

Estudio de la biodegradación de acetato de dodecilamina

López-Santiago Norma Ruth , López Hernández Leiny Karla, Gutiérrez Ruiz Margarita,
Ceniceros Gómez Águeda Elena, Martínez Jardines Luis Gerardo, Morales Zamudio Enrique

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, Laboratorio de Biogeoquímica
Ambiental Av. Universidad 3000, México, D.F., CP 04510.

nruthls@yahoo.com

Fecha de aceptación: 18 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

En este trabajo se examina la resistencia de la microalga *Chlorella vulgaris* al acetato de dodecilamina, uno de los componentes en mayor proporción en los agentes de flotación. Los resultados obtenidos del estudio muestran una disminución del 50% de la concentración del reactivo tras 24 horas de bioexposición, y la no detección luego de 60 horas. Asimismo, se observa un aumento en la biomasa de la microalga después de la adición de acetato de dodecilamina seguido de una fase de declinación como resultado de la aceleración del ciclo natural de vida de la microalga. El producto de degradación fue caracterizado por introducción directa a una fuente de ionización ESI con metanol y espectrometría de masas y un ensayo a la gota. Ambas pruebas señalan a un compuesto nitro como el producto más probable en la degradación de la amina por *Chlorella vulgaris*.

Palabras clave: agente de flotación, acetato de dodecilamina, *Chlorella vulgaris*, CLAR-MS.

ABSTRACT

This work examines the resistance of the microalga *Chlorella vulgaris* to dodecylamine acetate, one of the components in a higher proportion in the flotation agents. The results of the study show a reduction of 50% of the concentration of acetate dodecylamine after 24 hours of bioexposicion, and the non-detection after 60 hours. An increase in the biomass of the microalga is also observed after addition of acetate of dodecylamine followed by a phase of decline as a result of the acceleration of the natural cycle of life of the microalga. The degradation product was characterized from by direct introduction to a source of ionization ESI with methanol and mass spectrometry and a trial to drop. Both tests point to a nitro compound as the most probable product in the degradation of the amine by *Chlorella vulgaris*.

Key words: flotation agents, dodecylamine acetate, *Chlorella vulgaris*, HPLC-MS

INTRODUCCIÓN

En la industria minera la composición del mineral es un factor importante en la calidad del mismo, en los minerales de hierro una de las impurezas más importantes es el silicio, cuyo contenido, de acuerdo a estándares internacionales, no debe exceder el 2% para su comercialización, este valor puede ser superado en función del banco explotado. Ante esto en la industria minera se ha planteado una etapa de eliminación de silicio que acompaña al mineral a través de un sistema de flotación que utiliza aminas alifáticas, como agentes colectores (Sosa, 2014). Durante el proceso el agente de flotación se agrega en pequeña porción (250 g de agente de flotación/1 Ton de mineral) no obstante su liberación y acumulación podría causar un efecto negativo en agua y suelos.

Las aminas comercialmente disponibles para emplearse en los procesos de flotación se fabrican principalmente de productos naturales, por lo que comúnmente contienen una mezcla de varias aminas alifáticas con longitudes de cadena de carbono diferentes, usualmente entre C6–C18. En respuesta a este problema de contaminación se propone el uso de agentes biológicos para el control de las zonas afectadas.

La especie *Chlorella vulgaris* es una microalga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro de entre 2 y 10 micras (Grooth *et al.* 1985). Esta microalga se destaca por poseer múltiples aplicaciones entre las que se encuentran el uso de la biomasa como combustible suplemento alimenticio (Jeon, 2010; Morris 1999), y como materia para bioremediación de suelos con metales pesados, sin embargo, dado las características de este organismo se examina la posibilidad de extender su aplicación al proceso de remediación de agua y suelos contaminados por efluentes orgánicos.

El análisis reciente de un agente de flotación reveló que está conformado de una mezcla de acetatos de aminas, siendo los isómeros de dodecilamina aquellos en mayor proporción (85.57%), seguidos de los isómeros de decilamina con un porcentaje del 8.18% en peso (Sosa, 2014).

El presente trabajo evalúa la capacidad de la especie *Chlorella vulgaris* para responder al contacto con la amina alifática de doce carbonos. La bioexposición de los cultivos líquidos permite examinar su resistencia en función del tipo y concentración de amina cuyo resultado puede ser usado como base para la estrategia de remediación de agua y suelo.

METODOLOGÍA

Reactivos y materiales. Estándar de dodecilamina (C₁₂) con una pureza de 98%; 4-cloro-7-nitrobenzofurazan (cloro-NBD) con una pureza de 98%, ambos de Sigma Aldrich, ácido acético glacial también de Sigma Aldrich, metanol (MetOH) y acetonitrilo (ACN) J.T. Baker grado HPLC. Agua desionizada de un sistema Millipore MilliQ, micropipetas Pipet-Life XLS de volumen variable (500-5000µL, 100-1000 µL) y viales de vidrio de diferente volumen (4, 8, 12 mL.). Se empleó una parrilla de agitación convencional.

Curvas de crecimiento. La inoculación de la especie *Chlorella vulgaris* se realiza en medio Bristol en condiciones estériles a partir de un cultivo sólido. El crecimiento de los mismos se realizó a temperatura ambiente bajo iluminación artificial, el seguimiento del crecimiento se llevó a cabo mediante el uso de un Espectrofotómetro UV-Vis Hewlett Packard, Modelo 8453 con control de temperatura, Hewlett Packard Modelo 89090A, a una longitud de onda de 670 nm.

Bioensayos. El estándar de dodecilamina se neutraliza al 50% con ácido acético para favorecer su dilución en agua y posteriormente se adiciona en donde corresponda para una concentración final de 5 mg/L. Se realizaron por duplicado 6 bioensayos a diferentes tiempos de exposición 6, 12, 24, 36, 48 y 60 horas; cada ensayo se conformó por los siguientes experimentos:

- a. **Blanco de estándar.** Disolución de acetato de dodecilamina.
- b. **Blanco microalgas.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*.
- c. **Referencia blanco adicionado 1.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y ácido acético en la misma concentración que el bioensayo.
- d. **Referencia blanco adicionado 2.** Medio de cultivo estéril y acetato de dodecilamina.
- e. **Bioensayo.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de dodecilamina.

Análisis por Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (CLAR). Para el análisis de la amina remanente después de los bioensayos se efectuó una reacción de derivatización con 4-cloro-7-nitrobenzofurazona de acuerdo con lo reportado por Hao y su grupo de investigación (Hao, Lwin, Buckard, & Woodcock, 2004), la cual se realizó en un calentador de multi-bloques Barnstead International modelo 2052. Para la separación analítica se utilizó una Columna Hypersil Gold de 150x4.6 mm y un sistema de bombeo Waters 410 con un controlador Water Automated Gradient Controller acoplados a un detector de Ultravioleta-Visible, Spectra Focus de Thermo separation Products. La fase móvil fue Acetonitrilo:Agua (a pH 4.5 con ácido acético 40mM) en proporción 85:15. Se detectó a 470 nm. Se inyectó un volumen de 20 μ L.

Caracterización. Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Advion Expression S, por introducción directa a una fuente de ionización ESI, con un flujo de 0.2 mL/min de metanol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de crecimiento

El crecimiento de la microalga en medio líquido se monitoreó por 35 días mediante la determinación de la absorbancia del cultivo en función del tiempo, en la Figura 1 se ilustra que el tiempo en que las células se ajustan al medio (conocida como *fase lag*) es inferior a 5 días, mientras que la *fase log*, periodo durante el cual las células se dividen en función de la cantidad de nutrientes en el medio, avanza hasta casi los 35 días, en esta etapa la reproducción celular alcanza su máximo puesto que ha adsorbido casi en su totalidad los nutrientes del medio. Los dos últimos puntos indican que el cultivo ha alcanzado una fase estacionaria, durante la cual se obtuvieron las alícuotas para los bioensayos, en esta etapa, el cultivo no presenta variaciones en la cantidad de biomasa por lo que cualquier crecimiento o decrecimiento se deberá exclusivamente al efecto de la adición del acetato de dodecilamina.

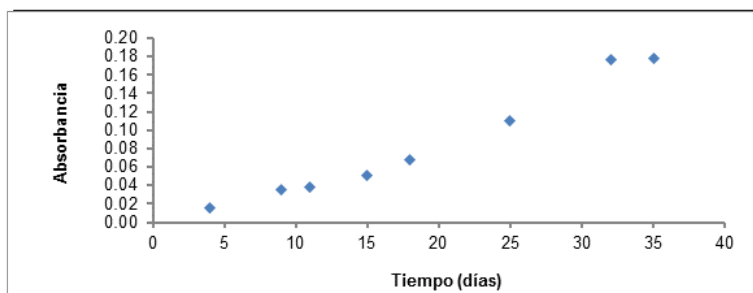


Figura 1. Curva de crecimiento de un cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*

Bioensayo con *Chlorella vulgaris*

Análisis cualitativo. Los cromatogramas obtenidos del análisis del blanco adicionado, las referencias y el bioensayo se presentan por separado en la Figura 2, la señal característica del derivado de la amina se presenta como continua en un tiempo de retención de entre 7 y 8 minutos.

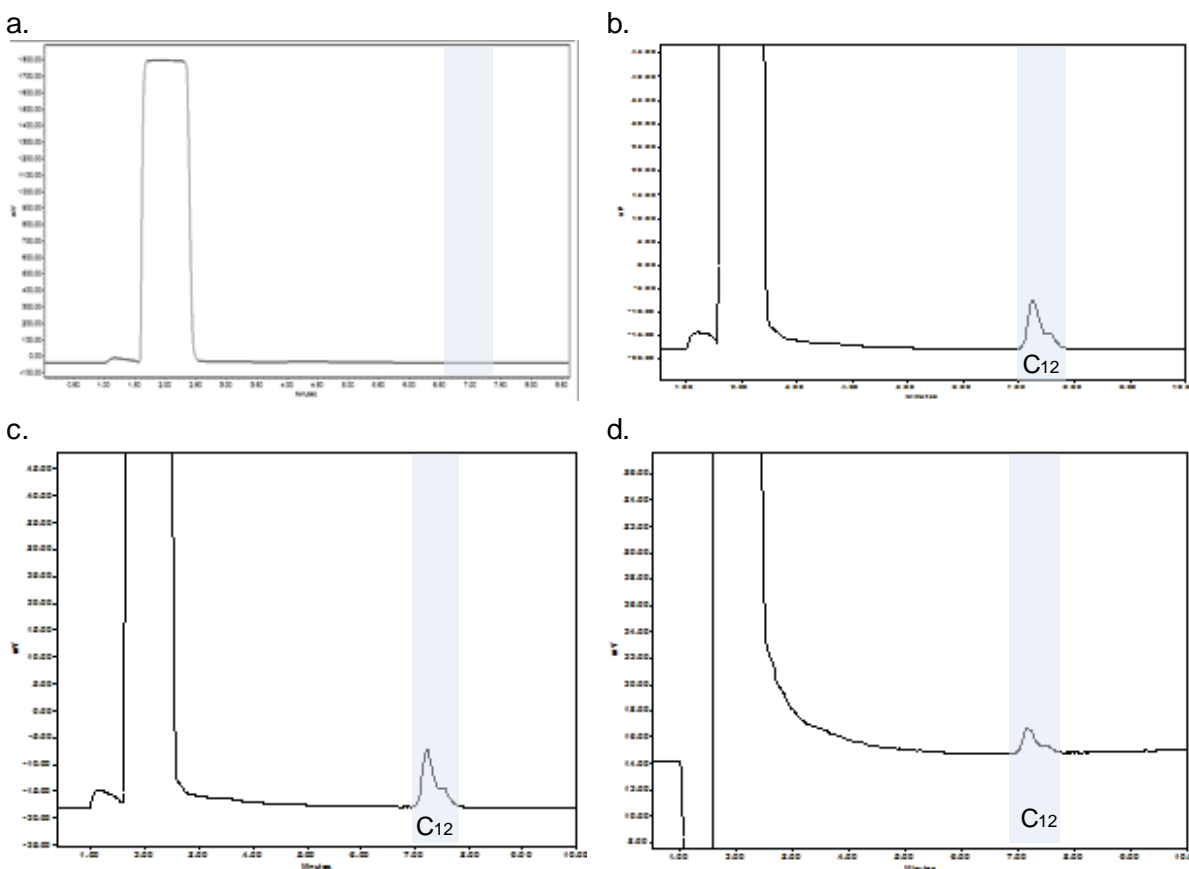


Figura 2. Cromatogramas. a. Blanco (sólo cultivo de microalgas), b. Estándar de acetato de dodecilamina c. Blanco adicionado 2: medio de cultivo estéril y acetato de dodecilamina y d. Bioensayo de 48 hrs

En la Figura 3 se comparan los cromatogramas obtenidos del blanco microalgas, el estándar de cuantificación, el blanco adicionado 2 (medio de cultivo y amina expuesto a las mismas condiciones del bioensayo) y el bioensayo correspondiente a 48 horas de exposición.

El blanco sólo con el cultivo de microalgas (verde) no presenta la señal propia del derivado de la amina, por lo que se deduce que en el medio no existe ninguna especie que afecte las condiciones del bioensayo ni sea causa de falsos positivos. Por su parte, el estándar de acetato de dodecilamina (en azul marino) presenta un área similar al blanco adicionado (en negro) demostrando que cualquier cambio en la concentración del acetato de dodecilamina ($A-C_{12}NH_2$) se debe únicamente a la interacción que ocurre entre ella y la microalga.

Finalmente, el área del pico correspondiente a la amina en el bioensayo (azul truchesa) es menor al presentado en el estándar por lo que es evidente una disminución importante de la concentración de acetato de dodecilamina.

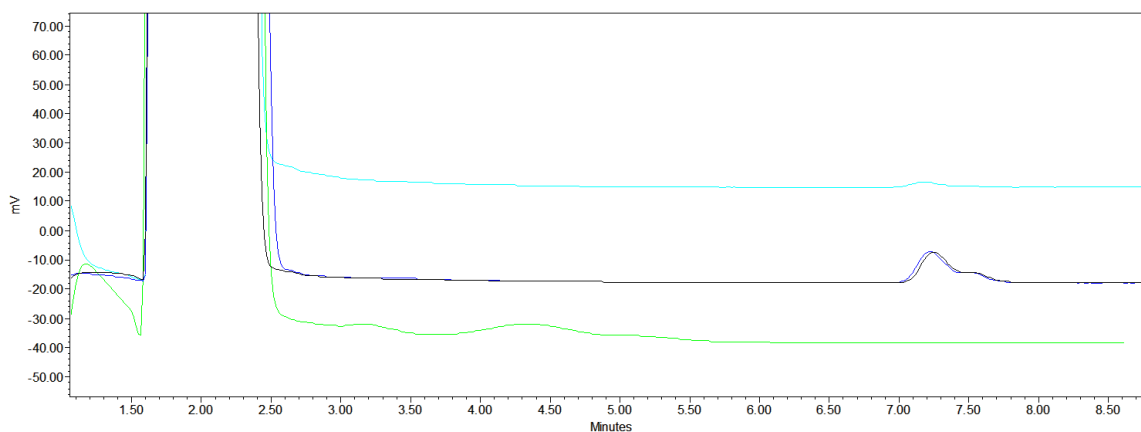


Figura 3. Comparación de los cromatogramas del blanco del cultivo de algas (verde), estándar (azul marino), blanco adicionado (negro) y bioensayo (azul turquesa)

Análisis cuantitativo. El análisis cuantitativo se realiza con base en el estándar de acetato de dodecilamina (estándar de cuantificación), la Figura 4 presentan el resultado de las exposiciones de *Chlorella vulgaris* al A-C₁₂NH₂ en función del tiempo.

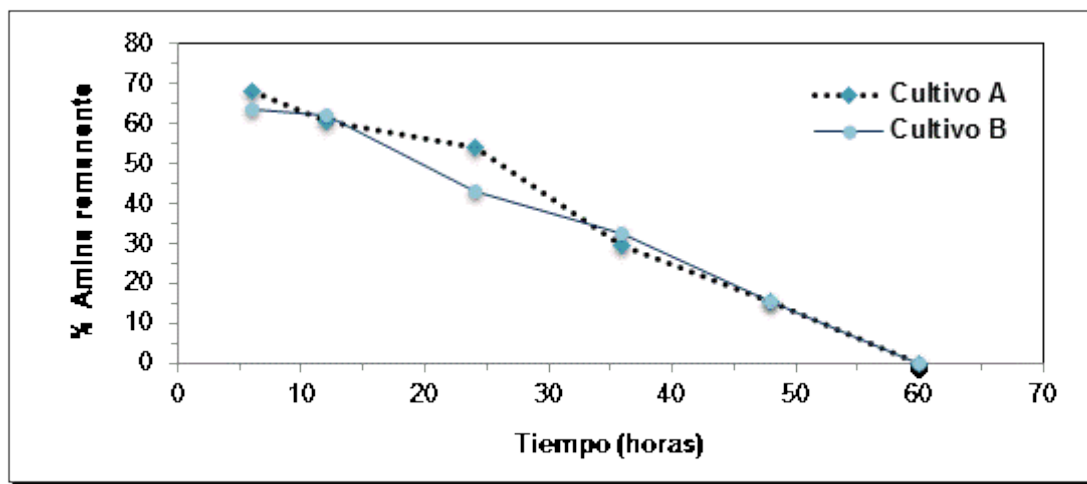


Figura 4. Amina remanente después del bioensayo en función del tiempo

La determinación de amina a las 6 horas de exposición muestra una disminución de aproximadamente el 35% de la concentración original de A-C₁₂NH₂. A las 24 horas se observa que la concentración de amina ha disminuido prácticamente a la mitad, este efecto puede deberse a dos causas aparentes; la primera de ellas sugiere la degradación de A-C₁₂NH₂ a través de *Chlorella vulgaris* mientras que la segunda plantea una asimilación de dodecilamina como fuente de carbono y nitrógeno. La segunda posibilidad plantea también un aumento de biomasa del cultivo en función del tiempo, efecto confirmado en la Figura 5, donde se observa inicialmente un aumento de la cantidad de microalgas interpretada como una extensión de la *fase log* del crecimiento microbiano dado que se adicionó al medio una nueva fuente de nutrientes que permite que las células aún se desarrollen, no obstante a diferencia de un crecimiento microbiano típico, no se muestra una fase estacionaria sino que alrededor de las 24 horas al término de la *fase log*, comienza la fase de declinación, cuando el número de muertes de las células supera el número de nuevas células formadas, por lo que el hecho de adicionar

dodecilamina no sólo impulsa el crecimiento microbiano, sino también acelera el ciclo natural de vida del cultivo.

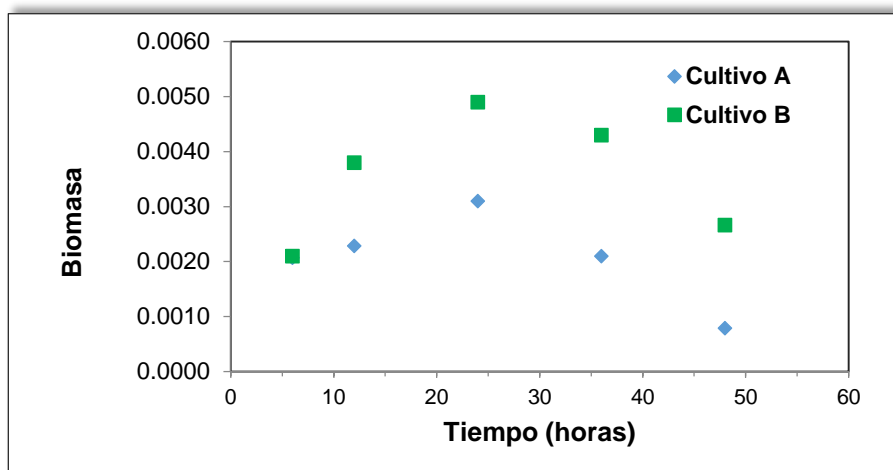


Figura 5. Biomasa de *Chlorella vulgaris* después del bioensayo con dodecilamina en función del tiempo

Por otro lado se observa que tras 60 horas de bioexposición ya no es posible detectar amina-C12 en los ensayos.

Caracterización del producto de degradación

La literatura reporta que los cultivos de microalgas son capaces de transformar alquilaminas por reacciones oxidativas para formar aldehído o bien compuestos nitro (Araujo, Yoshida, Takahashi, & Stapelfeldt, 2011). En la Figura 6 se presentan los espectros de masas del acetato de dodecilamina obtenido por ionización química (ESI) con MetOH. Cuando la fuente es la ionización química en los espectros se observan con mayor frecuencia los iones moleculares y aductos, esta es una consideración importante en la interpretación del espectro. Las aminas primarias suelen generar el ión $[M+1]^+$, es decir $[R-NH_3]^+$, en el espectro de dodecilamina, $CH_3(CH_2)_{10}CH_2NH_2$, cuya masa molecular es 185 uma (M) se observa el pico base en 185.9 uma (M) equivalente a 186 m/z esto es el ión $[M+1]^+$, el siguiente fragmento característico es el ión en 217.8, equivalente a 218 m/z correspondiente a formación del ión $[M + H + CH_3OH]^+$ (Nova García, 2015). Cabe destacar que en este espectro no se observa el ácido acético debido a que sólo se muestra el positivo (el ácido sólo se aprecia en el negativo). Los picos que se presentan en 226.7, 298.6 y 226.7 m/z son característicos de clusters de metanol formados al entrar con la fuente de ionización dado que no existe una separación previa en el sistema.

La Figura 7 ilustra el espectro de masas de la muestra sometida a 24 horas de bioexposición, en él se observa un pico base en 214.2 m/z con una intensidad de 99% correspondiente a $[M+1]$ por tanto la masa molecular es de 213 uma y al ser una masa impar es evidente que el compuesto contiene nitrógeno. El siguiente pico importante es el que se presenta en 246.3 m/z que corresponde al aducto formado por el compuesto, el disolvente metanol y un protón adicionado por la ionización del disolvente, es decir $[compuesto + CH_3OH + H]^+$. Aunado a lo anterior se aprecia aún el pico en 186.2 m/z correspondiente a la amina. Un estudio anterior indicó que la oxidación de la amina con MnO_2 conduce a la formación de dos productos uno con un grupo carbonilo y otro un grupo funcional nitro, $-NO_2$, (López, et al, 2014), sin embargo una prueba de identificación con el reactivo de Fehling dan negativo a aldehídos, por lo que puede sugerirse que la estructura del compuesto tiene un grupo funcional nitro.

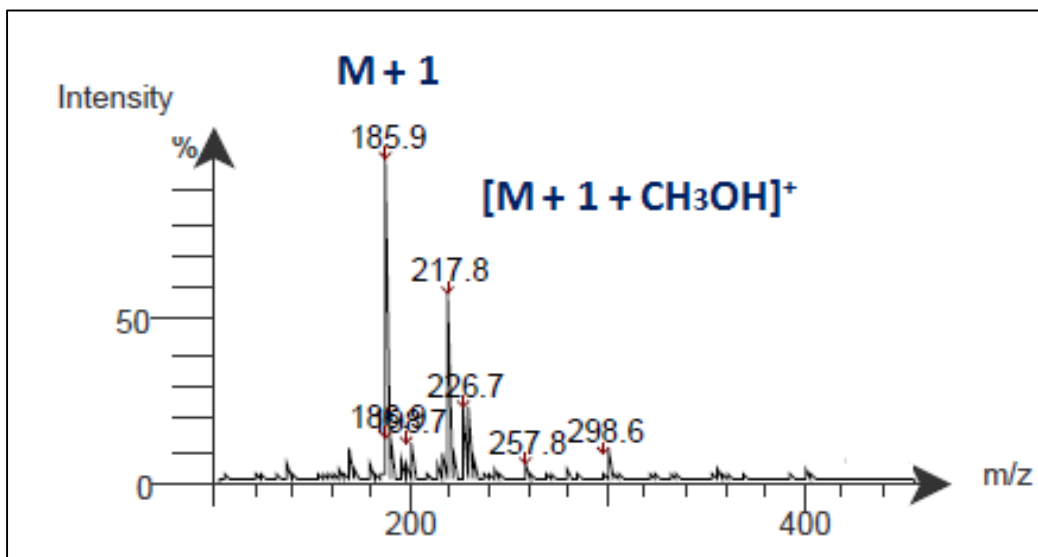


Figura 5. Espectro de masas de acetato de dodecilamina: Ionización química con MetOH

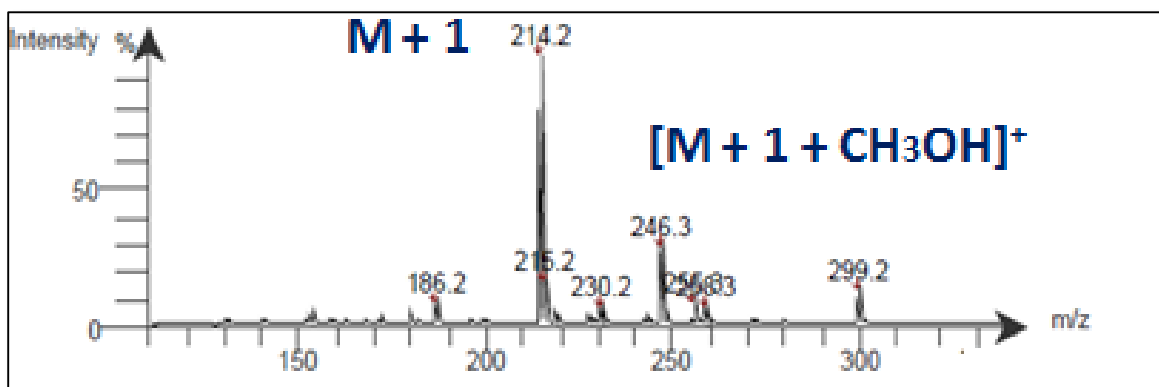


Figura 6. Espectro de masas del producto de degradación: Ionización química ESI con MetOH

CONCLUSIONES

La bioexposición de la especie *Chlorella vulgaris* a uno de los componentes en mayor proporción en los agentes de flotación mostró una disminución importante de la concentración del acetato de dodecilamina en función del tiempo pasando de una concentración inicial de 5 mg/L, a una reducción de la misma a la mitad a las 24 horas de exposición, este efecto se explica mediante la degradación del acetato de dodecilamina por acción de la microalga; y a no poder ser detectada después de 60 horas de exposición.

Con base en estudios anteriores el producto de degradación puede ser uno con un grupo carbonilo y otro un grupo funcional nitro, el espectro de masas y pruebas a la gota señalan al compuesto con grupo funcional nitro como el más probable, sin embargo, se propone realizar técnicas de caracterización adicionales para determinar la estructura final del producto.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la sección 024 de la AAPAUNAM por el apoyo otorgado a través de la Cátedra Fernando Orozco

REFERENCIAS

- Araujo, D., Yoshida, M., Takahashi, J., Stapelfeldt, C. (2011). Biodegradation studies on fatty amines used for reverse flotation of iron ore. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 151-155.
- Grooth, B. G., Geerken, T. H., & Greve, J. (1985). The cytodisk: a cytometer based upon a new principle of cell alignment. *Cytometry*, 226-223.
- Hao, F., Lwin, T., Buckard, J., & Woodcock, J. T. (2004). Determination of aliphatic amines in mineral flotation liquors and reagents by high-performance liquid chromatography after derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan. *Journal of Chromatography*, 77-85.
- Jeon, H. (2010). Production of algal biomass (*Chlorella vulgaris*) using sediment microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 308-311.
- López-Santiago, N., Sosa-Quiroz, I., Gutiérrez-Ruiz, M., Ceniceros-Gómez, A., & Martínez-Jardines, L. (2014). Evaluación ambiental del uso de aminas en procesos de flotación. (A. UAM, Ed.) 276-285.
- Morris, H. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de alimentación y nutrición*, 123-128.
- Nova García, C. (2015). HPLC-Masas: Instrumentación, ionización y mantenimiento. (págs. 1-31). Madrid: Instituto Tecnológico la Marañosa.
- Sosa, I. (2014). Evaluación ambiental del uso de aminas en procesos de flotación. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México