This implies that the oxidation-reduction potential of the indicator must be at the inflection of the analyte's titration curve.
- The potential range of the color transition of the indicator does not fall outside the inflection of the titration curve.

Example 3. Find the appropriate indicator for the titration of 20.00 ml of 0.009018 M sodium thiosulfate with triiodide ion, I_3^- , 0.02001 M at a neutral pH and 25°C. Explain why the chosen indicator is appropriate.

In the standard potential tables,⁵ we find:



Then, the global reaction is:



Initial moles of thiosulfate, $n_{S_2O_3^{2-}}^i = 20 \text{ ml} \times 0.009018 \text{ M} = 0.1804 \text{ mmol}$

Volume at the equivalence point =

$$0.1804 \text{ mmol } S_2O_3^{2-} \times \frac{1 \text{ mmol } I_3^-}{2 \text{ mmol } S_2O_3^{2-}} \times \frac{\text{ml } I_3^-}{0.02001 \text{ mmol } I_3^-} = 4.51 \text{ ml } I_3^-$$

A) To verify that the indicator changes within the inflection of the equivalence point, we calculate the potential 0.1 ml before and after the equivalence point, this is at 4.41 ml and 4.61 ml, respectively. Then, we compare these values to the range of potentials of the color transition of the indicator.

A1) Potential 0.1 ml before the equivalence point (at 4.41 ml), sf: stoichiometric factor:

$$\begin{aligned} n_{S_2O_3^{2-}} &= (n_{S_2O_3^{2-}}^i) - (n_{I_3^-})sf \\ &= 0.1804 \text{ mmol} - 4.41 \text{ ml} \times 0.02001 \text{ M} \times \frac{2}{1} \\ &= 4.00 \times 10^{-3} \text{ mmol} \\ n_{S_4O_6^{2-}} &= (n_{I_3^-})sf = 4.41 \text{ ml} \times 0.02001 \text{ M} \times \frac{2}{1} = 0.1764 \text{ mmol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E &= E_{\frac{S_4O_6^{2-}}{S_2O_3^{2-}}}^0 - \frac{0.0592}{n} \log \frac{[S_2O_3^{2-}]}{[S_4O_6^{2-}]} \\ &= 0.0800 - \frac{0.0592}{2} \log \frac{\left(\frac{4.00 \times 10^{-3}}{24.41}\right)^2}{\left(\frac{0.1764}{24.41}\right)} = 0.241 \text{ V} \end{aligned}$$

A2) Potential 0.1 ml after the equivalence point (at 4.61 ml).

$$n_{I_3^-} = V_{I_3^- \text{ excess}} [I_3^-] = (4.61 - 4.51) \text{ ml} \times 0.02001 \text{ M} \\ = 2.001 \times 10^{-3} \text{ mmol}$$

$$n_{I^-} = n_{S_2O_3^{2-}} - x \text{ sf} = 0.1804 \text{ mmol} \times \frac{3}{2} = 1.680 \text{ mmol}$$

$$E = E_{I_3^-/I^-}^0 - \frac{0.0592}{n} \log \frac{[I^-]^3}{[I_3^-]} = 0.536 - \frac{0.0592}{2} \log \frac{\left(\frac{1.680}{24.61}\right)^3}{\left(\frac{2.001 \times 10^{-3}}{24.61}\right)} \\ = 0.518 \text{ V}$$

The inflection goes from 0.241 V to 0.518 V.

The color transition of redox indicators, ΔE , is calculated with the standard redox potential of the indicator, E^0 , and the number of electrons exchanged by the indicator, n :

$$\Delta E = E^0 \pm \frac{0.0592}{n}$$

Using the redox indicators in Table S2 with $n=1$, we see that phenosafranine, with an E^0 of 0.28 V, has a $\Delta E = 0.28 \pm 0.0592 \approx [0.22-0.34]$ V. Because $0.22 < 0.241$ V, a premature color transition could be observed. Indigo tetrasulfonate, $E^0 = 0.36$ V, yields a ΔE of 0.30-0.42 V and can be used in this titration because $0.30 \text{ V} > 0.241 \text{ V}$ and $0.42 \text{ V} < 0.518 \text{ V}$. This indicates that the indicator changes within the inflection of the equivalence point. Methylene blue (E^0 0.53 V) yields a ΔE of 0.47-0.59 V and cannot be used because $0.59 \text{ V} > 0.518 \text{ V}$ and a late color transition may be observed. This also happens to indicators with a higher standard redox potential such as diphenylamine (E^0 0.75 V), ethoxy-2,4-diaminoazobenzene yellow (E^0 0.76 V), diphenylamine sulfonic acid (E^0 0.85), and indicators #7 to 11.

Precise and approximate expressions for the indicator error have been derived for oxidation-reduction titrations. Examples are given of the use of these expressions to select the best indicator for titrations with ascorbic acid¹³.

Vogel estimates that “for a sharp colour change at the endpoint, E_{in}^0 should differ by about at least 0.15 volt from the standard (formal) potentials of the other systems involved in the reaction”⁹ with no further explanation. Figure S1 explains graphically this statement using the theoretical titration curve for the titration of 50 mL of Fe^{2+} 0.0500 M with Ce^{4+} 0.100 M. The color transitions of indicators A and B are shown. E_{in}^0 of indicator A differ by ~ 0.15 volts from the standard potentials of the Fe^{2+}/Fe^{3+} system. This condition places its color transition into the titration inflection making it acceptable for that titration. This suggestion coincides with Harris who says “If the difference in formal potentials is ≥ 0.4 V, then a redox indicator usually gives a satisfactory end-point”⁶ but only if the indicator pK_a is in the middle of the inflection.

The procedure suggested by Vogel⁹ would be an easier way to find an indicator but would leave out of the curriculum the

important redox equilibria studied in Example 3. However, teaching this procedure is encouraged to check the results obtained in Example 3. In this example, the standard potentials of the systems involved in the reaction are 0.536 and 0.080 V. For a difference of 0.15 V proposed by Vogel⁹ as the difference from these standard potentials and E_{in}^0 , a range of useful pK_a from 0.230 to 0.386 V is obtained. Using Table S2 again, we see that indigo tetrasulfonate, $E^0 = 0.36$ V, can be used in this titration because 0.36 V is within the 0.230-0.386 V range. The other indicators, with a pK_a out of this range, cannot be used in this titration. These results coincide with those obtained in Example 3.

Misleading Statements from Analytical Chemistry Textbooks

Some statements and examples related to indicators that may be erroneous, misleading, or contradictory are discussed in this section.

Vogel considers that “In general, it may be stated that weak acids ($K_a > 5 \times 10^{-6}$) should be titrated with phenolphthalein, thymolphthalein, or thymol blue as indicators”⁹. However, this depends on the analyte concentrations: the less concentrated the analyte, the smaller the endpoint inflection, complicating the use of chemical indicators.

On the other hand, Harris considers that “If the difference in formal potentials [between the titrant and analyte systems] is ~ 0.4 V, then a redox indicator usually gives a satisfactory endpoint”⁶. Nevertheless, the indicator standard redox must be near the center of the inflection for this to be true.

Also, in example 16-B, Harris asks “Would indigo tetrasulfonate be a suitable redox indicator for the titration of $Fe(CN)_6^{4-}$ with Tl^{+3} in 1 M HCl?” and gives a hint: “The potential at the equivalence point must be between the potentials for each redox couple”⁶. This hint is only an approximation because the potentials of the redox couples are always outside the inflection of the equivalence point, which is where the color transition of the indicator should be found. The hint should say “indicators with a standard potential outside the range between the two standard potentials of redox pairs should be discarded”. In example 16-B⁶, the redox couples are Tl^{+}/Tl^{+3} $E^0 = 0.77$ V and $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ $E^0 = 0.356$ V. Any indicator with a standard potential outside the range 0.356-0.77 V will not be useful for this titration. The titration error for those indicators with a standard potential within this range should be calculated. Vogel has a statement similar to Harris’s hint above: “The ideal oxidation-reduction indicator will be one with an oxidation potential intermediate between that of the solution titrated and that of the titrant”⁹ which deserves similar observations. However, Vogel has a better statement: “for a sharp color change at the endpoint, E_{in}^0 should differ by about at least 0.15 volt from the standard ... potentials of the ... systems in the reaction”⁹. This will place the indicator transition exactly in the titration inflection.

Conclusions

More time should be devoted to the selection of indicators in chemistry textbooks and more time to the teaching of this subject in the classrooms. Introducing this additional material into the curriculum of a chemistry program would require discarding other topics to make room. This could be done at the expense of determining pH, pM, and the potential at the equivalence point in acid-base, metal ion, and redox titrations, respectively. These calculations are relatively complicated for students, especially in redox titrations, and unnecessary to select an indicator. This is not to suggest that these issues are unimportant. The selection of indicators is mainly required to determine the extent of the inflection at the equivalence point and to check that the color transition of the indicator falls in this zone.

Acknowledgments The author thanks Dr. Maggie Tam for revision of this paper's draft.

Supplementary Information

Appendix 1. Calculation of the error made if thymolphthalein is used as the indicator in the titration described in Example 1.

Appendix 2. Error made if bromothymol violet is used as an indicator in Example 1.

Appendix 3. Selected problems with answers.

Table S1. Analytical chemistry textbooks that include explanations, problems, or examples on the general procedure of indicator selection for acid-base, metal ion, or redox titrations.

Table S2. Redox indicators.

References

1. RT Thomson. Use of litmus, methyl orange, phenacetolin, and phenolphthalein as indicators. **Chem.**, 123-127 (1883).
2. D Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, New York, 2000. https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1 (Accessed 2022-05-2).
3. SPL Sörensen. Enzymstudien. II. Mitteilung. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen (Enzyme studies. 2nd Report. On the measurement and the importance of hydrogen ion concentration during enzymatic processes). **Biochem. Zeitschr.**, 21, 131-304 (1909).
4. NJ Bjerrum. *Die Theorie der alkalimetrischen und azidimetrischen Titrierungen* (The theory of alkalimetric and acidimetric titrations), F. Enke, Stuttgart (1914).
5. DA Skoog, DM West, FJ Holler, SR Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 10th ed. Cengage Learning (2015).
6. DC Harris, CA Lucy. *Quantitative Chemical Analysis*. 10th ed. Macmillan (2020).
7. LS Bark, SM Bark. *Thermometric Titrimetry*. International Series of Monographs in Analytical Chemistry, Vol. 33; Elsevier (2016).

8. H Kahlert, G Meyer, A Albrecht. Colour maps of acid-base titrations with colour indicators: how to choose the appropriate indicator and how to estimate the systematic titration errors. **Chem-Texts**, 2(2), 1-28 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40828-016-0026-4>
9. J Mendham, R C Denney, J D Barnes, M J K Thomas. *Vogel's textbook of quantitative Chemical Analysis*. 6th Edition, Pearson (2005).
10. G Gorin. Indicators and the basis for their use. **J. Chem. Ed.**, 33(7), 318 (1956). <https://doi.org/10.1021/ac50163a027>
11. LH Kalbus, RH Petrucci, GE Kalbus. A multifaceted experiment for quantitative analysis. Back titration, hydroxide determination, and selection of an indicator. **J. Chem. Ed.**, 53(11), 719 (1976). <https://doi.org/10.1021/ed053p719>
12. AS Kooser, JL Jenkins, LE Welch. Acid-base indicators: a new look at an old topic. **J. Chem. Ed.**, 78(11), 1504 (2001). <https://doi.org/10.1021/ed078p1504>
13. R De Levie. Aqueous acid-base equilibria and titrations. In: *Oxford Chemistry Primers*, 80(1), Oxford University Press (1999).
14. L Erdey, G Svehla. The calculation of indicator error in oxidation-reduction titrations. **Anal. Chim. Acta**, 40, 473-478 (1968). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86763-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86763-X)
15. R Fernández-Maestre. The importance of teaching titration curves in analytical chemistry. **Periódico Tche Química**, 17(34), 213-219 (2020). <http://www.deboni.he.com.br/Periodico34.pdf>
16. Chemistry Hall. https://chemistryhall.com/best-analytical-chemistry-textbook/#What_is_the_Best_Analytical_Chemistry_Textbook (Accessed 2021-06-28).
17. FW Fifiield, D Kealey. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. 5th edition, Blackwell (2000).
18. GD Christian, PK Dasgupta, KA Schug. *Analytical Chemistry*, 7th edition, Wiley (2013).
19. <https://www.researchgate.net/post/What-is-the-best-book-for-understand-the-basic-analytical-chemistry> (Accessed: 2021-06-28).
20. T Braun, A Schubert, G Schubert. The Most Cited Books in Analytical Chemistry. **Anal. Chem.**, 73(23), 667 (2001).
21. https://www.amazon.sg/gp/bestsellers/books/6402631051/ref=zg_bs_nav_3_6401505051/356-2627857-3551940. (Accessed: 2021-06-28).
22. K Ueno. Guide for Selecting Conditions of EDTA Titrations. **J. Chem. Ed.**, 42, 432 (1965).
23. A Hulanicki, S Glab, G Ackermann. Compleximetric indicators: characteristics and applications. **Pure Appl. Chem.**, 55(7), 1137-1230 (1983). <https://doi.org/10.1351/pac198355071137>
24. P Patnaik. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. McGraw-Hill (2004).
25. J Kenkel. *Analytical Chemistry for Technicians*. CRC Press (2002).

Appendix 1. Calculation of the error made if thymolphthalein is used as the indicator in the titration described in Example 1, 50.00

ml of chloroacetic acid, HA, 0.100 M with 0.200 M NaOH. Titrant volume at the equivalence point: 25.00 ml

Thymolphthalein changes in the pH range ~ 9.3 to $\sim 10.5^6$. This indicator could cause an error in the determination of the endpoint since $10.5 > 10.422$, the upper limit of the inflection of the titration curve. The endpoint could be observed after the equivalence point when there is an excess of NaOH. The error is calculated as follows [Harris (2020), problem 11J]⁶. First, V, the volume of NaOH in excess with respect to the pH at the equivalence point to reach pH 10.5 is calculated:

$$[\text{OH}^-] = 10^{-(\text{pK}_w - 10.5)} = \frac{n}{V} = \left(\frac{\text{Titrant Concentration} \times V}{V_A + V_{pe} + V} \right) = \left(\frac{0.200 \text{ M} \times V}{50 \text{ ml} + 25 \text{ ml} + V} \right)$$

Where V_A is the analyte volume and V_{pe} the volume at the equivalence point. This equation returns ~ 0.12 ml for V. Then, the maximum error of the titration with the indicator thymolphthalein is:

$$E = \frac{(25.12 - 25.0)}{25.0} \times 100 \cong 0.5\%$$

Appendix 2. Error made if bromothymol violet is used as indicator in Example 1, titration of 50.00 ml of chloroacetic acid, HA, 0.100M with NaOH 0.200 M. $K_a = 1.36 \times 10^{-3}$

At the equivalence point:

mmol chloroacetate: 50.00 ml $\times$ 0.100 M = 5.00 mmol

Volume = 50 + 25 = 75 ml

Chloroacetate concentration = 5.00 mmol/75 ml = 6.67×10^{-2} M

$[\text{OH}^-] = (6.67 \times 10^{-2} \times 7.43 \times 10^{-12})^{1/2} = 7.04 \times 10^{-7}$ M, pOH = 6.153, pH = 7.844

Bromothymol violet changes in the pH range ~ 5.2 to $\sim 6.8^6$. This indicator could produce an error in the determination of the endpoint since $5.2 < 7.844$, the pH at the equivalence point. The endpoint could be observed when the equivalence point has not yet been reached. To calculate this error, the ratio $[A^-]/[HA]$ is calculated at the pH at which the indicator color transition could be observed, pH 5.2:

$$\text{pH} = \text{pK}_a \text{ analyte} + \log \frac{[A^-]}{[HA]}; 5.2 = 2.87 + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \rightarrow \frac{[A^-]}{[HA]} = 214$$

Titration reaction	HA	+	OH ⁻	→	A ⁻	+	H ₂ O
Relative initial amounts	25		V		-		-
Relative final amounts	25-V		-		V		-

To get $\frac{[A^-]}{[HA]} = 214$, it is required that $V/(25-V) = 214$ and $V = 24.88$ ml and the bromothymol violet indicator error is only 25.0-24.88 = 0.1 ml, $\sim 0.5\%$. This is valid for 1:1 reactions.

Indicator	Metal ion	$K_{f, \text{Min}}$	Metal ion-EDTA conditional formation constant $K_{f, \text{MY}}^{\text{¥}}$	$[M^{n+}]$ at the indicator transition	Is the titration possible?
Eriochrome black T, $\text{pK}_{a3} 11.6$	Ba ²⁺	$10^{3.0}$	2.28×10^7	0.398	No; $0.398 > 0.0100$
	Cd ²⁺	$10^{12.74}$	9.49×10^{15}	7.24×10^{-11}	Yes
	Pb ²⁺	$10^{13.19}$	3.00×10^{17}	2.57×10^{-11}	Yes
	Mg ²⁺	$10^{7.0}$	1.85×10^8	3.98×10^{-5}	No; $K_{f, \text{MY}} \cong K_{f, \text{Min}}$
	Ca ²⁺	$10^{5.4}$	1.34×10^{10}	0.00158	No; early transition

¥ at pH 10. pK_a data is from Harris and Lucy⁶ and $K_{f, \text{Min}}$ data from Hulanicki *et al.*²³ An Excel file with the calculations is available as Electronic supplementary information.

Appendix 3. Selected problems with answers

A. Acid-base indicators

Select acid-base indicators for the titration of 50.00 ml of hydrochloric acid, HCl, 0.0100 M, with 0.200 M NaOH.

ANSWER. The inflection of the titration endpoint goes from pH 4,573 to 9,422 (An Excel file with the calculation is available in the Electronic Supplementary Material). Using the procedure followed in Example 1, it is found that only indicators 7 to 10 from the table below are adequate.

Some acid-base indicators

#	Common name	Transition Interval	pK _a *
1	Thymol blue	1.2–2.8	1.65
2	Thymol blue	8.0–9.6	8.96
3	Methyl yellow	2.9–4.0	
4	Methyl orange	3.1–4.4	3.46
5	Bromocresol green	3.8–5.4	4.66
6	Methyl red	4.2–6.3	5.00
7	Bromothymol violet	5.2–6.8	6.12
8	Bromothymol blue	6.2–7.6	7.10
9	Phenol red	6.8–8.4	7.81
10	Cresol violet	7.6–9.2	
11	Phenolphthalein	8.3–10.0	
12	Thymolphthalein	9.3–10.5	
13	Alizarin yellow	10–12	

* At ionic strength of 0.1 and the reaction $\text{HIn}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{In}$. Modified from Skoog *et al.*⁵

B. Metal ion indicators

Determine if 0.0100 M solutions of the metal ions Ba²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ can be titrated with 0.0200 M EDTA using Eriochrome black T as the indicator using the procedure from Example 2.

ANSWER: To calculate the concentration of metal $[M^{n+}]$ remaining at the indicator transition, the following equation is used, as in Example 2:

$$[M^{n+}] = 10 \times \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{(K_{a, \text{Hin}})(K_{f, \text{Min}})}$$

C. Redox indicators

Find the appropriate indicators from Table S2 for the titration of 50 mL of Fe^{2+} 0.0500 M with Ce^{4+} 0.100 M (Figure 1).

ANSWER: The inflection of the titration endpoint goes from 0.909 to 1.56 V. Using the procedure followed in Example 3, indicators 8 to 11 are adequate. An Excel file with the calculations is available in the Electronic Supplementary Material.

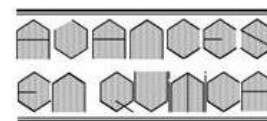
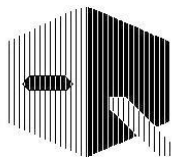
Table S1. Analytical chemistry textbooks that include explanations, problems, or examples on the general procedure of indicator selection for acid-base, metal ion, or redox titrations. Some of these books have solution manuals that may contain additional information.

TITRATIONS	Topic	Reference							
		Harris ⁶	Skoog ^{5,b}	Vogel ⁹	Christian ¹⁸	Harvey ²	Fifield ¹⁷	Patnaik ²⁴	Kenkel ²⁵
ACID-BASE	Theory	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
	Examples	✓	X	X	X	X	X	X	X
	Problems	✓	X	X	X	✓	X	X	✓
METAL ION	Theory	✓	✓	✓	~	✓	X	X	X
	Examples	X	✓	X	X	X	X	✓	X
	Problems	X	X	X	X	✓	X	X	X
REDOX	Theory	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	X
	Examples	X	X	X	X	X	X	X	X
	Problems	^a	X ^b	X	X	✓	X	X	X

Theory: explanations on how to select indicators for a given titration. Examples: solved questions. Problems: unresolved questions even though the answers are in the appendices. ~ partially. ^a Incomplete. ^b only the answer is given.

Table S2. Redox indicators. Modified from Harris (2020)⁶.

#	Indicator	E ⁰
1	Phenosafranine	0.28
2	Indigo tetrasulfonate	0.36
3	Methylene blue	0.53
4	Diphenylamine	0.75
5	Ethoxy-2,4-diaminoazobenzene	0.76
6	Diphenylamine sulfonic acid	0.85
7	Diphenylbenzidine sulfonic acid	0.87
8	Tris(bipyridine)iron	1.12
9	Tris(1,10-phenanthroline) iron (ferroin)	1.15
10	Tris(5-nitro-1,10-phenanthroline)iron	1.25
11	Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium	1.29



Composición química proximal y palinológica de polen apícola comercial de Mérida, Venezuela

Patricia Vit*, Bertha Santiago

Apiterapia y Bioactividad, Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

(*) vit@ula.ve

Recibido: 15/08/2022

Revisado: 31/08/2022

Aceptado: 31/08/2022

Resumen

El polen recolectado por las abejas es cosechado con trampas de polen antes que ingrese a la colmena, deshidratado y comercializado como polen apícola. Es un producto nutritivo y medicinal, su composición varía según el origen botánico, el cual se percibe por los diferentes colores de las pelotas de polen. Se realizaron análisis químicos proximales y palinológicos en tres marcas comerciales de polen apícola del Mercado Principal de Mérida para conocer su valor nutricional. Se detectaron once tipos de polen, pertenecientes a nueve familias botánicas: Arecaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Caesalpinaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rosaceae y Solanaceae. Las variaciones en el contenido porcentual (g/100 g polen) de carbohidratos (62,6 – 64,8), cenizas (2,0 – 2,8), humedad (6,9 – 7,3), lípidos (5,7 – 6,2) y proteínas (20,0 – 22,7) correspondió a rangos reportados en la literatura.

Palabras claves: composición química; palinología; polen apícola; valor nutricional;

Abstract

Palynological and proximal chemical composition of bee pollen commercial of Merida, Venezuela. The pollen collected by the bees is harvested with pollen traps before it enters the hive, dehydrated and marketed as bee pollen. It is a nutritional and medicinal product, its composition varies according to the botanical origin, which is perceived by the different colors of the pollen balls. Proximal chemical and palynological analyzes were carried out on three commercial brands of bee pollen from the Main Market of Mérida to determine their nutritional value. Eleven types of pollen were detected, belonging to nine botanical families: Arecaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Caesalpinaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rosaceae, and Solanaceae. Variations in the percentage content (g/100 g pollen) of carbohydrates (62.6 – 64.8), ashes (2.0 – 2.8), moisture (6.9 – 7.3), lipids (5.7 – 6.2) and proteins (20.0 – 22.7) corresponded to ranges reported in the literature.

Keywords: Bee pollen; Chemical composition; Nutritional value; Palynology

Introducción

La biodiversidad de los agroecosistemas satisface las preferencias nutricionales de diferentes especies de abejas, por ello protege a los polinizadores en la selección de las plantas pecoreadas para satisfacer requerimientos nutricionales apícolas interespecíficos¹. Más del 90% de las plantas cultivadas son polinizadas por abejas, fundamental para la seguridad alimentaria, el sustento de apicultores y granjeros, la cultura ancestral y la estabilidad ambiental². Los carbohidratos dietarios de las abejas proceden del néctar, de la mielada y del polen, pero los lípidos y las proteínas mayormente del polen, también los esteroides requeridos para la metamorfosis. Estos nutrientes polínicos varían hasta 60% de lípidos, y 20% de proteínas³. Brodschneider y Crailsheim⁴ sugirieron desde el año 2010 que la calidad del polen se refiere a su contenido de proteínas, debido al impacto nutricional en la fisiología y la supervivencia de la abeja adulta. El polen liso es anemófilo pero el polen con superficie ornamentada es entomófilo⁵. Las abejas corbiculadas

como *Apis mellifera* recolectan el polen fecundante de las flores⁶, lo mezclan con saliva y néctar para formar pelotas de polen que transportan en las corbículas de sus patas traseras hasta la colmena, donde se procesa para formar el pan de abejas depositado en los panales. El polen comercial se obtiene con una trampa colocada en la entrada de la colmena, la cual recolecta las pelotas de polen en una caja antes que la abeja entre a la colmena. El polen fresco recolectado de las trampas es deshidratado para prevenir su deterioro microbiano y extender su vida útil durante la comercialización⁷. Sin embargo, temperaturas de 45°C pueden ocasionar disminución del contenido de carotenos y vitamina C⁸.

Este producto de las abejas es el más proteico de la colmena, muy rico en nutrientes y con aplicaciones terapéuticas. Es conocida su actividad antitirocinasa, la cual se estudió por metabólica y se atribuyó a las fenolamidas⁹. La estructura del polen consiste en una cubierta muy resistente a base del biopolímero esporopolenina, la cual recubre el material genético que

formará el tubo polínico en la fecundación del óvulo. Por este motivo, la absorción de sus nutrientes en humanos es baja y afecta su digestibilidad y biodisponibilidad¹⁰. La fermentación afecta la pared celular del polen¹¹, pero sólo la metabolómica pudo generar un perfil global para caracterizar alimentos fermentados¹². Las transformaciones de metabolitos durante la fermentación del polen fueron elucidadas usando metabolómica focalizada con cromatografía líquida de ultra-performance, ionización por electro-espray y espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS)¹³.

En un estudio previo se analizaron cuatro fracciones de polen fresco de Páramo de Misintá, Mérida según su color (amarillo, anaranjado, ocre y verdoso)¹⁴. En esta investigación se evaluó la composición química proximal (cenizas, grasa, humedad, proteínas y carbohidratos) y el origen botánico de tres marcas de polen apícola comercial deshidratado adquiridas en el Mercado Principal de la ciudad de Mérida.

Materiales y métodos

Análisis químicos

Una fracción del polen apícola se utilizó para separación en colores y observación al microscopio. Otra fracción del polen apícola se molió en un mortero de porcelana y se conservó congelado hasta su análisis. Los análisis químicos proximales se realizaron por triplicado, siguiendo métodos gravimétricos para determinar cenizas¹⁵, humedad¹⁶, lípidos¹⁷ y proteínas¹⁸. La humedad se determinó por secado en la estufa a 100°C, utilizando 2,0 ± 0,1 g de polen molido. Las cenizas se obtuvieron por incineración de 2,0 ± 0,1 g. El extracto etéreo se obtuvo por extracción por reflujo de 2,0 ± 0,1 g de polen molido con 25 mL de éter de petróleo (JT Baker, Xlostoc, México). El contenido de nitrógeno se midió con el método de microKjeldahal, realizando la digestión de 100 ± 10 mg de polen molido con ácido sulfúrico (Sigma, St. Louis MO), seguidos de destilación, recolección y titulación con ácido clorhídrico 0,02N (Sigma, St. Louis MO). El porcentaje de proteínas se calculó utilizando el factor 6,25. El contenido porcentual de carbohidratos se calculó por diferencia de los contenidos, de cenizas, humedad, lípidos y proteínas.

Origen botánico de las muestras de polen apícola

Se utilizó el método de polen natural con una muestra representativa de 2 g de cada marca de polen, con aproximadamente 300 pellets o pelotas, separados por color lavados con etanol (Sigma, St. Louis MO) diluido al 50%, y montados con gelatina glicerina¹⁹. Las identificaciones se realizaron según observaciones morfológicas del polen observadas a 400x y comparaciones con referencias palinológicas^{20,21}.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedios ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) una vía, con comparación de medias por la prueba can las diferencias significativas entre las muestras para $p < 0,05$.

Resultados y discusión

En las dos tablas a continuación se muestran los resultados obtenidos en las tres marcas de polen apícola deshidratado comercializado en Mérida. En la tabla 1, la composición química porcentual varió así: 1. Carbohidratos (62,6 – 64,8), 2. Cenizas (1,8 – 2,3), 3. Humedad (6,9 – 7,3), 4. Lípidos (5,7 – 6,2) y 5. Proteínas (20,4 – 22,7). En más de 100 investigaciones realizadas sobre polen apícola, se encontraron concentraciones porcentuales de 54,22 carbohidratos (18,50–84,25%), 13,41 cenizas (2,77–28,49%), 5,31 lípidos (0,41–13,50%) y 21,30 proteínas (4,50–40,7%)²⁴, las cuales son inclusivas para los valores obtenidos en las tres muestras analizadas. Se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa para el contenido de cenizas, pero si para el contenido de carbohidratos y de proteínas. La marca 1 de Barinas presentó mayor contenido de lípidos que las dos marcas de Mérida. La humedad de la marca 1 fue diferente a la marca 3, pero la marca 2 no se diferenció de ambas. La composición botánica de estas muestras puede explicar las diferencias y similitudes observadas, aunque no sea polen monofloral sino combinado de varios tipos de plantas.

Tabla 1. Composición química de tres marcas de polen apícola comercializado en Mérida.

Parámetro proximal (g/100 g polen)	Marca 1	Marca 2	Marca 3
Carbohidratos	62,6 ± 0,15 ^a	64,8 ± 0,20 ^b	64,0 ± 0,09 ^c
Cenizas	2,3 ± 0,05 ^a	2,0 ± 0,12 ^a	2,8 ± 0,14 ^a
Humedad	6,9 ± 0,09 ^a	7,1 ± 0,14 ^{ab}	7,3 ± 0,08 ^b
Lípidos	6,2 ± 0,08 ^b	5,7 ± 0,12 ^a	5,9 ± 0,05 ^a
Proteínas	22,7 ± 0,09 ^a	20,4 ± 0,10 ^b	20,0 ± 0,10 ^c

Se presentan promedios ± desviación estándar. Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencia significativa entre marcas de polen con ese parámetro por ANOVA una vía, post hoc Scheffe $p < 0,05$.

En la tabla 2 se presentan los colores de los tipos de polen identificados: *Cocos nucifera*, *Baccharis*, *Eupatorium*, *Sene-cio*, *Brassica napus*, *Bauhinia*, *Machaerium*, *Hyptis*, *Eucalyptus*, *Rubus*, *Datura* y sus correspondientes familias botánicas. El polen de la marca 2 fue producido con tres especies florales, en contraste con las marcas 1 y 3 con número de especies dos veces mayor. Ninguna marca fue de polen monofloral.

post hoc Scheffé²² utilizando el software SPSS 12.0²³. Se indican más de 2000 abejas europeas²⁵ y más de 600 especies de abejas sin aguijón²⁶. Todas estas abejas recolectan polen, lo procesan en sus nidos y tienen potencial uso humano. A medida que los beneficios del polen apícola se conozcan mejor y se difundan sus propiedades nutricionales y medicinales, sección del polen apícola requiere normas de control de calidad. La norma de polen apícola de un país vecino como Brasil fue elaborada en el año 2001²⁷.

La subcomisión de Alimentos (CT10) de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) no ha elaborado nor-

Tabla 2. Composición floral de polen comercial recolectado por *Apis mellifera*.

Origen botánico	Color	Porcentaje en 2 g de polen		
		Marca 1	Marca 2	Marca 3
ARECACEAE <i>Cocos nucifera</i> 'coco'	crema ocre	2	-	-
ASTERACEAE <i>Baccharis</i> 'niquitao'	crema	21	-	4
ASTERACEAE <i>Eupatorium</i> 'cruceta'	gris claro	47	-	-
ASTERACEAE <i>Senecio</i> 'cineraria'	anaranjado	-	-	26
BRASSICACEAE <i>Brassica napus</i> 'nabo'	amarillo	-	85	38
CAESALPINIACEAE <i>Bauhinia</i> 'casco de vaca'	crema ocre	10	-	-
FABACEAE <i>Machaerium</i> 'cascarón'	gris crema	12	-	-
LAMIACEAE <i>Hyptis</i> 'mastranto'	amarillo claro	8	-	-
MYRTACEAE <i>Eucalyptus</i> 'eucalipto'	pardo	-	14	13
ROSACEAE <i>Rubus</i> 'mora'	gris verdoso	-	1	7
SOLANACEAE <i>Datura</i> 'trompeta de ángel'	crema claro	-	-	12

mas de control de calidad para el polen apícola; sin embargo, el polen apícola es comercializado y consumido en Venezuela. Esto es un problema porque el productor, el comerciante y el consumidor no están protegidos. Así como hay necesidad de normas para miel de abejas sin aguijón en Venezuela²⁸, también se necesitan normas para los demás productos de la colmena recolectados por las abejas, como el polen y el propóleos²⁹. La lentitud operativa para revisar y actualizar las dos normas de miel venezolanas, elaboradas en el año 1984^{30,31} hace casi 40 años, retrasa la aplicación de resultados experimentales de 500 mieles publicados en el año 1994³². La inexplicable demora se expuso este año en la revista española Vida Apícola³³.

Estudios recientes han incorporado este superalimento para enriquecer a base de harina de trigo como confitería chak-chak³⁴, galletas³⁵ y pastas³⁶. El polen apícola es un ingrediente que mejoró la calidad y las propiedades funcionales de las galletas, disminuyó su contenido de carbohidratos y aumentó el contenido de cenizas, lípidos, proteínas y compuestos fenólicos totales. Si bien no conocemos las técnicas de secado de las tres marcas de polen comercial analizadas, en un estudio de polen checo se demostró que la liofilización conserva los compuestos orgánicos volátiles y reduce el deterioro de compuestos bioactivos como los polifenoles³⁷. Asimismo, las condiciones de almacenamiento postcosecha modificaron la calidad del polen apícola³⁸.

Conclusiones y recomendaciones

Los análisis químicos y microscópicos del polen apícola permitieron caracterizar tres marcas comercializadas en el estado Mérida. Este estudio de macro componentes proximales (carbohidratos, cenizas, humedad, lípidos y proteínas) es una referencia útil para la propuesta de normas de calidad venezolanas para el polen apícola, y podría beneficiarse con estudios futuros de microcomponentes (compuestos fenólicos, flavonoides, minerales, vitaminas), validación de actividad biológica (antioxidante) y disponibilidad. Los múltiples atributos medicinales del polen apícola ameritan su inclusión en las Farmacopeas, como alimento medicinal para controlar el progreso de numerosas patologías. El origen botánico del polen evaluado por palinología es un análisis que complementa el perfil químico, y podría explicar algunos atributos de actividad biológica.

Agradecimientos

Al CDCHT-ULA, por el financiamiento recibido para el grupo de investigación CVI-ADG-04-97. A la Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia por asistencia bibliográfica.

Referencias

1. A Barraud, L Barascou, V Lefebvre, D Sene, Y Le Conte, C Alaux, *et al.* Variations in Nutritional Requirements Across Bee Species. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, **6**, 824750 (2022). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.824750>
2. SG Potts, V Imperatriz-Fonseca, HT Ngo, MA Aizen, JC Biesmeijer, TD Breeze, *et al.* Safeguarding pollinators and their values

- to human well-being. **Nature**, **540**, 220-229 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature20588>
3. AD Vaudo, JF Tooker, HM Patch, DJ Biddinger, M Coccia, MK Crone, *et al.* Pollen protein: lipid macronutrient ratios may guide broad patterns of bee species floral preferences. **Insects**, **11**, 132 (2020). <https://doi.org/10.3390/insects11020132>
 4. R Brodschneider, K Crailsheim. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, **41**, 278-294 (2010). <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
 5. P Font Quer. Diccionario de Botánica. 7ª ed. Barcelona: Editorial Labor SA; 1979.
 6. Nilsson S, Praglowski J. Erdtman's Handbook of Palynology. 2nd Ed. © Munksgaard, Trykkeriet Viborg, Denmark (1992).
 7. MGR Campos, S Bogdanov, L Bicudo de Almeida-Muradian, T Szczesna, Y Mancebo, C Frigerio, *et al.* Pollen composition and standardisation of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, **47**, 154-161 (2008). <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
 8. J Barajas, M Cortes-Rodriguez, E Rodríguez-Sandoval. Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of Colombia. **Journal of Food Processing and Engineering**, **35**, 134-148 (2012). <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1616752>
 9. X Zhang, M Yu, X Zhu, R Liu, Q Lu. Metabolomics reveals that phenolamides are the main chemical components contributing to the anti-tyrosinase activity of bee pollen **Food Chemistry**, **389**, 133071 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133071>
 10. AZ Kostic, DD Milincic, NS Stanisavljevic, UM Gasic, S Levic, MO Kojic, *et al.* Polyphenol bioaccessibility and antioxidant properties of in vitro digested spray-dried thermally-treated skimmed goat milk enriched with pollen. **Food Chemistry**, **351**, 129310 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129310>
 11. C Salazar-Gonzalez, C Diaz-Moreno. The nutritional and bio-active aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. **Journal of Apicultural Research**, **55**, 161-175 (2016). <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1205824>
 12. DE Lee, GR Shin, S Lee, ES Jang, HW Shin, BS Moon, *et al.* Metabolomics reveal that amino acids are the main contributors to antioxidant activity in wheat and rice gochujangs (Korean fermented red pepper paste). **Food Research International**, **87**, 10-17 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.015>
 13. H Zhang, Q Lu, R Liu. Widely targeted metabolomics analysis reveals the effect of fermentation on the chemical composition of bee pollen. **Food Chemistry**, **375**, 131908 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131908>
 14. Vit P, Santiago B. Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de Los Andes venezolanos. **Archivos Latinamericanos de Nutrición**, **58**, 411-415 (2008).
 15. AOAC International. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 19th Edition. Official Method 920.021 Ash. © Association of Official Analytical Chemists, INC, Arlington VA, USA (2012).
 16. AOAC International. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 19th Edition. Official Method 930.15 Moisture. © Association of Official Analytical Chemists, INC, Arlington VA, USA (2012).
 17. AOAC International. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 19th Edition. Official Method 948.22 Lipids. © Association of Official Analytical Chemists, INC, Arlington VA, USA (2012).
 18. AOAC International. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 19th Edition. Official Method 990.03 Proteins. © Association of Official Analytical Chemists, INC, Arlington VA, USA (2012).
 19. LB Almeida-Muradian, LC Pamplona, S Coimbra, M Barth. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, **18**, 105-111 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
 20. P Vit. Melissopalynology, Venezuela. © APIBA-CDCHT, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (2005).
 21. P Vit, G Ricciardelli D'Albore, OM Barth, M Peña-Vera, E Pérez-Pérez. Characterization of pot-pollen from Southern Venezuela. pp. 361-375. En: *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*. Eds. P Vit, SRM Pedro, DW Roubik. Chapter 26. © Springer Nature; Cham, Switzerland (2018).
 22. AJ Duncan. Control de Calidad y Producción Industrial. © Alfaomega, Barcelona, España (1990).
 23. SPSS for Windows. Base system user's guide, release12.0. © SPSS Inc, Chicago, USA.
 24. M Thakur, N Nanda. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science & Technology**, **98**, 82-106 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>
 25. Rasmont P, Devallez J, Pauly A, Michez D, Radchenko V.G. Addition to the checklist of IUCN European wild bees (*Hymenoptera: Apoidea*). **Annales de la Société Entomologique de France**, **53**, 17-32 (2017). <https://doi.org/10.1080/00379271.2017.1307696>
 26. DW Roubik, C Vergara. Geographical distribution of bees: a history and an update. pp. 11-13. En: *Good beekeeping practices for sustainable apiculture*. Eds. FAO, IZSLT, Apimondia and CAAS, Animal Production and Health Guidelines, No. 25. Chapter 4. © FAO; Rome, Italy (2021) Disponible en: <https://www.fao.org/3/cb5353en/cb5353en.pdf> Consulta: 10 de agosto 2022.
 27. BRASIL. 2001. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. En: Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.. Legislação. SisLegis - Sistema de Consulta à Legislação.
 28. P Vit, E Enríquez, OM Barth, AH Matsuda, LB Almeida-Muradian. Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. **MedULA**, **15(2)**, 36-42 (2006).
 29. P Vit. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, **35(2)**, 32-39 (2004). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772004000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es Consulta: 15 de agosto 2022.

30. COVENIN. Comisión Venezolana de normas Industriales. Norma 2136-84. Miel de Abejas. Métodos de Ensayo. SENCAMER. Venezuela (1984).
31. COVENIN. Comisión Venezolana de normas Industriales. Norma 2191-84. Miel de Abejas. SENCAMER. Venezuela (1984).
32. P Vit, I González de Martorelli, S López-Palacios S. Clasificación de mieles comerciales venezolanas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, **44(1)**, 47-56 (1994).
33. P Vit, D Titera. Evaluación de etiquetas de miel de abejas producida en la República Checa: Una forma de comunicación entre apicultores y consumidores. **Vida Apícola**, **234**, 26-34 (2022).
34. A Chernenkova, S Leonova, V Chernykh, E Chernenkov. Influence of biologically active raw materials on rheological properties of flour confectionery products. **Acta Biologica Szegediensis**, **63**, 195-205 (2019). <https://doi.org/10.14232/abs.2019.2.195-205>
35. AN Dunder. Total phenolic and antioxidant bioaccessibilities of cookies enriched with bee pollen. **Journal of Food Processing and Preservation**, e16085, 11 páginas (2021). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16085>
36. M Brochard, P Correia, MJ Barroca, RPF Guiné. Development of a new pasta product by the incorporation of chestnut flour and bee pollen. **Applied Sciences (Switzerland)** **11**, 6617 (2021).
37. M Keskin, A Özkök. Effects of drying techniques on chemical composition and volatile constituents of bee pollen. **Czech Journal of Food Sciences**, **38**, 203-208 (2020).
38. O Anjos, V Paula, T Delgado, L Estevinho. Influence of the storage conditions on the quality of bee pollen. **Zemdirbyste**, **106**, 87-94 (2019).