

---

---

## EDITORIAL

# LA ACREDITACIÓN EN LA U.D.C.A, UN CAMINO HACIA LA EXCELENCIA

Germán Anzola Montero

Rector

La Rectoría de la U.D.C.A, con el decidido acompañamiento de la Asamblea de Fundadores y del Consejo Directivo, asumió como política institucional la consecución de certificaciones de alta calidad, incluyendo la ACREDITACIÓN, en sus diferentes modalidades de aplicación: la acreditación de los programas académicos y la acreditación a nivel institucional.

En este mismo sentido, abordamos la certificación ISO9001, en algunos procesos del área administrativa y financiera.

Trabajar para alcanzar estos reconocimientos, tanto por parte de la comunidad académica, como de la sociedad colombiana y del Estado, es la respuesta que hemos asumido con la responsabilidad social universitaria que nos caracteriza y que se adquirió hace 30 años, cuando el gobierno colombiano, por intermedio del Ministerio de Educación Nacional, le otorgó a la Institución la correspondiente Personería Jurídica.

Puede surgir la pregunta del porqué de esta determinación y nuestra respuesta se fundamenta en la concepción que la Universidad ha adoptado, desde su creación, de constituirse como un bien social del país, que presta un servicio público de carácter cultural y sin ánimo de lucro, para brindar educación superior de excelencia, para contribuir a la construcción de una sociedad con mayor bienestar, más justa, solidaria, equitativa, en paz y competitiva; y por supuesto, comprometida con la rendición de cuentas, como deber incondicional, en la prestación de este servicio público cultural. Es así, como la U.D.C.A a través del cumplimiento de sus funciones sustantivas: la docencia, la investigación y la proyección a la comunidad, garantiza a la sociedad, que cumple con las más altas condiciones de calidad, con los objetivos y con los propósitos que hemos declarado asumir.

Es, desde la perspectiva anterior, que hemos hecho nuestra consideración de la Universidad como formación “en lo superior para lo superior”, asumiendo las palabras de mi gran Maestro el S.J. Alfonso Borrero Cabal; y, es desde aquí, donde la U.D.C.A decide aportar al país, cumpliendo sus responsabilidades como una Universidad de excelencia, objetivo que asumimos el 29 de diciembre de 2004, cuan-

do el Gobierno colombiano, por conducto del Ministerio de Educación Nacional, nos reconoció como UNIVERSIDAD, trabajando siempre con ahínco y con compromiso, lo que hoy se expresa en una docencia de la más alta calidad, una investigación con rigor científico y con resultados valorados y reconocidos por las comunidades de la ciencia nacional e internacional, y con vínculos cada vez más estrechos con la sociedad, mediante los cuales reintegramos a ella, los beneficios y servicios que nos demanda desde nuestra condición de Universidad dedicada al cultivo del saber, al enriquecimiento de la cultura y a la formación de hombres y mujeres éticos, idóneos y competentes.

Comprometernos con procesos y con modelos de autoevaluación con miras a la acreditación y como consecuencia de ello, asumir nuevos y rigurosos compromisos de autorregulación, es la única forma de demostrar, permanentemente, la calidad y la excelencia en nuestro diario quehacer. Este es nuestro deber como Universidad y por ello estamos actualmente avanzando en la re-significación de nuestro Proyecto Educativo Institucional -PEI- de modo que las orientaciones y políticas que allí se plasmen en lo académico y administrativo, no solo se coloquen en sintonía con los tiempos actuales (a nivel mundial y nacional), sino que sirvan de guía para la acción de los distintos actores institucionales comprometidos con el mejoramiento cualitativo y cuantitativo a nivel institucional, de programas, de cursos, de funciones y procesos, y como faro en la formulación de nuestros planes de desarrollo.

Íntimamente ligada a las condiciones de Calidad está la PERTINENCIA, entendiendo por ella el cumplimiento o adecuación de lo que la Universidad hace con respecto a lo que la sociedad le demanda, es decir a trabajar con el conocimiento, a su transmisión, producción, transferencia y aplicación y, a colocar ese conocimiento al servicio de la sociedad. Aquí es donde la Universidad demuestra su responsabilidad y compromiso con la sociedad, incluyendo la actuación profesional de los egresados. Ser de excelencia es formar en los niveles de pregrado y de postgrado, para el ejercicio profesional responsable, lo que significa estar al servicio de la

sociedad, es decir, aportando soluciones a los problemas del mundo moderno, tales como seguridad alimentaria, cambio climático, la salud, la igualdad, la justicia social, el cumplimiento de los derechos humanos, la interculturalidad la paz, las relaciones con el ambiente, las formas de vida, la ética, los valores individuales y generales y el afianzamiento de verdaderos e igualitarios sistemas democráticos. Esto es lo que en la U.D.C.A debemos considerar como formación pertinente y transformadora, conducente a una mayor equidad social y a la creación de una conciencia crítica de la sociedad.

Cumplir con los objetivos que nos hemos propuesto, debe conducir a una mayor credibilidad y calidad en todos los procesos propios de una Universidad y, por ello, esperamos fortalecer nuestra presencia en redes académicas y científicas, del orden nacional e internacional, pues somos conscientes que es sobre procesos de cooperación, de intercambio y de la creación de sinergias, como podemos fortalecernos como Universidad y desde donde podemos aportar con nuestras experiencias y saberes.

Finalmente, quiero concluir con una serie de enunciados, que nos lleven a la reflexión y que permitan afianzar el proceso que adelantamos de autoevaluación con miras a la acreditación institucional, demostrando:

- Que le cumplimos a la sociedad colombiana.
- Que formamos profesionales que sí aportan a la solución de las necesidades y de los problemas del país.

- Que tenemos la plena convicción de estar alcanzando, cada vez mejores desempeños y logros que ameritan el reconocimiento externo (de la comunidad académica, de la sociedad y del Estado) y la respectiva valoración de nuestro quehacer institucional, reafirmando nuestra realidad, identidad y paradigma, propios de la U.D.C.A.
- Que prestamos un servicio universitario de excelencia.
- Que somos una organización social con enfoques y con fines propios, trabajando en lo “superior y para lo superior”, y que todo lo anterior es lo que nos conducirá a la Acreditación Institucional, toda vez que podemos evidenciar idoneidad, pertinencia, responsabilidad, integridad, equidad, coherencia, universalidad, transparencia, eficacia y eficiencia.

Concluyo: Como universidad joven, en crecimiento y en permanente desarrollo, la U.D.C.A, haciendo uso responsable de su autonomía, ha venido aplicando procesos de autoevaluación y de autorregulación que han derivado en importantes acciones de mejoramiento, comprometiéndonos así con la excelencia que nos ha de conducir a la Acreditación Institucional y a un mayor reconocimiento académico y social. Es indiscutible el gran trabajo que nos espera; por ello quiero invitar a toda la comunidad universitaria a dedicar todos nuestros esfuerzos, para alcanzar este merecido reconocimiento.

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Listeria* spp. A PARTIR DE MUESTRAS DE PESCADO FRESCO EXPENDIDO EN PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER)

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Listeria* spp. FROM FRESH FISH SAMPLES, MARKETED IN PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER)

Fanny Herrera A.<sup>1</sup>, William Suárez Q.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ph.D. Universidad de Pamplona. Docente Titular. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Ciudad Universitaria. Pamplona, Norte de Santander. Colombia. Correspondencia: fannyh@unipamplona.edu.co; <sup>2</sup> Microbiólogo con Énfasis en alimentos, M.Sc. en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Pamplona. Docente catedrático. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. e-mail: aquifex3@hotmail.com

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 257 - 265, 2012

### RESUMEN

El género *Listeria* contiene ocho especies, destacándose *Listeria monocytogenes* patógena para el hombre que puede ocasionar gastroenteritis, meningitis, neuro-encefalitis, septicemia, abortos e, incluso, la muerte. *L. monocytogenes* es una bacteria ubicua que se puede aislar a partir de los ecosistemas donde habitan los peces, logrando llegar al producto terminado e inclusive, a concentraciones elevadas, cuando el pescado se procesa empleando inadecuadas prácticas de limpieza y de desinfección o se conserva durante mucho tiempo a temperaturas de refrigeración, debido a que es un microorganismo psicrotrofico. Los objetivos del presente estudio fueron determinar la presencia de *Listeria* spp. en muestras de pescado fresco expendido en la plaza de mercado de la ciudad de Pamplona, comparando el método tradicional y un inmunocromatográfico y determinar si existe correlación entre la presencia de *Escherichia coli* y *Listeria* spp., en las muestras. Se aislaron *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. grayi*, con prevalencias del 3,9%, 17,6%, y 13,7%, respectivamente, con una incidencia total del 35,3%. Al comparar los dos métodos de aislamiento, se encontró que no se existieron diferencias significativas entre ellos. Finalmente, se determinó que la presencia de *E. coli* es un buen indicador de la manifestación de cepas de *Listeria* en las muestras. La presencia de *L. monocytogenes* en las muestras indica que el pescado comercializado en la plaza de mercado de Pamplona puede ser un vehículo importante para este patógeno e, implica, que este alimento puede representar un riesgo para la salud de los consumidores, especialmente, para población vulnerable.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, pescado, *Escherichia coli*, prevalencia.

### SUMMARY

The genus *Listeria* comprises eight species between them *Listeria monocytogenes*, pathogenic to humans, causing gastroenteritis, meningitis, neuro-encephalitis, septicemia, abortions and even death. *L. monocytogenes* is an ubiquitous bacterium which can be isolated from ecosystems inhabited by fish, reaching the finished product, even at high concentrations, when the fish is processed using inadequate cleaning and disinfection practices and/or is stored for a long time at refrigeration temperatures because it is psychrotrophic. The objectives of this study were to determine the presence of *Listeria* spp. in fresh fish samples expended in the market place of Pamplona, comparing the traditional method with an immunochromatographic one, and to verify whether there is a correlation between the presence of *Escherichia coli* and *Listeria* spp. in the samples. *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. grayi* were isolated, with prevalences of 3.9%, 17.6% and 13.7%, respectively, with an overall incidence of 35.3%. By comparing the isolation methods, traditional and immunochromatographic, no significant differences between them were found. Finally, it was established that the presence of *E. coli* is a good indicator of the presence of strains of *Listeria* in the samples. The presence of *L. monocytogenes* in the samples indicates that fish sold in the market place of Pamplona can be an important vehicle for this pathogen and implies, that this food might pose a health risk to consumers, especially the vulnerable population.

Key words: *Listeria monocytogenes*, fish, *Escherichia coli*, prevalence.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se reconocen ocho especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*: *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y dos nuevas especies *L. marthii* y *L. rocourtiae* (Orsi *et al.* 2011). De las ocho, *L. monocytogenes* es la que tiene importancia, desde el punto de vista de la salud pública (Chen *et al.* 2010a).

*L. monocytogenes* puede ocasionar dos tipos de síndromes en el hombre. En primer lugar, listeriosis, caracterizado por síntomas y por signos severos y se presenta en población vulnerable y, en menor medida, síndrome de tipo gastrointestinal, leve autolimitante, que puede afectar a la población en general (Todd & Notermans, 2011). La mayoría de las infecciones por *L. monocytogenes* se dan en personas con un sistema inmune deficitario por la edad, por enfermedades como el cáncer, el sida, la cirrosis, por trasplante de órganos, entre otros. La bacteria puede atravesar la barrera intestinal y diseminarse desde los nódulos linfáticos mesentéricos hacia el hígado y el bazo, desde los cuales, puede alcanzar el cerebro o la placenta (Orsi *et al.* 2011). Los síntomas en los casos perinatales pueden variar desde fiebre en la madre, acompañada de síntomas de gastroenteritis; en general, el feto no se afecta gravemente, pero se puede presentar septicemia y, en los casos más graves, meningitis (Yucel & Balci, 2010). Puede ocasionar abortos, partos prematuros o el nacimiento de un bebé muerto. En los casos que no implican gestación, la bacteria tiene tropismo hacia el sistema nervioso central, presentando meningitis y meningoencefalitis. El porcentaje de mortalidad por esta bacteria es muy alta en los grupos de riesgo, del 20-40% (Huss *et al.* 2003). El periodo de incubación de la enfermedad en personas adultas varía entre una y varias semanas; la dosis infecciosa se desconoce, aunque se asume que menos de 100 células viables/g/mL, pueden ser infectivas (Rocourt *et al.* 2000).

*Listeria* es una bacteria anaerobia facultativa; crece a una temperatura óptima 37°C; *L. monocytogenes* es psicotrófica logrando sobrevivir a varios grados bajo cero, a pH entre 4,6 a 9,5 y a una actividad de agua ( $a_w$ ) baja, como 0,92 (Carpentier & Cerf, 2011), incluso, puede crecer en concentraciones de sal, hasta del 30% (Wan Norhana *et al.* 2010).

El pescado aporta nutrientes muy importantes en la dieta del ser humano y además provee reconocidos beneficios para la salud (Yucel & Balci, 2010). El pescado fresco posee ciertas características que favorecen el crecimiento de *Listeria*, como son pH, entre 6,6-6,8;  $a_w$ , entre 0,98-0,99; potencial

de óxido-reducción, entre +100 a +>300 mv (Ross *et al.* 2000) y posibles largos periodos de tiempo, conservado a temperaturas de refrigeración (Motarjemi & Adams, 2006). Se estima que un 7,0% del pescado crudo contiene *Listeria monocytogenes*; adicionalmente, las especies de *Listeria* al ser ubicuas, se logran aislar de ríos, de mar y de aguas residuales, así que la oportunidad de contaminación cruzada con el ambiente de proceso del pescado es alta (Otto *et al.* 2011).

Se ha determinado una incidencia anual de listeriosis alimentaria de 2.493 casos y 430 muertes, en Estados Unidos (Todd & Notermans, 2011); a pesar de esta incidencia, se encuentra entre las más frecuentes causas de muerte ocasionadas por Enfermedades de Origen Alimentario (ETAs) (Lomonaco *et al.* 2011). En el caso del pescado, se han reportado varios brotes por el consumo de pescado o derivados; en 1980, se reportó el primer brote, que afectó a 29 individuos y ocasionó nueve muertes; posteriormente, se reportó otro caso, debido al consumo de pescado en Italia (Elliot & Kvenberg, 2000); en Nueva Zelanda, se informaron de 22 casos de listeriosis, que afectaron a mujeres embarazadas, ocasionando siete muertes (Motarjemi & Adams, 2006); en Francia, se rechazó un lote de pescado procedente de China, por la presencia de *L. monocytogenes* (Rocourt *et al.* 2000).

En Lationamérica, en 1998, se presentó el primer registro acerca la presencia de *Listeria* en pescado, concretamente en mariscos; posteriormente, se han reportado aislamientos de *L. monocytogenes* en Brasil, en Costa Rica, en Trinidad, en Chile y en Argentina (Destro, 2000).

A pesar de la baja incidencia de listeriosis, la evidencia epidemiológica demuestra claramente que el pescado y sus productos son responsables de ETAs por *L. monocytogenes* (Rocourt *et al.* 2000).

En Colombia, existen pocos datos sobre la epidemiología de la listeriosis, debido, principalmente, a que no es una enfermedad de notificación obligatoria; en un estudio publicado, realizado en 1994, en un hospital de tercer nivel (Cali, Valle), se informó sobre 19 casos clínicos de listeriosis, diez, en adultos inmunosuprimidos; dos, en mujeres embarazadas; seis, en neonatos y, un caso, en una adolescente de doce años (Crespo *et al.* 1999). Se considera que el número de listeriosis en Colombia va en aumento, debido al incremento dentro de la población de enfermedades que deprimen el sistema inmune, como cáncer, sida, hepatitis o trasplantes de órganos (Medrano *et al.* 2006).

En nuestro país, el pescado ocupó el quinto lugar dentro de los principales alimentos implicados en ETAs, en el periodo

1998-2003, siendo *L. monocytogenes* el cuarto género bacteriano, involucrado en las mismas (Muriel, 2008).

El protocolo tradicional para la identificación de *Listeria* es muy laborioso y prolongado en el tiempo, ya que implica dos enriquecimientos: una posterior siembra en medios selectivos- diferenciales y la identificación bioquímica (Norma Técnica Colombiana, NTC 4666), razones por las cuales, se están implementando métodos que eviten jornadas intensivas de trabajo para el personal con resultados, en menor tiempo. Dentro de ellos, se cuenta con el método inmunocromatográfico, que usa un dispositivo de flujo lateral; el dispositivo de la prueba cuenta con una membrana porosa de nitrocelulosa, en la que es inmovilizado un anticuerpo marcado con oro, el cual, se une específicamente y captura un antígeno particular de *Listeria*, si está presente en la muestra; este método se considera altamente sensible y específico (McMeekin, 2003).

Los coliformes totales son bacilos Gram negativos asporógenos, que fermentan la lactosa en 24-48 horas, a 37°C, dentro de los cuales, se encuentra *Escherichia coli*, que además tiene la particularidad de fermentar la lactosa con producción de gas, entre 44-46°C y se le considera el microorganismo coliforme fecal por excelencia, aunque algunas cepas de *Citrobacter* y de *Klebsiella*, se ajustan a este comportamiento (Jay *et al.* 2009). *Escherichia coli* es el indicador de contaminación fecal en los alimentos más utilizado, ya que constituye el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales de sangre caliente (Marín *et al.* 2009).

Los objetivos de este estudio fueron, en primer lugar, aislar e identificar cepas de *Listeria* spp., a partir de muestras de pescado fresco, expendido en Pamplona (Norte de Santander), comparando el método tradicional con el inmunocromatográfico y, en segundo lugar, determinar si existe correlación entre la presencia de *E. coli* y *Listeria* spp., en las muestras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Número de muestras:** Se realizó una encuesta, aplicando un muestreo para proporciones, con el fin de determinar qué tan frecuente es el consumo de pescado en la ciudad de Pamplona. Los resultados revelaron que del total de la población entrevistada, correspondiente a 256 personas, 163 personas consumen pescado y, de ellas, 73, lo adquieren en la plaza de mercado de la ciudad; 35, en supermercados; 40, ventas callejeras y 15, ventas detalladas. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de las personas compran el pescado en la plaza de mercado, se decidió muestrear el pescado expendido en este lugar; con el dato de 73 personas, se aplicó un muestreo para proporciones, con un nivel de confianza

del 95%, error del 7,4% y aplicando la fórmula del muestreo para proporciones con población finita, el resultado fue de 51 muestras.

El tipo de estudio aplicado en este trabajo fue descriptivo. El método de muestreo fue intencional no probabilístico.

**Muestras:** Se analizaron un total de 51 muestras distribuidas así: Bagre, 20 (*Brachyplatistoma* spp.); trucha, 12 (*Oncorhynchus mykiss*); bocachico, 12 (*Prochilodus magdalenae*) y mojarra, 7 (*Oreochromis* spp.). Estas especies de pescado fueron seleccionadas, debido a la preferencia que reflejaron los consumidores en la encuesta. Se tomaron 100 g de cada muestra que fueron trasladadas al laboratorio en bolsas estériles, en nevera portátil y fueron analizadas inmediatamente después de su recolección.

**Aislamiento de *Listeria* spp.:** Para el aislamiento tradicional, se siguió la metodología establecida por la Norma Técnica Colombiana 4666 (1999): Método Horizontal para la Detección de *L. monocytogenes*. El método alternativo de detección empleado fue el inmunocromatográfico, el cual, es un método de detección inmunológico basado en el principio "immune flow", que utiliza anticuerpos marcados con oro. Se utilizó el Singlepath™ *Listeria*, siguiendo las instrucciones del fabricante así: se pesaron 25g de la muestra, en 225mL del caldo Fraser media concentración, incubando a 30°C/ 18-24 h. Luego, se transfirieron 0,1mL en 9,9mL de Caldo (IVM, incubando a 30°C/ 18-24 h. Posteriormente, se transfirieron de 1-2mL del cultivo enriquecido a un tubo de polipropileno. Incubando a 80°C/20 min y dejando enfriar a temperatura ambiente (18-26°C). Se tomaron 160µL del cultivo calentado y enfriado, dispensándolo en el orificio circular del dispositivo. Se observaron los resultados a los 20 min de aplicar la muestra en el dispositivo (Merck, 2008).

Se confirmaron las cepas positivas, sembrando por aislamiento sobre el agar Palcam; posteriormente, se transfirieron las colonias típicas sobre Agar Nutritivo, incubando a 37°C/24 horas. Se realizaron las pruebas de tinción de Gram, oxidasa y catalasa. Las cepas que fueron bacilos Gram positivos, catalasa positivas y oxidasa negativas fueron identificadas utilizando las siguientes pruebas:

- Movilidad: utilizando agar GI, incubando a 25°C, durante siete días y haciendo lecturas diarias del crecimiento en sombrilla, típicas de la mayoría de las especies de *Listeria*.
- Fermentación de carbohidratos: se emplearon soluciones de D-manitol, ramnosa, y xilosa, esterilizadas por filtración y añadidas, hasta una concentración del 1,0%, al caldo púrpura. Tras la inoculación de las cepas e incubación a 37°C, se hizo la lectura a las 24 y a las 48 h. Las cepas capaces de producir ácido a partir del carbohidrato respectivo viraron el color del indicador hacia amarillo.

- Producción de  $\beta$ -hemólisis: se estudió la actividad  $\beta$ -hemolítica en placas de Agar Base Columbia, suplementado con sangre humana, al 5% no tratada, incubando a 37°C, por 24-48 h. Se consideraron positivas aquellas cepas que presentaron un halo de aclaramiento alrededor de la zona de siembra, como resultado de la lisis total de los eritrocitos, presentes en el medio.
- Prueba del CAMP: para esta prueba, se utilizaron cultivos de 24 h, a 37°C de *S. aureus* y *Rhodococcus equi*, empleando como medio de cultivo Agar Base Columbia al 5%, de glóbulos rojos humanos. En cada placa de medio, se sembraron las cepas anteriores de forma vertical, con suficiente separación entre ellas para, posteriormente, sembrar las cepas a ensayar de forma horizontal, no permitiendo que se toquen unas con otras. Se incubaron a 37°C, durante 24-48 h. Para la lectura de la prueba, se examinaron las hemólisis en la zona de influencia de la siembra vertical.

**Determinación de *Escherichia coli*:** Se empleó la técnica del Número Más Probable (NMP), utilizando el caldo LMX-Fluorocult, de la siguiente manera: se realizaron diluciones seriadas de la muestra hasta  $10^{-3}$ , inocular 1 mL de cada una de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , en tres series de tres tubos de ensayo (tres tubos por cada dilución), conteniendo 10 mL del caldo e incubando a 37°C, por 24 h. Se realizó la lectura de *E. coli* teniendo en cuenta la aparición de un color azul en los tubos, además, de fluorescencia y de un anillo rojo, luego de adicionar el reactivo de Kovac.

Para el análisis estadístico, se empleó el software estadístico SPSS. Se aplicó la prueba chi-cuadrado de Pearson, para probar si existían diferencias significativas entre los métodos empleados para caracterizar las especies de *Listeria*, método tradicional e inmunocromatográfico. Finalmente, se empleó la correlación de Spearman con  $p < 0,05$ , para determinar el grado de asociación entre *Listeria* y la presencia de coliformes fecales en las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la adscripción a especie de las cepas de *Listeria*, se siguieron los lineamientos estipulados por NTC 4666; en la figura 1, se especifican las diferentes especies aisladas y su método de aislamiento. Se aislaron dos cepas de *Listeria monocytogenes*, lo que indica una prevalencia del 3,9% (las dos detectadas por el método inmunocromatográfico); aunque esta prevalencia es baja, se debe considerar desde el punto de vista de la salud pública, ya que todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas para el hombre (Norrung, 2000). La incidencia de *L. monocytogenes* detectada aquí es similar a la hallada Markkula *et al.* (2005), quienes encontraron una prevalencia del 4,0%, a partir de muestras de trucha arcoíris fresca y congelada y Rodas-Suárez *et al.*

(2006) reportaron una prevalencia por esta bacteria, de 4,5% en pescado procedente de Méjico; Martínez & Villalobos (2004) analizando muestras de atún fresco procedente de Venezuela, hallaron esta bacteria, con una prevalencia del 3,75%; Miya *et al.* (2010), en el 2,6% de muestras de bloques de atún; en Italia, Busani *et al.* (2005) analizaron una gran variedad de alimentos de origen animal, entre ellos pescados y derivados, logrando detectar esta bacteria en el 6,4%, de muestras de pescado y sus derivados, destacando que fue de las más altas tasas de aislamiento, en comparación con otros alimentos. Por otro lado, Al Bulushi *et al.* (2010), no lograron aislar esta bacteria en muestras de pescado de origen marino.

Los datos hallados aquí son inferiores a los reportados por otros autores: Herrera *et al.* (2006) encontraron una incidencia del 10%, para *L. monocytogenes*, en pescado de origen marino; Pao *et al.* (2008) reportaron una prevalencia del 12,5%, en pescado procedente de piscifactorías; Chou *et al.* (2006), del 37,4%, a partir de muestras de filetes de bagre y Yucel & Balci (2010), del 44,5%, en pescado de agua dulce, procedente de mercados en Turquía. En general, las prevalencias reportadas de *L. monocytogenes* en países tropicales son mucho menores que las obtenidas en países templados (Karunasagar & Karunasagar, 2000), lo que se puede atribuir, principalmente, a la temperatura del agua. Como se mencionó anteriormente, *L. monocytogenes* es una bacteria psicrotrofica, de tal manera que las bajas temperaturas de los hábitats de peces procedentes de países europeos favorecen la multiplicación de este microorganismo, contrario a lo que sucede en países tropicales, como el nuestro, en el que las temperaturas más elevadas de los hábitats de los peces tienden a inhibirla.

Adicionalmente, se aislaron nueve cepas de *L. innocua* (Figura 1), lo que corresponde a una prevalencia del 17,6%, (55,5% recuperadas por el método tradicional y el 44,5% por el inmunocromatográfico); esta prevalencia, se relaciona con la encontrada por otros autores: 19%, reportada por Yucel & Balci (2010), en muestras de pescado de agua dulce; 20,6%, encontrada por Chou *et al.* (2006), en muestras de filetes de bagre; 15%, obtenida por Pao *et al.* (2008), en filetes procedentes de acuicultivos. Por otro lado, Rodas-Suárez *et al.* (2006) encontraron una prevalencia de *L. innocua* mucho mayor del 44%, en pescados de origen marino; Miettinen & Wirtanen (2005) reportaron prevalencia por esta especie, del 33%, a partir de lotes de piscifactorías de trucha arcoíris fresca. Estas diferencias se pueden explicar, por el tipo de muestra analizada; los otros autores mencionados analizaron muestras de peces que incluían vísceras, branquias, piel, en las que, obviamente, se incrementa la microbiota. En el estudio que nos ocupa, se analizó únicamente la parte comestible del pescado; en todo caso, es preferible encontrar prevalencias altas de esta bacteria que se considera apatógena para el hombre (Jay *et al.* 2009).

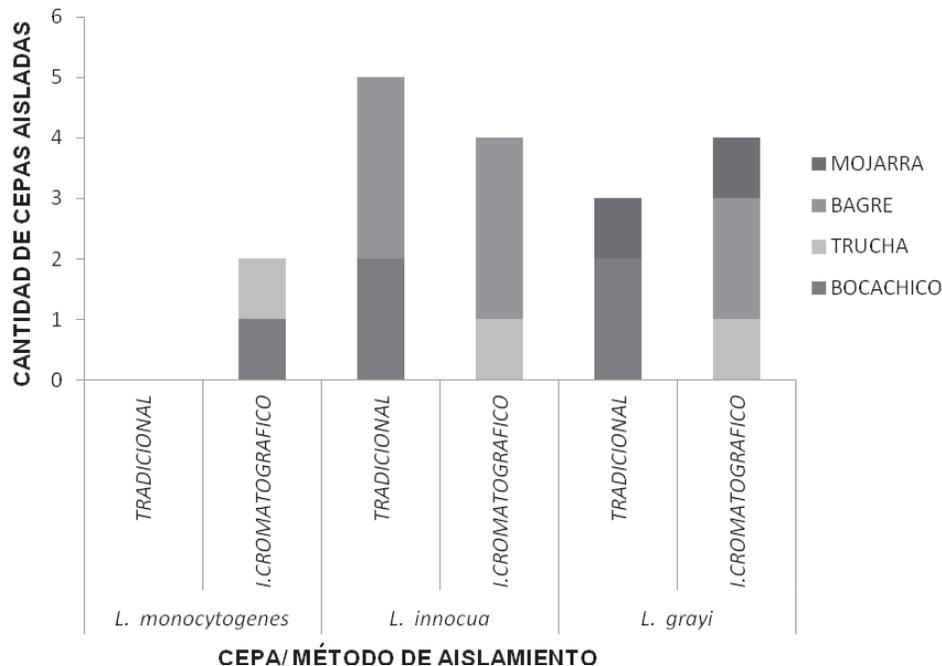


Figura 1: Cepas de *Listeria* spp. aisladas y método de detección.

Se aislaron siete cepas *L. grayi* (Figura 1), correspondiendo a una prevalencia del 13,7% (34,8% recuperadas por el método tradicional y el 57,2% de por el inmunocromatográfico). Jallewar *et al.* (2007) encontraron una prevalencia por esta bacteria del 8,0%, en pescado de agua dulce; Martínez & Villalobos (2004), analizando muestras de atún fresco procedente de Venezuela, hallaron esta bacteria con una prevalencia del 2,5%; Chou *et al.* (2006) reportaron una prevalencia del 0,8%, a partir de muestras de filetes de bagre.

En total, la prevalencia de cepas de *Listeria* spp., en las muestras de pescado analizadas fue muy alta: 35,3%, dato que se relaciona con el reportado por Miettinen & Wirtanen (2005), del 35%, en lotes de piscifactorías de trucha arcoiris fresca no procesada; Pao *et al.* (2008) reportaron prevalencias de *Listeria*, en filetes de pescado, del 27%; Rodas-Suárez (2006), del 22,7%, en muestras de pescado en Méjico; no obstante, Souza *et al.* (2008) y Morales *et al.* (2004) no detectaron *Listeria* spp. en muestras de pescado procedente de Brasil y de Costa Rica, respectivamente. Las diferencias en los resultados obtenidos, se pueden deber a la contaminación de las aguas donde se desarrollan estos animales; al respecto es muy importante considerar que la mayoría de los pescados analizados en este estudio procedían del río Magdalena que, como es bien sabido, es un colector de aguas residuales domésticas e industriales de diferente índole; también es necesario considerar la contaminación adicional que se aporta a este alimento, durante las operaciones de transporte, de distribución y de venta.

Al comparar estadísticamente, mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson, los dos métodos empleados para todas las muestras analizadas, tradicional e inmunocromatográfico, se encontró que no existían diferencias significativas entre los dos métodos ( $p > 0,05$ ).

La presencia de *Listeria* spp. puede ser indicadora de deficientes prácticas higiénico-sanitarias en el procesamiento de los alimentos (Windrantz & Arias, 2000), de tal manera que la higiene personal y programas de limpieza y de desinfección adecuados, podrían ser suficientes para controlar *Listeria* spp. (Gibbons *et al.* 2006; Keeratipibul & Lekroengsin, 2009). La implementación de sistemas de control de calidad en las industrias procesadoras de pescado, como el HACCP, es de vital importancia, para asegurar el control de este patógeno (Destro, 2000); finalmente, la adecuada y la suficiente cocción del pescado antes de su consumo reduce el riesgo por esta bacteria, ya que, como se mencionó anteriormente, *L. monocytogenes* es termosensible.

Esta establecido que la contaminación del pescado con *L. monocytogenes* se origina, principalmente, en los equipos, en los utensilios, en las superficies, en los manipuladores y no tanto en la materia prima, como tal (Chen *et al.* 2010b); Hansen *et al.* (2006) encontraron que entre mayor contacto con el hombre tenga el pescado mayor es la presencia de *L. monocytogenes* en los ambientes de procesamiento, llegando a ser del 10% en piscifactorías de agua dulce. Es evidente que inadecuadas prácticas de limpieza y de desinfección

aumentan la persistencia de la bacteria en los equipos y en los ambientes de procesamiento (Carpentier & Cerf, 2011; Chen *et al.* 2010c); a esto se debe sumar la demostrada resistencia de *L. monocytogenes* a desinfectantes, cuando forma biopelículas (Folsom & Frank, 2006).

Es importante recalcar que, dada la capacidad de *L. monocytogenes* de crecer a temperaturas de refrigeración, la presencia de esta bacteria, aún a bajas concentraciones, representa un riesgo para la salud pública cuando el pescado se mantiene a estas temperaturas durante largos periodos de tiempo (Chou *et al.* 2006); para ilustrar lo anterior, en el 12% de muestras de pescados o derivados tomadas de refrigeradores de pacientes con listeriosis, se recuperó *L. monocytogenes*, consiguiéndose aislar el mismo serotipo en el paciente (Rocourt *et al.* 2000).

Otro aspecto importante a considerar es la probabilidad que la bacteria resista los tratamientos térmicos cuando la concentración inicial es muy alta ( $10^5$ -  $10^6$  ufc/g) (ICMSF, 1998); aunque *L. monocytogenes* se considera termosensible, se ha encontrado en pescados tratados por calor, enfatizando la posible contaminación cruzada post-proceso (Huss *et al.* 2003; Chou *et al.* 2006).

En cuanto a la presencia de *E. coli* en las muestras analizadas, se determinó que no existe correlación entre el NMP de *E. coli* con la presencia de *Listeria* spp. en las muestras, en el sentido que puede existir presencia de *E. coli* y ausencia de *Listeria* (Tabla 1). Al comparar los resultados obtenidos para *E. coli* con las recomendaciones establecidas por la ICMSF para pescado fresco, se tiene que el 8% de las muestras analizadas se consideran inaceptables (Tabla 2); Morales *et al.* (2004) encontraron que el 58% de las muestras de tilapia procedentes de acuicultivos eran inaceptables, según los parámetros recomendados por la ICMSF para *E. coli*; por otro lado, Pao *et al.* (2008) determinaron que ninguna de las muestras de filetes de pescado procedentes de acuicultivos superaban los parámetros de calidad marginalmente aceptables para *E. coli*, estipulados por la ICMSF. Estas diferencias se podrían explicar bien sea por aguas de crianza

contaminadas, como se mencionó anteriormente; la mayoría de los pescados analizados provenían del río Magdalena o por prácticas post-captura deficientes, concretamente, medidas higiénicas deficientes, durante la manipulación del pescado, utilización de agua de mala calidad en la elaboración del hielo empleado para mantener frío el pescado o abusos de temperatura durante su conservación (Pamuk *et al.* 2011; ICMSF, 1999).

En conclusión, se lograron aislar e identificar cepas de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. grayi*, a partir de muestras de pescado fresco, comercializado en la plaza de mercado en Pamplona; no se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos de detección empleados, razón por la cual, se considera que es factible emplear indistintamente estos métodos para la detección de la bacteria; finalmente, la presencia de *E. coli* es un buen indicador de la presencia de cepas de *Listeria*, en las muestras analizadas.

La presencia de cepas de *Listeria* en las muestras refleja, probablemente, las inadecuadas prácticas de higiene y de desinfección empleadas a lo largo de toda la cadena de procesamiento del mismo, de tal manera que se debe capacitar a los manipuladores, a los consumidores y a los productores de este alimento, en la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura. A este respecto, se recomienda a la oficina de Saneamiento Ambiental del municipio de Pamplona, realizar seguimientos y verificaciones de las medidas higiénicas que se aplican en los puntos de venta de pescado del mercado de la ciudad.

Es importante recalcar que las diferencias en los resultados encontrados aquí con los hallados por otros autores, se pueden deber a la metodología utilizada, a diferencias en el tipo de muestra analizada (pescado fresco y fileteado), el origen (agua dulce o de mar), a variaciones debidas a las distintas especies de peces, a la estación del año o a las condiciones higiénico-sanitarias empleadas, durante el procesamiento del pescado.

Finalmente, sería conveniente realizar pruebas de confirmación de las cepas aisladas, mediante pruebas genotípicas, como

Tabla 1: Presencia de *Escherichia coli* y *Listeria* spp. en las muestras de pescado analizadas.

PESCADO	<i>E. coli</i> (%) <sup>1</sup>	<i>Listeria</i> spp. (%) <sup>2</sup>
Bagre	95	15,7
Mojarra	71,4	3,9
Bocachico	100	9,8
Trucha	50	5,9

<sup>1</sup>: NMP mayor o igual a 3

<sup>2</sup>: independientemente del método de detección

Tabla 2: Número Más Probable (NMP) de *Escherichia coli* en las muestras de pescado analizadas.

NMP <i>E.coli</i> /g	% MUESTRAS	CRITERIO DE CALIDAD <sup>1</sup>
<3 – 11	37	Buena
>11 – 500	55	Marginalmente aceptable
>500	8	Inaceptable

<sup>1</sup>: según ICMSF (1999)

la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), buscando, para el caso específico de *L. monocytogenes*, genes que codifiquen factores de virulencia, como son el gen de la internalina (gen *inlA*, hemolisina y/o la listeriolisina (gen *hly*) y la proteína p60 (gen *iap*).

**Agradecimientos:** A la Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO) y su semillero. **Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Financiación:** Este estudio fue financiado por el Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO) Universidad de Pamplona.

## BIBLIOGRAFÍA

- AL BULUSHI, I.; POOLE, S.; BARLOW, R.; DEETH, H.; DYKES, G. 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *Int. J. Food Microbiol.* 138:32-38.
- BUSANI, L.; CIGLIANO, A.; TAIOLI, E.; CALIGIURI, V.; CHIAVACCI, L.; DI BELLA, C.; BATTISTI, A.; DURANTI, A.; GIANFRANCESCHI, M.; NARDELLA, M.C.; RICCI, A.; ROLESU, S.; TAMBA, M.; MARABELLI, R.; CAPRIOLI A. 2005. Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in foods of animal origin in Italy. *J. Food Prot.* 68(8):1729-1733.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. 2011. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and Premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145:1-8.
- CRESPO, M.; VÉLEZ, J.; CASTAÑEDA, C.; HOYOS, F.; LÓPEZ, M.; SALAZAR, J. 1999. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia Médica.* 30:89-90.
- CHEN, B.; PYLA, R.; KIM, T.; SILVA, J.; JUNG, Y. 2010a. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 50:626-632.
- CHEN, B.; PYLA, R.; KIM, T.; SILVA, J.; JUNG, Y. 2010b. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiol.* 27:645-652.
- CHEN, B.; PYLA, R.; KIM, T.; SILVA, J.; JUNG, Y. 2010c. Incidence and persistence of *Listeria monocytogenes* in the Catfish processing environment and fresh fillets. *J. Food Prot.* 73(9):1641-1650.
- CHOU, CH.; SILVA, J.; WANG, C. 2006. Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in raw catfish fillets. *J. Food Prot.* 69(4):815-819.
- DESTRO, M. 2000. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. *Int. J. Food Microbiol.* 62:191-196.
- ELLIOT, E.; KVENBERG, J. 2000. Risk assessment used to evaluate the US position on *Listeria monocytogenes* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 62:253-260.
- FOLSOM, J.; FRANK, J. 2006. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. *J. Food Prot.* 69(6):1292-6.
- GIBBONS, I.; ADESIYUNA, A.; SEEPERSADSINGHA, N.; RAHAMAN, S. 2006. Investigation for possible source(s) of contamination of ready-to-eat meat

- products with *Listeria* spp. and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiol.* 23:359-366.
13. HANSEN, C.; VOGEL, B.; GRAM, L. 2006. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments. *J. Food Prot.* 69(9):2113-2122.
  14. HERRERA, F.; SANTOS, J.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. 2006. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in displayed portions of marine fish. *J. Appl. Microbiol.* 100: 527-536.
  15. HUSS, H.; ABABOUICH, L.; GRAM, L. 2003. Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. Rome: Disponible desde Internet en: [FAO.ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4743e/y4743e00.pdf](http://fao.org/docrep/fao/006/y4743e/y4743e00.pdf) (con acceso 29/01/12).
  16. ICMSF. 1998. Microorganismos de los alimentos 5: Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia. Zaragoza. 170p.
  17. ICMSF. 1999. Microorganismos de los alimentos 2: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. Editorial Acribia. Zaragoza. 171p.
  18. JALLEWAR, P.; KALOREY, D.; KURKURE, N.; PANDE, V.; BARBUDDHE, S. 2007. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *Int. J. Food Microbiol.* 114:120-123.
  19. JAY, J.; LOESSNER, M.; GOLDEN, D. 2009. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. 477, 599p.
  20. KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. 2000. *Listeria* in tropical fish and fishery products. *Int. J. Food Microbiol.* 62:177-181.
  21. KEERATIPIBUL, S.; LEKROENGSIN, S. 2009. Risk analysis of *Listeria* spp. contamination in two types of ready-to-eat chicken meat products. *J. Food Prot.* 72(1):67-74.
  22. LOMONACO, S.; NUCERA, D.; PARISI, A.; NORMANNO, G.; BOTTERO, M. 2011. Comparison of two AFLP methods and PFGE using strains of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental and food samples obtained from Piedmont, Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 149:177-182.
  23. MARÍN, C.; FONSECA, C.; ARIAS, S.; VILLEGAS, I.; GARCÍA, A.; ISHIHARA, H. 2009. Carga bacteriana de los peces *Cynoscion squamipinnis* (Perciformes: Scianidae) y *Lutjanus guttatus* (Perciformes: Lutjanidae) en la cadena de comercialización, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 57 (1-2):45-52.
  24. MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. 2005. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. *J. Food Prot.* 68(6):1228-1231.
  25. MARTÍNEZ, R.; VILLALOBOS, L. 2004. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en atún fresco expedido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 14(4):354-357.
  26. MEDRANO, M.; RESTREPO, S.; VANEGAS, C. 2006. Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomédica.* 26 (3):442-450.
  27. McMEEKIN, T. 2003. Detecting pathogens in foods. Cambridge-England:Woodhead Publishing Limited. 220p. Disponible desde Internet en: <http://books.google.com/books?id=SKQ7DJD7-h0C&pg=PA222&lpg=PA223&ots=ds75PQhcub&dq=detection+of+listeria+in+foods+by+singlepath&hl=es#v=onepage&q=detection%20of%20listeria%20in%20foods%20by%20singlepath&f=false> (con acceso 03/02/2012).
  28. MERCK. 2008. GLISA-Rapid Test (Gold Labelled ImmunoSorbent Assay) for the qualitative detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples. Disponible desde Internet en: [http://www.merck-chemicals.com/spain/singlepath-listeria/MDA\\_CHEM-104142/p\\_qFGb.s1LXiIAAAEWPuEfVhTI?attachments=TI](http://www.merck-chemicals.com/spain/singlepath-listeria/MDA_CHEM-104142/p_qFGb.s1LXiIAAAEWPuEfVhTI?attachments=TI) (con acceso 15/03/2012).
  29. MIETTINEN, H.; WIRTANEN, G. 2005. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *Int. J. Food Microbiol.* 104:135-143.
  30. MIYA, S.; TAKAHASHI, H.; ISHIKAWA, T.; FUJII, T.; KIMURA, B. 2010. Risk of *Listeria monocytogenes* contamination of raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(10):3383-3386.
  31. MORALES, G.; BLANCO, L.; ARIAS, M.; CHAVES, C. 2004. Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Orochormis niloticus*) proveniente de

- la zona norte de Costa Rica. Arch. Latinoam. Nutr. 54(4):433-437.
32. MOTARJEMI, Y.; ADAMS, M. 2006. Emerging Foodborne Pathogens. Woodhead Publishing Limited. Cambridge England. 416,420p.
33. MURIEL, M. 2008. Estimación de la Incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Colombia en la década 1996-2006. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. 2008. Disponible desde Internet en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis134.pdf> (con acceso 15/03/2012).
34. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4666. 1999. Método Horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. ICONTEC.
35. NORRÚNG, B. 2000. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. Int. J. Food Microbiol. 62:217-221.
36. ORSI, R.; DEN BAKKER, H.; WIEDMANN, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic Characteristics. Int. J. Med. Microbiol. 301:79-96.
37. OTTO, R.; PAKER, I.; BANE, L.; BEAMER, S.; JACZYNSKI, J.; MATAK, K. 2011. Survival of *Listeria innocua* in rainbow trout protein recovered by isoelectric solubilization and precipitation with acetic and citric acids. J. Food Prot. 74(8):1348-1352.
38. PAMUK, S.; GÜRLER, Z.; YILDIRIM, Y.; SIRIKEN, B. 2011. Detection of microbiological quality of common carp (*Cyprinus carpio*) sold in public bazaar in Afyonkarahisar. J. Anim. Vet. Adv. 10(8):1012-1018.
39. PAO, S.; ETTINGER, M.; KHALID, M.; REID, A.; NERRIE, B. 2008. Microbial quality of raw aquacultured fish fillets procured from Internet and local retail markets. J. Food Prot. 71(8):1544-9.
40. ROCOURT, J.; JACQUET, CH.; REILLY, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int. J. Food Microbiol. 62:197-209.
41. RODAS-SUÁREZ, O.; FLORES-PEDROCHE, J.; BETANCOURT-RULE, J.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E.; VÁZQUEZ-SALINAS, C. 2006. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. Appl. Environ. Microbiol. 72(11):7410-7412.
42. ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. Int. J. Food Microbiol. 62:231-245.
43. SOUZA, V.; ALVES, V.; DESTRO, M.; DE MARTINIS, E. 2008. Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed surubim fish (*Pseudoplatystoma* sp). Braz. J. Microbiol. 39:527-528.
44. TODD, E.; NOTERMANS, S. 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control 22:1484-1490.
45. WAN NORHANA, M.; POOLE, S.; DEETH, H.; DYKES, G. 2010. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. Food Control 21:343-361.
46. WINDRANTZ, P.; ARIAS, M. 2000. Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at San Jose, Costa Rica. ALAN. 50(3):301-303.
47. YÜCEL, N.; BALCI, S. 2010. Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. J. Food Prot. 73(2):380-384.

Recibido: Febrero 6 de 2012

Aceptado: Agosto 13 de 2012

# PREVALENCIA DE *Salmonella* y ENTEROPARÁSITOS EN ALIMENTOS Y MANIPULADORES DE ALIMENTOS DE VENTAS AMBULANTES Y RESTAURANTES EN UN SECTOR DEL NORTE DE BOGOTÁ, COLOMBIA

## PREVALENCE OF *Salmonella* AND ENTEROPARASITES IN FOOD AND FOOD STALLS HANDLERS AND RESTAURANTS IN AN AREA OF THE NORTH OF BOGOTA, COLOMBIA

Martín A. Bayona R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bacteriólogo, Esp., M.Sc. Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Calle 222 No. 55-37, Bogotá, D.C. E-mail: mabayona@udca.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 267 - 274, 2012

### RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan una problemática mundial. La vigilancia de los víveres comercializados es un tema que debe llevar a tomar conciencia del riesgo sanitario y de la importancia en la implementación de acciones correctivas, en la capacitación y en el seguimiento de los manipuladores de alimentos. El presente trabajo correspondió a un estudio descriptivo de prevalencia, en donde se evaluó la frecuencia de ciertos microorganismos en los manipuladores y alimentos vendidos, en una zona del norte de Bogotá, referente a la carga de enteroparásitos y *Salmonella* spp. La población evaluada correspondió a 60 manipuladores de alimentos distribuidos así: 40, de venta establecida y 20, de venta ambulatoria, quienes aceptaron el consentimiento informado. Se realizaron ensayos microbiológicos en muestras de heces, de frotis de manos y de alimentos en la búsqueda de enteroparásitos y *Salmonella* spp. Se realizó una estadística descriptiva. Para procesar los datos, se empleó el programa SPSS versión 18. Dentro de los resultados, se destaca que el 25% de los alimentos ambulantes y el 7,5% de los alimentos de venta establecida (chorizo frito, ensaladas de frutas, yogurth con cereal, arepa rellena y pincho de carne) fueron positivos para *Salmonella* spp. La presencia de diferentes parásitos, como *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Ascaris lumbricoides* representan un aspecto de importancia en salud pública, lo que implica socializar los resultados obtenidos y fomentar una cultura de higiene en los manipuladores de alimentos.

Palabras clave: Alimentos, buenas prácticas de manipulación, *Salmonella*, parásitos, salud pública.

### SUMMARY

Foodborne diseases are a global problem. Surveillance of marketed food is an issue that should carry health risk awareness and the importance in the implementation of corrective actions, training and monitoring of food handlers. The present research corresponded to a descriptive study that assessed prevalence in the frequency of certain microorganisms in food handlers and sold in an area of northern Bogota, regarding the burden of enteric and *Salmonella* spp. The population was composed of 60 food handlers distributed as follows: 40 of established sites and 20 of ambulatory sales; all agreed to the informed consent. Microbiological tests were performed on fecal samples, food and hand smear in the search for enteroparasites and enteric *Salmonella* spp. Descriptive statistics were performed. To process the data SPSS version 18 was used. Among the results it can be highlighted that 25% of the food sold in the street and 7.5% of the permanent food expenditures (fried sausage, fruit salads, yogurt with cereal, stuffed corn pancake and shish kebab) were positive for *Salmonella* spp. The presence of parasites such as *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Ascaris lumbricoides* represent an aspect of importance for public health, implying the need to socialize the results and foster a culture of hygiene in food handlers.

Key words: Food, Good manipulation practices, *Salmonella*, parasites, public health.

## INTRODUCCIÓN

Para muchos peatones, la venta de alimentos generada por vendedores ambulantes satisface la necesidad básica de comida, mientras se encuentran fuera del hogar o del sitio de trabajo, sin darse cuenta que los productos pueden ser una fuente de infección, debido a su inadecuada manipulación. Existe una relación directa entre la inadecuada manipulación de los alimentos y la asociación de Enfermedades Transmitidas por alimentos (ETA), en la cual, el manipulador interviene como vehículo de transmisión (Gubbay *et al.* 2004).

Al observar la alta frecuencia de brotes de intoxicación por alimentos son múltiples los factores que contribuyen a este efecto; entre ellos, se destacan el inadecuado aseo de los manipuladores, la obtención de materias primas contaminadas, la refrigeración incorrecta de los alimentos terminados y de las materias primas, una deficiente limpieza y desinfección de los equipos y utensilios de trabajo y la localización de los sitios de trabajo, asociados a contaminación ambiental (Merino, 2008; Vásquez *et al.* 2007).

La carencia de estudios de epidemiología alimentaria en Colombia, que muestran la importancia de los manipuladores asociados con ETA, impide tener datos actualizados sobre la distribución de los microorganismos asociados con patologías gastrointestinales; además, que su desconocimiento no permite establecer medidas de vigilancia epidemiológica y toma de decisiones en salud pública (Flórez *et al.* 2008).

La prevalencia de ciertos microorganismos patógenos en los manipuladores es enorme, tal como lo describe Valdívieso *et al.* (2006). La limitada oferta de trabajo en las grandes ciudades, junto a la falta de capacitación y las necesidades sentidas de la población, lleva a algunas personas a buscar alternativas, como vendedores ambulantes, para la obtención de ingresos económicos (Durango *et al.* 2004).

En Colombia, en el 2010, se notificaron al sistema nacional de vigilancia por archivos planos (colectivo) 11.563 casos de ETA, involucrados en 761 brotes. Los alimentos más frecuentes asociados con brotes de ETA fueron: alimentos mixtos seguidos por queso, arroz con pollo, carne y sus derivados y productos de pesca y sus derivados. El lugar de consumo implicado en la ocurrencia de brotes de ETA correspondió al hogar (49%), seguido de establecimiento educativo (14%) y restaurante comercial (9%). Los agentes etiológicos más prevalentes detectados en muestras biológicas, en alimentos, en superficies y en manipuladores de alimentos fueron: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

*Salmonella* spp. y hongos entre otros (Instituto Nacional de Salud, 2011a y b).

De acuerdo con Vásquez *et al.* (2007), la frecuencia de las ETA se proyecta al incremento, debido a la urbanización, modos de vida y modificación de los hábitos alimentarios de la población. La tendencia generalizada a tomar los alimentos fuera del hogar, por la jornada de trabajo y por el estudio, obligan al consumo de alimentos en diferentes establecimientos. Muchos alimentos comercializados, se pueden contaminar, adquiriendo así características altamente peligrosas, por constituir un transporte potencial para los patógenos. Estos alimentos, generalmente, requieren una estricta refrigeración y, debido a su composición o características físicas, químicas o biológicas favorecen el crecimiento de microorganismos y la formación de sus toxinas, desarrollando gran afinidad al deterioro, como son los embutidos, productos de la pesca, lácteos, carnes y huevos (Durango *et al.* 2004; Rincón *et al.* 2011). Los alimentos son vectores de más de 200 enfermedades incrementándose en países, como el nuestro, donde factores socioeconómicos, culturales y sanitarios, se incluyen en programas de vigilancia y de seguridad alimentaria (Vargas *et al.* 2004; Díaz *et al.* 2006). Las enfermedades parasitarias producidas por protozoos y helmintos representan un problema importante de salud pública. Estas enfermedades afectan a más de dos billones de personas de la población mundial (Vásquez & Campos, 2009; Sánchez, 2006).

Las especies de *Salmonella* spp. son los miembros más complejos de la familia Enterobacteriaceae, con aproximadamente 2.400 serotipos descritos hasta la fecha. Actualmente, el género se clasifica en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Vásquez *et al.* 2007). Este género es patógeno para humanos y para animales, se adquieren por vía oral, causando enteritis, infección sistémica y fiebre entérica y se asocian con la ingesta de alimentos mal preparados o manipulados inadecuadamente (Rodríguez & Prado, 2006; Rodolfo *et al.* 2012; Rincón *et al.* 2011).

La salmonelosis es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial. Las infecciones por *Salmonella* spp. pueden causar pequeños brotes en la población; entre 60 y 80% de los casos son esporádicos, aunque, a veces, se producen grandes brotes en hospitales, jardines infantiles, hogares geriátricos y restaurantes (Yáñez *et al.* 2008). *Salmonella enterica* ocasiona, en la mayoría de los casos, una enfermedad autolimitada, pero en personas jóvenes, en mayores o en inmunosuprimidas puede alcanzar la gravedad y causar la muerte (Irvine *et al.* 2009); este microorganismo esta asociado, frecuentemente, con enfermedad diarreica aguda, propagándose, principalmente, por la ingesta de alimentos, de aguas contaminadas o por personas infectadas asociadas a la manipulación de alimentos (Uribe & Suárez, 2006; Rodolfo *et al.* 2012).

Teniendo en cuenta el gran número de establecimientos que expenden alimentos en un sector del norte de Bogotá surgió el interés por conocer la frecuencia de microorganismos, como *Salmonella* spp. y enteroparásitos en manipuladores y alimentos vendidos en este sector.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo correspondió a un estudio descriptivo, no probabilístico, a conveniencia del investigador, quien evaluó la prevalencia de enteroparásitos y *Salmonella* spp., en alimentos y en manipuladores de alimentos. La población evaluada estuvo conformada por 60 manipuladores de alimentos de ambos géneros, distribuidos de la siguiente manera: 40, procedentes de restaurantes establecidos y 20, de venta ambulante, cercanos a un Centro Universitario, comprendidos entre la calle 170 a la calle 222 (sector norte de Bogotá). La población fue escogida por conveniencia, con base en un consentimiento informado. Se excluyeron aquellos manipuladores que hubiesen recibido tratamiento con antibacterianos y antiparasitarios el último mes.

**Obtención de las muestras:** De cada uno de los manipuladores, se recolectaron tres muestras: una, del alimento que estaba preparando al momento de la evaluación; un frotis de manos, incluidas las uñas y dos muestras de materia fecal, en donde se analizaron: coprológico (enteroparásitos) y coprocultivo (*Salmonella* spp.).

**Alimentos:** Se tomaron por duplicado 200 g y se envasaron en recipientes plásticos estériles, para luego ser transportados al laboratorio de Microbiología.

**Manos:** La muestra, se tomó por contacto directo en agar MacConkey (Mc) y, posteriormente, se realizó un hisopado con agua peptonada 0,1% estéril para después ser analizada en la búsqueda de enteroparásitos.

**Heces:** Previa explicación, dada a los manipuladores sobre la toma de muestra, se recolectaron heces de los manipuladores de alimentos en dos días diferentes, para su posterior transporte al laboratorio, en un lapso no mayor de 2 horas.

**Análisis Parasitológico:** Las muestras, se analizaron macroscópicamente, mediante observación simple del aspecto, consistencia, color, presencia de moco y sangre y parásitos adultos. Para el examen microscópico, se empleó la técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET) y, posteriormente, se realizaron montajes en lámina de vidrio, empleando lugol parasitológico y coloración de Ziehl Neelsen modificada (Rodríguez & Prado, 2006).

**Bacteriológico:** Se realizaron cultivos directos de materia fecal (coprocultivo) en los medios: *Salmonella* - *Shigella* (SSA), Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Agar Mac Conkey (Mc). Las placas, se incubaron a 37°C, durante 24 - 48 horas, con una humedad del 90%; de igual manera, se llevó a cabo

un enriquecimiento de las muestras de materia fecal en caldo selenito, el cual, se incubó a 37°C, durante 6 -18 horas, a partir del cual, se practicaron subcultivos en los medios anteriormente mencionados. Posteriormente, se aplicó una evaluación macroscópica de las colonias y se determinó la identificación de género y de especie, mediante un micro método cualitativo, que emplea sustratos convencionales y cromogénicos, para la identificación de Enterobacterias (Roberts *et al.* 2000; Vargas *et al.* 2004).

Para el análisis del frotis de manos, se sembraron las muestras directamente y por estriación sobre los medios de cultivo XLD y MC, siguiendo los pasos anteriores. De las muestras de alimentos, se pesaron 25g y se homogenizaron con 225mL. de agua peptonada (1%); luego, se incubaron a 37°C, por 24 horas; a partir de allí, se introdujo 1mL de cada muestra en 9mL de caldo Rappaport y caldo tetratonato; posteriormente, se efectuó un subcultivo en medios de SSA, Hecktoen y XLD; estas muestras fueron incubadas, a 37°C, por 24 horas. Las colonias sospechosas de pertenecer a *Salmonella* spp. fueron diagnosticadas, mediante pruebas bioquímicas miniaturizadas (Vargas *et al.* 2004).

**Aspectos éticos y legales:** Durante la realización del presente trabajo, se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los manipuladores de alimentos; de igual manera, no se reveló la identidad de los manipuladores de alimentos, ni de las entidades en donde se recolectaron las muestras.

Se realizó una estadística descriptiva y para el procesamiento de los datos, se empleó el programa estadístico para las ciencias sociales (SPSS) versión 18.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los manipuladores de alimentos de restaurantes establecidos, se destacan los siguientes resultados (Tabla 1). A partir de los coprológicos, se presentaron los siguientes hallazgos: *Blastocystis hominis*, 30% en manipuladores ambulantes y establecidos; quistes de *Giardia intestinalis*, 5% y 2,5%, respectivamente, en manipuladores ambulantes y establecidos; huevos de *Ascaris lumbricoides*, 10% y 2,5%, respectivamente; complejo *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*, 25% y 10%, respectivamente, en manipuladores ambulantes y establecidos. De acuerdo con lo anterior, se evidencia que los manipuladores de alimentos presentan parásitos intestinales representativos, lo cual, es relevante en la manipulación de alimentos.

El trabajo realizado por Rincón *et al.* (2009) contrasta con el presente estudio, en cuanto a la gran diversidad de enteroparásitos encontrados en manipuladores de alimentos. Este

Tabla 1. Resultados obtenidos entre los manipuladores de alimentos y los parámetros: coprológico, coprocultivo, frotis de manos y alimentos, en un sector de norte de Bogotá.

Parámetros evaluados		Sitio de Venta					
		Ambulante			Establecido		
		Recuento	% del N de la columna	% de la fila	Recuento	% del N de la columna	% de la fila
Coprológico	0	5	25,0	18,5	22	55,0	81,5
	<i>B. hominis</i>	6	30,0	33,3	12	30,0	66,7
	<i>E. histol-E. dispar</i>	5	25,0	55,6	4	10,0	44,4
	<i>Salmonella</i>	0	,0%	,0	0	,0	,0
	<i>H. Ascaris</i>	2	10,0	66,7	1	2,5	33,3
	<i>Q. Giardia</i>	1	5,0	50,0	1	2,5	50,0
	<i>C. parvum</i>	1	5,0	100,0	0	,0	,0
	<i>Q. E. coli</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
Coproculativo	0	17	85,0	32,1	36	90,0	67,9
	<i>B. hominis</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>E. histol-E. dispar</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Salmonella</i>	3	15,0	42,9	4	10,0	57,1
	<i>H. Ascaris</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Q. Giardia</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>C. Parvum</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Q. E. coli</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
Frotis de manos	0	15	75,0	28,3	38	95,0	71,7
	<i>B. Hominis</i>	3	15,0	60,0	2	5,0	40,0
	<i>E. histol-E. dispar</i>	1	5,0	100,0	0	,0	,0
	<i>Salmonella</i>	1	5,0	100,0	0	,0	,0
	<i>H. Ascaris</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Q. Giardia</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>C. parvum</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Q. E. coli</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
Alimentos	0	15	75,0	28,8	37	92,5	71,2
	<i>B. hominis</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>E. histol-E. dispar</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Salmonella</i>	5	25,0	62,5	3	7,5	37,5
	<i>H. Ascaris</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Q. Giardia</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>C. parvum</i>	0	,0	,0	0	,0	,0
	<i>Q. E. coli</i>	0	,0	,0	0	,0	,0

autor destaca que la especie más frecuente reportada de los helmintos fue *A. lumbricoides* (1,5%), seguido por *Trichuris trichiura* (0,5%) y *Uncinaria* (0,5%). Dentro de los protozoos patógenos, el parásito que más se detectó fue el complejo de *E. histolytica* / *E. dispar* (14,6%) y *G. intestinalis* (2,4%). Diferente a este estudio, se considera el hallazgo del protozoo, cuyo poder patógeno es aún controvertido, como es *B. hominis* (1,4%) y de parásitos comensales, como *Endolimax nana* (18,14%), *E. coli* (6,52%) y una asociación de *E. nana* y *E. coli* del (3,7%); todas las muestras fueron analizadas para coccidios intestinales (*Cryptosporidium* spp., *Isospora belli*, *Cyclospora* spp), obteniéndose resultados negativos. En el presente trabajo solamente se obtuvo un individuo con *Cryptosporidium* spp. y se resalta el hecho de encontrar un alto porcentaje (30%) de *B. hominis*.

El hecho de encontrar *B. hominis* en alimentos indica que los manipuladores han tenido una deficiente práctica en la manipulación de los alimentos y, por consiguiente, los han contaminado; éste parásito patógeno potencial se asocia en muchos casos con patología intestinal en pacientes inmunocomprometidos, de acuerdo con los trabajos realizados por Port *et al.* (2004); Rincón *et al.* (2009) y Pérez *et al.* (2008).

El presente estudio concuerda, parcialmente, con aquel realizado por Gómez *et al.* (1999), quienes llevaron a cabo una investigación epidemiológica descriptiva en manipuladores de alimentos, de los principales centros de expendio de alimentos, en la ciudad de Santa Clara (Cuba), identificando *G. intestinalis* (55,4%), *E. histolytica* (25,3%), *Enterobius vermicularis* (14,5%) y *T. trichiura* y *A. lumbricoides* (2,4%). La diferencia del presente estudio con el anterior, se obtuvo en que no identificamos *E. vermicularis*, *T. trichiura* y el porcentaje de *G. intestinalis* solamente correspondió al 5%.

Las amebas no patógenas, como *E. coli* encontradas en frotis de manos de los manipuladores de alimentos en el presente estudio es un indicativo de malos hábitos higiénicos, lo que concuerda con resultados similares de la investigación adelantada por Port *et al.* (2004), en Brasil, donde el parásito con mayor prevalencia en manipuladores de alimentos de hospitales públicos y privados fue también *E. coli* seguido de *E. nana*. A pesar que estas especies no son patógenas y no representan un gran impacto clínico son de gran relevancia epidemiológica, ya que muestra que el individuo parasitado puede ser un foco latente de contagio (Cortés *et al.* 2008).

A partir del coprocultivo en que se buscó la presencia de *Salmonella* spp., se obtuvo una prevalencia del 15 y 10% en manipuladores ambulantes y restaurantes, respectivamente. Se destaca que dentro de las salmonelas identificadas una cepa correspondió al serotipo Typhi y tres al Enteritidis, de acuerdo con la identificación bioquímica, por el método miniaturizado empleado.

La salmonelosis es una infección que puede ser asintomática, lo que genera un gran problema porque es altamente contagiosa, debido a la baja dosis infectante. Principalmente, es relevante en manipuladores de alimentos, los cuales, podrían ser portadores y diseminar el microorganismo (Fica *et al.* 2001). Los manipuladores con un coprocultivo positivo para *Salmonella* spp. no presentaron manifestaciones gastrointestinales, siendo así un riesgo para los consumidores.

Las infecciones en humanos producidas por *Salmonella* spp., en general, son causadas por la ingestión de alimentos contaminados por excrementos humanos o de animales infectados (Uribe & Suárez, 2006).

La ingesta de alimentos y de aguas contaminadas con dicho microorganismo, conlleva a una gastroenteritis pero, así mismo, puede ocasionar enfermedad extra - intestinal (Nataro *et al.* 2007; Rincón *et al.* 2011). Los brotes de ETA asociados con *Salmonella* spp., se producen, generalmente, por la ingestión de carne vacuna, derivados aviares, huevos o productos lácteos; de igual forma, se han asociado con algunos productos, como melones, tomates, ensaladas de verduras crudas, jugo de naranja no pasteurizado (Vásquez *et al.* 2007).

A partir del frotis de manos, se destaca que el 15% de los manipuladores de venta establecidos fueron positivos en 15%, para *B. hominis*; 5%, para el complejo *E. histolytica* / *E. dispar* y 5%, *Salmonella* spp., indicando que los manipuladores de alimentos presentan restos de heces en sus manos, lo cual, podría comprometer la salud de los consumidores. Estos datos concuerdan con el trabajo de Peralta & Ayala (2008), quienes afirman que las enfermedades producidas por protozoarios intestinales son causa de alta morbilidad, su distribución es alta en todo el territorio nacional, pero se desconoce su prevalencia actual.

Flórez *et al.* (2008) determinaron los factores relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes de cinco ciudades de Colombia, se encontraron importantes deficiencias en el cumplimiento de las buenas prácticas de elaboración de alimentos, en los hábitos de los manipuladores y en las condiciones sanitarias de los expendios de alimentos. Estos hallazgos implican la urgencia o necesidad de capacitación de los manipuladores en estos aspectos y fortalecer, desde la autoridad sanitaria, la inspección adecuada de las condiciones de calidad de los establecimientos y de las prácticas higiénicas (Instituto Nacional de Salud, 2011, a y b).

Después de los alimentos analizados, se evidenció que el 25% de los alimentos de venta ambulante y el 7,5% de los alimentos de venta establecida (chorizo frito, ensaladas de frutas, yogurt con cereal, arepa rellena y pincho de carne) fue-

ron positivos para *Salmonella* spp., representando un riesgo para la salud del consumidor. Dichos resultados concuerdan con el trabajo reportado por Bayona (2009), en donde se obtuvo el 25% de *Salmonella* spp. en alimentos vendidos en la vía pública, confirmando aún más el riesgo que representan ciertos alimentos, como la ensalada de frutas y los chorizos, reportados en el presente trabajo.

Con relación a *Salmonella* spp. aislada a partir de alimentos, el presente estudio coincide con el trabajo de Cavalcante *et al.* (2011), quienes al analizar muestras de jamón completamente cocido, encontraron que un 30% de las muestras estaban contaminadas con este microorganismo; los datos muestran la necesidad de una mejora en el control de calidad en todas las partes de los sistemas alimentarios; de igual manera, el presente estudio coincide con el trabajo reportado por Méndez *et al.* (2011), quienes al analizar 42 muestras de alimentos provenientes de venta ambulante en un sector de Chapinero en la ciudad de Bogotá, en el 2010, reportaron una prevalencia de *Salmonella enterica* no tifoidea, de 11,1%, en productos tales como hamburguesas y arepa con chorizo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se confirma la importancia atribuida a los manipuladores de alimentos, sin discriminar los de venta ambulante y de restaurantes, para lo cual, no se encontró ninguna asociación, de acuerdo con la prueba de Chi cuadrado.

En la mayoría de los casos, el personal seleccionado contratado para la manipulación de alimentos no es el más apropiado, puesto que no tienen conocimientos adecuados para realizar estas prácticas y aún con la capacitación del personal, la manipulación de los alimentos, tanto en crudo como en producto terminado no es el más adecuado, como lo confirman en sus trabajos Flórez *et al.* (2008); Durango *et al.* (2004); Pedregal *et al.* (2002); Bayona (2009) y Valdivieso *et al.* (2006).

Los manipuladores de alimentos de venta ambulante deberán asistir al médico como control; sin embargo, en el caso específico de los manipuladores de ventas callejeras, el 100% argumenta que no asisten periódicamente, salvo en extrema urgencia, ya que se ven afectados en sus ingresos.

La eliminación inadecuada de las aguas residuales y la basura derivadas de la venta callejera de alimentos incrementan el potencial de transmisión de enfermedades microbianas, al estimular la proliferación de insectos y de roedores transmisores de enfermedades entéricas (Pedregal *et al.* 2002).

De acuerdo con Quispe & Sánchez (2001), la correcta higiene de los alimentos esta determinada por diversos factores, entre los que se encuentran las condiciones de obtención de los mismos, características de los medios empleados para su

transporte, temperaturas y condiciones de almacenamiento, estructura de los locales, donde se manipulan los alimentos y las prácticas de los manipuladores.

El presente estudio coincide con el trabajo descrito por Vásquez *et al.* (2007), cuyo objetivo consistió en identificar los problemas sanitarios existentes en los servicios de alimentación de instituciones infantiles del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF), asociados con manipuladores. Los resultados microbiológicos evidenciaron deficiencias higiénicas sanitarias confirmando, aún más, los actuales resultados. De acuerdo con lo anterior, se resalta la importancia de formalizar un control sanitario estricto y permanente por las autoridades competentes, la implementación de los programas del plan de saneamiento básico y la capacitación en buenas prácticas de manufactura para todos los manipuladores, lo cual, garantiza la inocuidad y la calidad de los alimentos, para proteger la salud y el bienestar de la población infantil.

La presencia de patógenos, como son *E. histolytica* / *E. dispar*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *A. lumbricoides* en heces de manipuladores de alimentos representan un riesgo de importancia, a nivel de salud pública, lo cual, nos compromete como comunidad académica a difundir y a socializar estos resultados, con el fin de promocionar y de prevenir las enfermedades, que estos microorganismos producen.

El presente trabajo determinó la prevalencia de microorganismos a los que estamos expuestos los consumidores, ya que una gran cantidad de la población bogotana se ve en la necesidad de consumir alimentos fuera del hogar, acudiendo a restaurantes y a puestos ambulantes de ventas de alimentos, donde se ingieren diferentes productos, sin que se guarden las normas y los procedimientos que se deben tener para la elaboración, la preparación, el consumo y la distribución de alimentos.

**Agradecimientos.** El autor agradece el apoyo brindado por la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, a la Facultad de Medicina y a los docentes: Dra. María Teresa Ríos, Dr. Fernando Gallego y Dr. Elkin Higuera, por sus orientaciones y valiosos aportes con el programa estadístico. **Financiación:** El trabajo fue financiado por la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. **Conflictos de interés:** El autor declara que no existe ningún conflicto de interés que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BAYONA, M. 2009. Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector

- del norte de Bogotá. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 12(2):9-17.
2. CAVALCANTE, A.; TEIXEIRA, E.; FRIZZO, S.; DE SOUZA, N.; CAVALCANTE, A.; MONTENEGRO, T. 2011. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. Ciênc. Saúde Coletiva. 16(2):657-662.
  3. CORTÉS, D.; ESTRADA, M.; ÁREAS K.; SIERRA, A. 2008. Frecuencia de parasitismo intestinal en expendedores de alimentos ubicados en los recintos de la UNAN-León. Universitas. 2:25-28.
  4. DÍAZ, T.; CABALLERO, A.; DÍAZ, J.; CARDONA, M.; MOREJÓN, P.; SÁNCHEZ, Y. 2006. Estudio, control y prevención de las ETA: infección e intoxicación por alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Cuba. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 26:95-100.
  5. DURANGO, J.; ARRIETA, G.; MÁTTAR, S. 2004. Presencia de *Salmonella* spp en un área del Caribe Colombiano: un riesgo para la salud pública. Biomédica. 24:89-96.
  6. FICA, C.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I. 2001. Cambios epidemiológicos de la salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. Rev. Chil. Infect. 18(2):85-93.
  7. FLÓREZ, A.; RINCÓN, C.; GARZÓN, P.; VARGAS, N.; ENRÍQUEZ, C. 2008. Factores relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes de cinco ciudades de Colombia, 2007. Infeccio (Colombia). 12(4):255-266.
  8. GÓMEZ, M.; ORIHUELA, J.; ORIHUELA, M.; FERNÁNDEZ, N. 1999. Parasitismo intestinal en manipuladores de alimentos. Rev Cubana Med. Gen. Integr. 15(5):520-523.
  9. GÜBBAY, L.; GALANTERNIK, L.; GALAN, G.; CABRERA, J.; DURANGO, M. 2004. *Staphylococcus aureus*: sensibilidad antibiótica y detección de enterotoxinas de cepas aisladas en alimentos y manos de manipuladores. Rev. Cien. Venezuela. 30:4-12.
  10. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2011 a. Informe de evento: Enfermedades transmitidas por alimentos, hasta el período epidemiológico 13 del año 2011. Disponible desde Internet en: <http://www.ins.gov.co> (con acceso 26/09/12).
  11. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 2011 b. Vigilancia y control en Salud pública: Protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible desde Internet en: <http://www.ins.gov.co> (con acceso 26/09/12).
  12. IRVINE, W.; GILLESPIE, I.; SMITH, F.; ROONEY, P.; MCCLENAGHAN, A.; DEVINE, M.; TOHANI, V. 2009. Investigation of outbreak of *Salmonella enterica* serovar Newport infection. Epidemiol. Infect. 137:1449-1456.
  13. MÉNDEZ, I.; BADILLO, C.; ORTÍZ, G.; FACCINI, A. 2011. Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. Médicas UIS. 24:26-33.
  14. MERINO, L. 2008. Importancia de los vegetales que se consumen crudos en la transmisión de enfermedades de origen alimentario. Disponible desde Internet en: <http://www.siicsalud.com-des-des043-05504016.html> (con acceso 03/05/09).
  15. NATARO J.; BOPP, C.; FIELDS, P.; KAPER, J.; STROCKBINE, N. 2007. *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella*. In: Murray PR, Baron E, Jorgensen J, Landry M., Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press. p.670-687.
  16. PEDREGAL, F.; GARCÍA, M.; NAVARRO, A.; LÓPEZ, F. 2002. Estudio microbiológico y condiciones sanitarias de los comedores no permanentes en Albacete, España. Centro de Salud. 10(6):330-332.
  17. PERALTA, M.L.; AYALA, J. 2008. Algunas consideraciones sobre la prevalencia actual de *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, coccidios, microsporidios y mixosporidios en Colombia. Salud Uninorte. 24(2):294-302.
  18. PÉREZ, G.; ROSALES, M.; VALDÉZ, R.; VARGAS, F.; CORDOVA, O. 2008. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. Rev. Per. Med. Exp. Salud Pública. 25(1):144-148.
  19. PORT, A.; ANTÚNES, C.; MACHADO, O. 2004. Hospital food handlers in Niteroi, RJ, Brazil: Intestinal parasitism. Arch. Latinoam. Nutr. 54:395-401.
  20. QUISPE, J.; SÁNCHEZ, V. 2001. Evaluación microbiológica y sanitaria de puestos de venta ambulatória de alimentos del distrito de Comas, Lima, Perú. Rev. Per. Med. Exp. Salud Pública. 72:67-75.

21. RINCÓN, D.; RAMÍREZ, R.; VARGAS, J. 2011. Transmisión de *Salmonella enterica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud. 43(2):167-177.
22. RINCÓN, C.; GARZÓN, P.; GUASMAYAN, L.; FLÓREZ, A. 2009. Frecuencia de parasitismo intestinal en manipuladores de alimentos de cinco ciudades de Colombia, 2008. NOVA- Publ. Cient. Cienc. Bioméd. 7:80-84.
23. ROBERTS, D.; HOOPER, W.; GREENWOOD, M. 2000. Microbiología práctica de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. (España). p.276.
24. RODRÍGUEZ, C.; PRADO, C. 2006. Microbiología: lo esencial y lo práctico. Organización Panamericana de la Salud (E.U). 248p.
25. RODÚLFO, H.; DE DONATO, M.; LUIGGI, J.; MICHELLI, E.; MILLÁN, A.; MICHELLI, M. 2012. Molecular characterization of *Salmonella* strains in individuals with acute diarrhea syndrome in the State of Sucre, Venezuela. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 45(3):329-333.
26. SÁNCHEZ, C. 2006. Ensayo: Una mirada a las enfermedades parasitarias en el país. NOVA. 4:100-103.
27. URIBE, C.; SUÁREZ, M. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Col. Med. 37:151-158.
28. VALDIVIESO, N.; VILLALOBOS, L.; MARTÍNEZ, R. 2006. Evaluación microbiológica en manipuladores de alimentos de tres comedores públicos en Cumana, Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 26(2):95-100.
29. VARGAS, J.; CLAVO, N.; MÁTTAR, S. 2004. Detección de *Escherichia coli* O 157: H7 y *Salmonella* spp en cerdos del departamento de Córdoba. Rev. MVZ Córdoba. 9(1):386-392.
30. VÁSQUEZ, G.; GÓMEZ, E.; GAMBOA, E. 2007. Condiciones higiénico sanitarias de los servicios de alimentación en Instituciones infantiles del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de Bucaramanga, Colombia. Rev. Cub. Aliment. Nutr. 17:23-33.
31. VÁSQUEZ T, O; CAMPOS R., T. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Rev. Centro Invest. U. La Salle (México). 8(31):75-90.
32. YÁNEZ, E.; MÁTTAR, S.; DURANGO, A. 2008. Determinación de *Salmonella* spp por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Infectio. 12(4):246-253.

Recibido: Julio 16 de 2012

Aceptado: Octubre 18 de 2012

# RÉPLICAS ÓSEAS EN RESINA POLIÉSTER COMO HERRAMIENTA DIDÁCTICA PARA EL APRENDIZAJE DE ANATOMÍA

## POLYESTER RESIN BONE REPLICAS, AS DIDACTIC TOOL FOR ANATOMY LEARNING

Yobany Quijano Blanco<sup>1</sup>, Freddy Camilo Rodríguez M.<sup>2</sup>, Karen Peralta R.<sup>2</sup>, Sebastián Cortés C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Médico Cirujano, Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A Calle 222 No. 54-37, Bogotá D.C. Especialista en Docencia Universitaria U. Militar. M.Sc. Morfología Humana U. Nacional de Colombia. globdimorf@udca.edu.co; <sup>2</sup>Estudiantes Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, chamilo12@hotmail.com Calle 6D No 79 A 76 interior 2 apto 206, Bogotá, D.C.

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 275 - 281, 2012

### RESUMEN

Las técnicas utilizadas para la reproducción de piezas óseas humanas con fines académicos intentan hallar métodos que permitan obtener réplicas óseas exactas de buena calidad, conservando, dentro de lo posible, los elementos anatómicos y accidentes óseos, en tres dimensiones, lo cual, no es tan fácil de obtener con las técnicas existentes. Mediante el procedimiento que se utilizó en este estudio para su realización obtuvimos, como primera medida, moldes y copias exactas de los huesos de los miembros inferiores, superiores y del cráneo; de estos últimos, algunos desarticulados, para facilitar su manejo. El material empleado en esta técnica para obtener réplicas óseas exactas fue la resina de poliéster, mejorando, desde el punto de vista pedagógico, las estrategias didácticas y de aprendizaje, para los estudiantes de anatomía. En el proceso, se dispusieron, como moldes, huesos reales de todas las dimensiones, fibra de vidrio, carbonato de calcio, resina poliéster, esta última, como componente principal de la réplica, logrando una copia fiel de cada uno de los huesos humanos utilizados, encontrando una adecuada fidelidad, en cuanto a cada uno de los accidentes anatómicos óseos, lo cual, permite prevenir complicaciones, que se pueden presentar durante la manipulación y la adquisición de huesos reales, ante los organismos de salud y cementerios. De esta manera, se halló otra alternativa para el manejo externo de huesos humanos, con fines de docencia e investigación, en las diferentes facultades de medicina.

Palabras clave: Hueso, resina poliéster, réplica, didáctica.

### SUMMARY

The techniques used to reproduce human bone pieces for academic uses are looking for methods which permit to obtain exact replicas of good quality preserving as far as possible the anatomical elements and bone accidents in three dimensions, which is not so easy to get with the existing techniques. With the method used in this study, as a first step molds and exact copies of the leg bones, upper limbs and the disarticulated skull bones (disarticulated for ease of handling) were obtained. The material used in this technique to obtain exact bone replicas was polyester resin, tended to improve from the pedagogical point of view, the teaching and learning strategies for anatomy students. In the process real bones as templates for all actual dimensions, glass fiber, calcium carbonate, polyester resin were used, the latter as a main component of our replica, obtaining a faithful copy of each of the mentioned human bones, finding a suitable fidelity to each anatomical bone accident, which can prevent complications that may occur during handling and acquisition of real bones to health agencies and cemeteries. Therefore, another alternative for the management of human bones for teaching and research purposes in the various medical schools is presented.

Key words: Bone, polyester resin, reply, didactic.

### INTRODUCCIÓN

En el 2008, estaban registradas 53 facultades de medicina en Colombia, generando una alta demanda de piezas anatómicas óseas, contrastando con su disponibilidad, por las restricciones impuestas por la Fiscalía General y el

Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Carrera, 2009).

Actualmente, en las facultades de medicina y demás instituciones relacionadas con las ciencias de la salud, los huesos humanos no son de fácil adquisición y los que existen son facilitados para la manipulación por parte de estudiantes, únicamente dentro del anfiteatro, puesto que no se pueden utilizar fuera de este recinto, por ser de riesgo biológico (Delgado *et al.* 2009).

Dada la escases de material cadavérico disponible, en forma permanente para el aprendizaje anatómico, las facultades de medicina han tenido que recurrir al uso de diversos medios didácticos que los remplacen, tales como modelos a escala de las piezas anatómicas, imágenes diagnósticas, arte y diversos programas virtuales (García, 2009); sin embargo, dadas las competencias que se espera adquieran los estudiantes durante su estancia en el curso de morfología es necesario que todo material didáctico represente, exactamente, la morfología y ofrezca una visión tridimensional de estas piezas, para entender la disposición anatómica del cuerpo humano, en forma articulada o desarticulada (D'Acuña & Guiraldes, 1998). En la actualidad, se venden piezas óseas plásticas, que pueden ser utilizadas con fines de docencia, pero, en algunos casos, adolecen de cualidades de textura, de ausencia de forámenes, de procesos, de falta de cavidades y se tiene la sensación que es un hueso plástico (Mochida *et al.* 2010), lo que lleva al fracaso en la adquisición de algunas de las competencias esperadas.

La utilización de materiales sintéticos líquidos, para el aprendizaje de la anatomía ósea, ha sido de gran apoyo para su enseñanza (Matamala *et al.* 1988; Oda & Sant'Ana, 2003), así como también la inyección de resinas poliéster acrílicas (Manjarrés, 2011), las cuales, han permitido elaborar moldes de diversas estructuras, a bajo costo y una adecuada calidad de cada uno de los huesos de los miembros superiores, inferiores y del cráneo (Villarroel Guerra & Medina Otazo, 2011).

En Colombia, antes de obtener huesos humanos, con fines de docencia e investigación, el cadáver debe pasar por una serie de requisitos médicos legales (Osorio *et al.* 2004), que implican una estricta cadena de custodia y enfrentan al cadáver, potencialmente donable, a las facultades de medicina, ante dos situaciones: si el cadáver se encuentra sin identificar debe transcurrir un tiempo determinado en medicina legal, lo que facilita su descomposición y, por otro lado, si el cadáver tiene familiares, deben donar el cadáver con fines de docencia e investigación, previa firma de un consentimiento informado (Osorio & Santana, 2005; Franco, 2007).

Dada la dificultad en la consecución de piezas anatómicas, su alto costo social, las dificultades para su preservación y el riesgo biológico, se desarrolló una técnica que proporciona réplicas exactas de los huesos. En este proceso, se usan huesos reales que sirven como molde, empleando, inicialmente arcilla, fibra de vidrio, silicona (Guerrero *et al.* 2011) y resina poliéster, generando réplicas óseas, con características similares a las originales. Dichas réplicas presentan como ventajas un costo de producción bajo, una calidad adecuada para la enseñanza de la anatomía, con los más altos estándares (Przybysz & Scolin, 2008), un bajo costo social y un riesgo biológico inexistente (Villarroel Guerra & Medina Otazo, 2011), lo que permitiría, con su aplicación, disminuir las dificultades en la enseñanza de la anatomía, presentes en este momento en Colombia.

**Componente Ético.** El material óseo original utilizado en este estudio fue obtenido basándose, estrictamente, en los criterios definidos para realizar una autopsia médico-legal, contenidos en el decreto 786 de 1990 (Ministerio de Salud Pública).

Además, se siguieron todos los principios de la declaración de Helsinki 2000 para investigación médica, garantizando un trato respetuoso a las piezas obtenidas en el estudio, garantizando la confidencialidad de los datos de la persona fallecida, su dignidad y su integridad.

Adicionalmente, la resolución 8430 de 1993 (Ministerio de Salud), en su artículo 16 párrafo primero, dice que en investigaciones con riesgo mínimo o sin riesgo, el comité de ética puede eximir al investigador de la realización de consentimiento informado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El primer paso consistió en tomar como molde los huesos del miembro inferior y superior del lado derecho, del neurocráneo y vicerocráneo, para iniciar el proceso de réplica.

Como segundo paso, se realizó una correcta limpieza de las piezas para no dañarlas ni alterarlas en su constitución; para esto, se procedió a cubrir la superficie del hueso a replicar, con un lubricante, lo que facilitó el posterior retiro del molde.

En una tercera etapa del proceso, para la elaboración del molde primario, se aplicó una mezcla de caucho de silicona sobre el hueso (Figura 1): "silicona 497" (Fiber Glass Colombia S.A., 2006), un producto de moldeo por adición que ofrece alta dureza, para aplicaciones que requieran gran estabilidad dimensional y que por su baja densidad y viscosidad ofrece una excelente definición de la superficie a copiar. Posteriormente, se inició el proceso de secado, pero como las primeras copias nunca se secaron, se le adicionó



Figura 1. Molde primario. A) Hueso mandíbula y B) Hueso fémur, cubiertos con caucho de silicona.

el catalizador de caucho t 56 24 h, en una proporción del 7%, con lo que se obtuvo un Molde Primario completamente seco y duro, con un tiempo de secado variable, entre ocho y doce horas.

El cuarto paso consistió en aplicar en la superficie del molde primario fibra de vidrio, cuya cantidad varió de acuerdo a la superficie de cada hueso y, a este resultado, se le denominó molde secundario, pues esta fibra de vidrio ayudó a dar dureza y soporte al molde primario, el cual, se abre para sacar el hueso original, se vuelven a cerrar y se obtiene el molde listo para crear la copia.

Para obtener las réplicas óseas utilizando el molde secundario, se emplearon los siguientes materiales: Resina 809, mezclada con carbonato de calcio, para darle consistencia, en donde por cada litro de resina usada, se añadió 100 gramos de carbonato de calcio y a esta solución, se le agregó 4mL de catalizador MEK, los cuales, se vertieron dentro del molde secundario, obteniendo un contramolde que, igualmente, se dejó secar al medio ambiente, representando una adecuada réplica del hueso utilizado (Figura 2).

Una buena reproducción debe partir de un buen modelo y molde, por lo que se tuvo especial cuidado en la selección y en la extracción de la pieza ósea, en donde el análisis morfo-

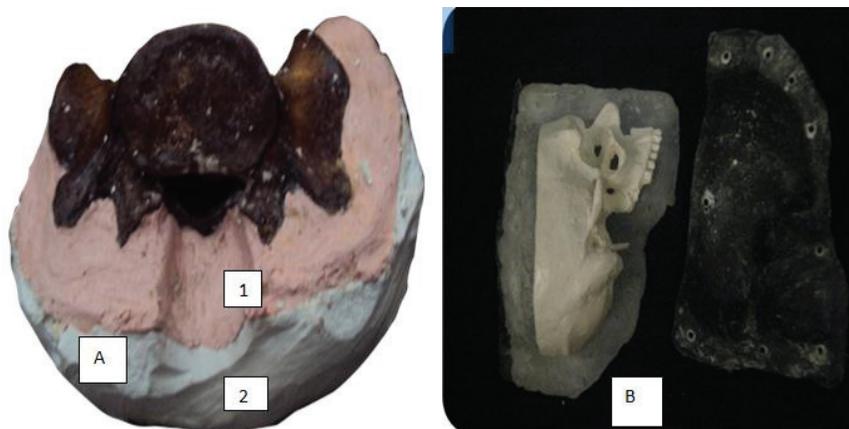


Figura 2. Molde secundario. A) Hueso sacro dentro del molde. (1) Caucho de silicona y (2) Fibra de vidrio. B) molde y contra molde de corte sagital de cráneo.

estructural del hueso fue fundamental para los distintos pasos. Fue necesario realizar restauraciones del modelo a reproducir y se hizo necesario sellar, parcialmente, canales y forámenes, con el fin de evitar retenciones del material de duplicación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar cada una de las réplicas, se observó una adecuada fidelidad con respecto a la pieza original y no necesitaron de ninguna otra intervención.

En cada una de las réplicas, en particular, se destacaron algunos detalles morfológicos, que demuestran la gran precisión de los duplicados, entre los que podemos mencionar: en la réplica del hueso fémur, en su vista posterior, se observa una cabeza (1), que va seguida del cuello anatómico (2), trocánter mayor (3) y trocánter menor (4) y el cuello quirúrgico (5), el cual, une el cuerpo a la extremidad superior del hueso; en el cuerpo, entre la

cara interna y externa, encontramos la línea áspera (6) y en el extremo inferior del hueso, por dentro y por fuera de la escotadura intercondilea (7) y limitándola, se hallan los dos cóndilos, interno (8) y externo (9); el cóndilo interno, se distingue del externo en que es menos grueso y está situado más hacia fuera de la línea axial del hueso y desciende más que el externo (Figura 3).

La réplica del hueso mandibular también permite apreciar, en una vista antero lateral, en su parte superior, dos procesos: uno anterior, denominado apófisis coronoides (1), que sirve de inserción para el músculo temporal y, otro posterior, denominado cóndilo mandibular (2). Entre ambos está la escotadura mandibular. El cóndilo, se encuentra recubierto por fibrocartilago y se articula con la fosa mandibular del hueso temporal, formando la articulación temporomandibular, situada por delante del canal auditivo externo. También presenta un ángulo de aproximadamente  $15^\circ$ , denominado ángulo mandibular (3), el cuerpo mandibular (4), la línea oblicua y el arco alveolar (Figura 4).

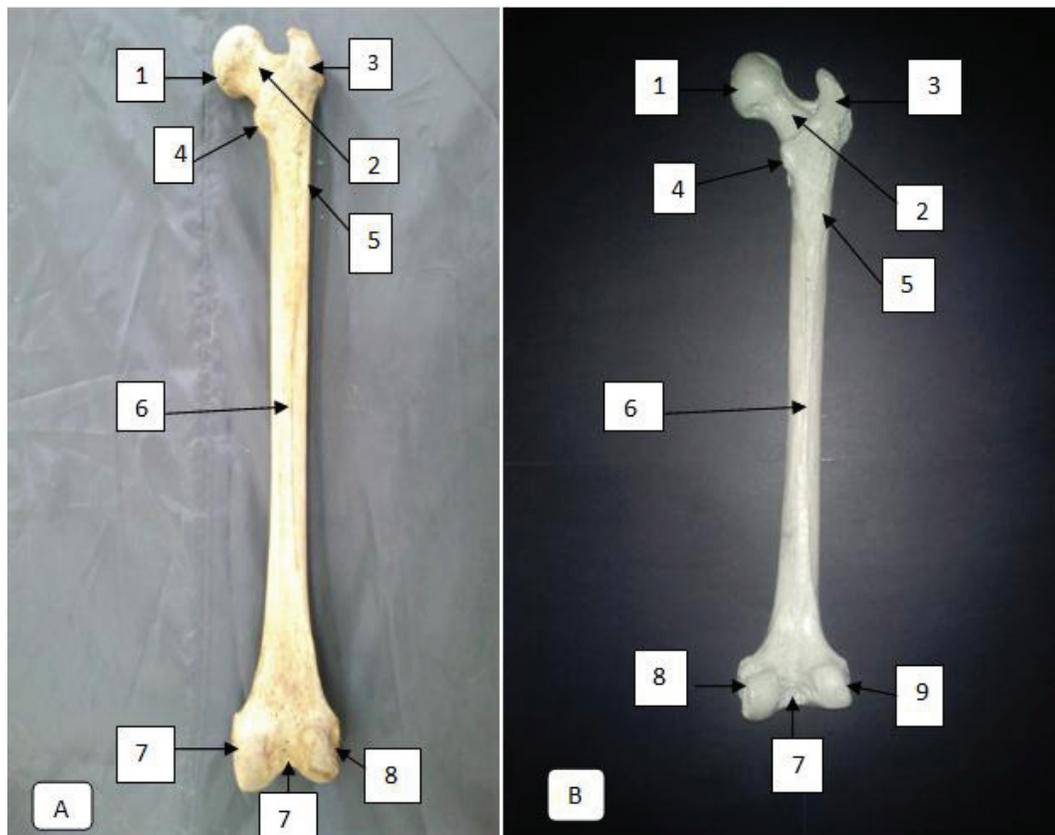


Figura 3. Hueso Fémur, vista posterior. A) Pieza original y B) Réplica final. (1) Cabeza; (2) Cuello anatómico; (3) Trocánter mayor; (4) Trocánter menor; (5) Cuello quirúrgico; (6) Cuerpo y línea áspera; (7) Escotadura intercondilea; (8) Cóndilo interno y (9) Cóndilo externo.

Destacamos que cada réplica conserva los parámetros morfológicos de la pieza original, como crestas, rugosidades, surcos, forámenes, procesos, líneas, entre otros.

Para elaborar las réplicas, se aplicaron otras técnicas y se utilizaron diversos materiales, diferentes a los reportados en otros estudios, como resultado de múltiples ensayos.

Buscamos un procedimiento que diera fidelidad y resistencia brindando la oportunidad de obtener réplicas óseas exactas de los huesos de miembro inferior y del cráneo, proporcionando una copia con una adecuada exactitud, aproximadamente, del 98%, de cada uno de los accidentes óseos y de sus formas anatómicas, permitiendo apreciar, desde los forámenes más pequeños hasta las

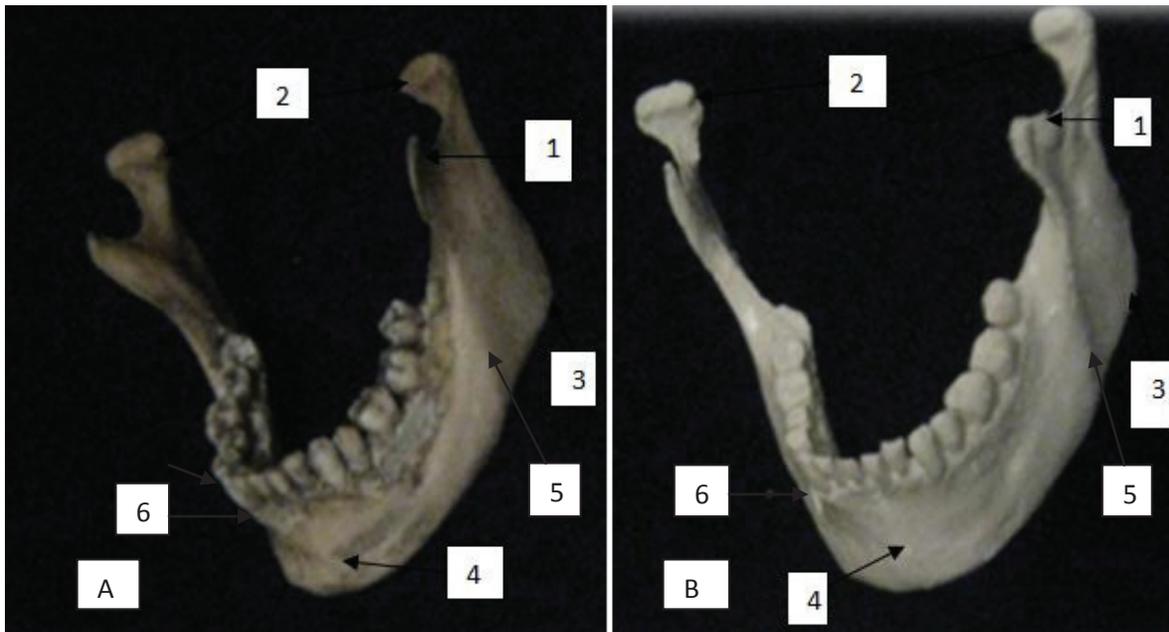


Figura 4. Hueso mandíbula, vista anterolateral. A) Pieza original y B) Réplica final. (1) Apófisis coronoides; (2) Cóndilo mandibular; (3) Ángulo mandibular; (4) Cuerpo mandibular; (5) Línea oblicua y (6) Arco alveolar.

estructuras más grandes, independientemente del tamaño, ya que con esta técnica no solamente se pueden replicar huesos pequeños sino también largos, todos ellos con una relevancia anatómica y clínica de excelente consideración, coincidiendo con Villarroel Guerra & Medina Otazo (2011), quienes señalan que las piezas presentan un alto grado de fiabilidad, comparado con la pieza replicada original y, por eso, pueden ser de gran utilidad en docencia e investigación.

Se emplearon y estudiaron, a lo largo del trabajo, otras técnicas que se fueron descartando y se decidió trabajar con caucho de silicona, resina poliéster y fibra de vidrio, algunos de estos son diferentes a los reportados en otros estudios, incluyendo la cantidad y el porcentaje de la materia prima empleada. Después de realizar el molde secundario y contramolde, se puede, fácilmente, replicar la misma pieza varias veces, debido a su gran durabilidad, la cual, es proporcionada por sus componentes, reduciendo el uso de piezas óseas originales por parte de los estudiantes y los docentes, disminuyendo el riesgo biológico.

La fragilidad de los huesos reales en comparación con las réplicas le dan, a estos últimos, una gran resistencia y un bajo costo.

Además, permite obtener piezas óseas del esqueleto humano con toda su tridimensionalidad, guardando las mismas características del original, siendo una ventaja el uso de la resina poliéster, de fácil preparación y con costo más bajo (\$1.200.000), comparado con el precio de las piezas originales (alrededor de \$3 millones). Con estos moldes, se pueden hacer una gran cantidad de copias, asumiendo solamente el costo de la resina poliéster, que es la materia prima de la copia, adicionándole carbonato de calcio y catalizador, la cual, a diferencia de la pieza original, no se deteriora y si se llegara a romper es fácilmente reemplazable, utilizando el mismo molde (Kurzer, 2006).

Las réplicas óseas conservan todas las características de los modelos originales independientemente de su tamaño y demás proporciones anatómicas, propias de cada una de

las estructuras replicadas, contribuyendo a la conservación del medio ambiente y a mitigar el riesgo biológico del ser humano.

Esta técnica permite reproducir partes óseas de difícil obtención, como por ejemplo, los huesos del cráneo, que presentan cavidades o senos, como es el caso del hueso frontal, con zonas extremadamente delgadas, encontrando que la réplica se hace más resistente, permitiendo su manipulación en el proceso de enseñanza y aprendizaje, donde el mantenimiento y el cuidado son mínimos, respecto a las piezas óseas originales (Segovia & Moreno, 1989).

El uso de estas réplicas que representan una adecuada fidelidad con respecto a las piezas originales, facilitan el proceso de enseñanza y de aprendizaje de la Anatomía Humana, siendo otra alternativa que, finalmente, logra ser una excelente herramienta educativa, destacándose la igualdad de estas reproducciones con respecto a sus originales, en cuanto a la calidad en todos sus parámetros y, además, podrían ser usadas en entrenamiento quirúrgicos por parte de los residentes de medicina, especialmente, en ortopedia y en traumatología, disminuyendo el uso de huesos humanos reales, durante su entrenamiento (Okada *et al.* 2010).

Con esta investigación, se buscó proporcionar una herramienta a los estudiantes de medicina de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A y demás facultades de Colombia y el mundo, que les permita mejorar el aprendizaje de la osteología, ya que antes de esta investigación no existían, en nuestro medio, réplicas exactas con este tipo de materiales, caracterizándose por ser resistentes y sin ningún riesgo biológico.

**Agradecimientos:** Al área de anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A; al señor Freddy Harvey Rodríguez Garavito y al señor Juan Mariño, por su colaboración durante la realización de las réplicas. A los avances de la tecnología, por brindarnos la información necesaria para la realización del presente trabajo. **Financiación:** El presente trabajo fue financiado por los autores que participaron en su realización. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado por todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CARRERA CARBAJO, I. 2009. Identificación de cadáveres y aspectos forenses de los desastres. Corpses identificación and disaster's forensic aspects. Brigada de Policía Científica. Publicaciones De La Unidad de Investigación en Emergencias y Desastres. España. 30p. Disponible desde Internet en: <http://es.scribd.com/doc/88155992/identificacioncadaveres> (con acceso 12/02/12).
2. DELGADO-ROSAS, M.; GORROSTIETA-HURTADO, E.; RAMOS-ARREGUÍN, J.M.; PEDRAZA-ORTEGA, J.C.; ACEVES-FERNÁNDEZ, M.A. 2009. Obtención de Modelos en resina epóxica de un fémur. Memorias del XV Congreso Internacional Anual de la SOMIM, Cd. Obregón, Sonora, Septiembre 2009. 10p. Disponible desde Internet en: [http://somim.org.mx/articulos2010/memorias/memorias2009/pdfs/A1/A1\\_83.pdf](http://somim.org.mx/articulos2010/memorias/memorias2009/pdfs/A1/A1_83.pdf) (con acceso 12/11/11).
3. D'ACUÑA, E.; GUIRALDES DEL C., H. 1998. Anatomía del cráneo en páginas Web. Rev. Chil. Anat. 16(1):115-166.
4. FIBER GLASS COLOMBIA S.A. 2006. La verdad acerca de la fibra de vidrio y la salud. Una Relación Estudiada. p.1-2. Disponible desde Internet en: <http://www.fiberglasscolombia.com.co/admin/assetmanager/images/catalogo%20fibra-salud3.pdf> (con acceso 06/07/11).
5. FRANCO P., M. 2007. Diligencia de levantamiento de cadáver. Criminalística.com.mx y Criminalistic.org. Disponible desde Internet en: [http://criminalistic.org/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=413](http://criminalistic.org/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=413) (con acceso 06/07/11).
6. GARCÍA D., S. 2009. Los polímeros en la época de difusión de estilos artísticos. Arte Individuo y Sociedad. España. 21:27-36.
7. GUERRERO JIMÉNEZ, M. DE VALLE; LISARTE VILLALBA, J.; MÁRQUEZ CAMACHO, J.I.; RAMÍREZ GRANADOS, A. 2011. Plan de Negocio MBA PART TIME 2010-2011. 216p. Especificaciones Técnicas del producto. Silicona. p.60. Disponible desde Internet en: [http://www.eoi.es/savia/pubman/item/eoi:67023:2/component/eoi:67020/EOI\\_ProyectoMBAPT\\_WH](http://www.eoi.es/savia/pubman/item/eoi:67023:2/component/eoi:67020/EOI_ProyectoMBAPT_WH) (con acceso 12/11/11).
8. KURZER, M. 2006. Estudio comparativo de dureza en dientes artificiales fabricados con diferentes tipos de resinas acrílicas. Revista EIA. 6:121-128.
9. MANJARRÉS H., F. 2011. Resinas transparentes con y sin color. Unicor S.A. Disponible desde Internet

- en: [http://www.unicorsa.com/pdf/RESINAS\\_TRANSPARENTES\\_CON\\_Y\\_%20SIN\\_%20COLOR.pdf](http://www.unicorsa.com/pdf/RESINAS_TRANSPARENTES_CON_Y_%20SIN_%20COLOR.pdf) (con acceso 05/08/11).
10. MATAMALA, F.; OLAVE, E.; HENRÍQUEZ, J.; CHAVEZ, R. 1988. Experiencia de siete años en el diseño y uso de material didáctico anatómico de bajo costo. *An. Anat. Norm.* 6(6):208-213.
  11. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. República de Colombia. Decreto 786 de 1990, por el cual se reglamenta parcialmente el título IX de la ley 09 de 1979, en cuanto a la práctica de autopsias clínicas y médico-legales, así como viscerotomías y se dictan otras disposiciones. *Diario Oficial No. 39.300*, de 17 de abril de 1990. Disponible desde Internet en: [www.presidencia.gov.co/.../decretoslinea/1990/abril/.../dec786161990.doc](http://www.presidencia.gov.co/.../decretoslinea/1990/abril/.../dec786161990.doc) (con acceso 10/07/11).
  12. MINISTERIO DE SALUD. República de Colombia. 1993. Resolución 8430 de 1993, por el cual se establecen normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. 4 de octubre de 1993. Disponible desde Internet en: [www.dib.unal.edu.co/promocion/etica\\_res\\_8430\\_1993.pdf](http://www.dib.unal.edu.co/promocion/etica_res_8430_1993.pdf) (con acceso 12/07/11).
  13. MOCHIDA O., D.; ALMEIDA DE SOUSA, A.M.; DE ANDRADE H., R.; AKIRA S., F. 2010. Surgical simulator for temporal bone dissection training. *Braz. J. Otorhinolaryngology.* 76(5):575-578.
  14. ODA, J.; SANTANA, D. 2003. Técnica de inclusão em resina de cortes transversais da medula espinhal coradas pelo método de Mulligan. *Int. J. Morphol.* 21(1):49-92.
  15. OKADA, D.; DE SOUSA, A.; HUERTAS, R.; SUZUKI, F. 2010. Surgical simulator for temporal bone dissection training. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 76(5):575-8.
  16. OSORIO I., L.C.; DUQUE P., M.A.; VELOSA A., G.; CARREÑO, M.I.; ARIAS G., L.F.; MORALES, M.L. 2004. Guía de Procedimientos para la Realización de Necropsias Médico-legales. 2ª ed. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Disponible desde Internet en: <http://www.medicinalegal.gov.co/images/stories/root/guias/guia.pdf> (con acceso 07/08/11).
  17. OSORIO I., L.C.; SANTANA L., A. 2005. Manual de Procedimientos de Fiscalía en el Sistema Penal Acusatorio Colombiano. Fiscalía General De La Nación. 216p.
  18. PRZYBYSZ, C.; SCOLIN, E. 2008. Técnica anatómica: confecção de modelos em resina a partir de vértebras humana. *F@PCiencia*, 2(10). Disponible desde Internet en: [http://www.fap.com.br/fapciencia/002/edicao\\_2008/010.pdf](http://www.fap.com.br/fapciencia/002/edicao_2008/010.pdf). (con acceso 23/08/11).
  19. SEGOVIA, J.; MORENO, E. 1989. Uso de yeso emparafinado en la fabricación de modelos anatómicos. *An. Anat. Norm.*, 7:158-9, 1989.
  20. VILLARROEL GUERRA, M.; MEDINA OTAZO, E. 2011. Técnica anatómica para restaurar y/o reproducir piezas óseas humanas de difícil obtención, para la investigación y docencia científica. *Int. J. Morphol.* 29(2):532-536.
- Recibido: Noviembre 19 de 2011  
Aceptado: Octubre 23 de 2012

# BIOACUMULACIÓN DE NAFTALENO Y FLUORANTENO EN EL MOLUSCO BIVALVO *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)

## BIOACCUMULATION OF NAPHTHALENE AND FLUORANTHENE IN THE BIVALVE MOLLUSC *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)

Mónica Zambrano<sup>1</sup>, Jorge Prada<sup>2</sup>, Gustavo Arencibia<sup>3</sup>, Alexis Vidal<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bióloga Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones Marinas CIM. Universidad de La Habana. La Habana. Cuba. monyazambrano@yahoo.com; <sup>2</sup> Biólogo. Área de Protección del Medio Marino. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico CCCP, Tumaco Colombia. jepr83@hotmail.com; <sup>3</sup> Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos. Centro de Investigaciones Pesqueras CIP. La Habana, Cuba. garen04@gmail.com; <sup>4</sup> Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Profesor Titular. Grupo de Farmacología-Toxicología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. alexis.vidal@infomed.sld.cu

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 283 - 290, 2012

### RESUMEN

Se realizó un seguimiento a la bioacumulación de naftaleno y de fluoranteno en el molusco bivalvo *Anadara tuberculosa*, mediante exposición de 60 organismos, a una concentración de 0,1 mg/g del compuesto de ensayo, en pruebas individuales para cada sustancia, por un periodo de 30 días. La máxima concentración de naftaleno acumulada por los organismos alcanzó los 3,42 mg/g, luego de 15 días de exposición, mientras que el fluoranteno presentó niveles de 194,77 mg/g, tras 5 días de prueba. En los organismos expuestos a naftaleno, se registraron variaciones en la concentración acumulada a lo largo de la prueba, contrario al comportamiento registrado en los organismos expuestos a fluoranteno, compuesto que presentó un incremento en concentración, durante la mayor parte del ensayo. Las diferencias en la cantidad acumulada de cada compuesto, se relacionan con las características fisicoquímicas de cada uno de ellos, contando el naftaleno con una menor estabilidad y mayor movilidad en los compartimentos ambientales frente al fluoranteno.

Palabras clave: Bioacumulación, hidrocarburos aromáticos policíclicos, naftaleno, fluoranteno, *Anadara tuberculosa*.

### SUMMARY

The bioaccumulation of naphthalene and fluoranthene in the bivalve *Anadara tuberculosa*, was followed through the development of semistatic tests and exposure of organisms in individual tests for each compound at a concentration

of 0.1 mg/g for a period of 30 days. The highest level of naphthalene accumulated by the organisms reached 3.42 mg/g after 15 days of exposure, while the lowest recorded concentration was presented after 20 days of test with 1.57 mg/g. For fluoranthene the initial concentration in organisms, when starting the trial was 5.88 mg/g and after exposure to the compound in the middle of the concentrations levels between 194.77 mg/g for 5 days of testing and 1011.30 mg/g for day 25 were registered. Fluctuations in terms of accumulation and purification of the compounds show a greater stability and incorporation of fluoranthene compared to naphthalene, which is related to the properties of each compound, especially those related to molecular weight and hydrophobicity.

Keywords: Bioaccumulation, polycyclic aromatic hydrocarbons, naphthalene, fluoranthene, *Anadara tuberculosa*.

### INTRODUCCIÓN

La contaminación marina en las zonas costeras es un tema de interés mundial, debido a la gran cantidad de sustancias tóxicas que son transportadas por las actividades humanas (Vagi *et al.* 2005; Lora *et al.* 2009). Entre los contaminantes presentes en ambientes marinos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) constituyen uno de los principales problemas, debido a los efectos adversos que causan en la salud de los organismos (Zaghden *et al.* 2007).

Algunos HAP son potenciales carcinógenos, mutágenos y teratógenos, tanto para los organismos acuáticos como para el hombre (Boscolo *et al.* 2007; Liu *et al.* 2009) y pueden afectar significativamente a los ecosistemas, influenciando las comunidades marinas planctónicas y bentónicas, así como organismos superiores, como peces y mamíferos (Pane *et al.* 2005), razón, por la cual, se encuentran en la lista de contaminantes prioritarios de la US EPA (Achten & Hofmann, 2009; Rey-Salgueiro *et al.* 2009).

Los HAP, se caracterizan por su alta toxicidad, estabilidad en el medio ambiente y gran afinidad por los tejidos grasos, lo que favorece su bioacumulación y representan grandes riesgos, por las alteraciones que pueden generar; su incorporación por parte de los organismos y su capacidad de biomagnificación dan lugar a que se transporten, a través de la cadena trófica (Okay *et al.* 2000; Vagi *et al.* 2005).

Uno de los principales componentes en las fracciones solubles de los aceites petrogénicos en agua (Hansen *et al.* 2007) es el naftaleno, que constituye una de las fracciones más tóxicas del petróleo para la vida marina, por causar los mayores efectos narcóticos, entre todos los HAP (Vijayavel *et al.* 2004). Otro componente importante del contenido total de HAP en el ambiente es el fluoranteno (IARC, 1983), compuesto con un mayor potencial carcinogénico y otros efectos de tipo crónico, siendo un potente cocarcinógeno, con efectos mutagénicos (Irwin *et al.* 1997a).

Estos compuestos, al igual que otros contaminantes presentes en los ambientes acuáticos, son evaluados en las diferentes matrices ambientales, para lo cual, se pueden emplear organismos pertenecientes al grupo de los moluscos bivalvos; estos organismos se alimentan a través de filtración, proceso mediante el cual incorporan contaminantes en sus tejidos y son sésiles, lo que les hace fácilmente monitoreables.

Entre los moluscos presentes en el Pacífico colombiano, el molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* es la especie de mayor importancia comercial (INCODER, 2007) y ha sido usada como organismo centinela en diferentes estudios de evaluación de la calidad ambiental en esta zona (Marrugo, 1993; Casanova, 1995; Sericano *et al.* 1995; Calero & Zambrano, 1997; Velásquez & Cortes, 1997).

Teniendo en cuenta los diversos eventos de contaminación registrados en la Bahía de Tumaco y dado que es en esta zona donde se realiza la mayor explotación de *A. tuberculosa* a lo largo del Pacífico colombiano, en el presente estudio, se evaluó la capacidad de bioacumulación presentada por organismos de esta especie, ante la exposición a diferentes concentraciones de naftaleno y de fluoranteno, compuestos que, debido a sus características, representan un riesgo

importante para la salud de los organismos y para el hombre, como consumidor final de los mismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los organismos de ensayo fueron adquiridos en el mercado local, procedentes de las zonas de manglar de la Bahía de Tumaco (1° 53' 10" N; 78° 39' 50" W); se trasladaron al Laboratorio de Bioensayos del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – Cccp, en donde fueron ubicados en tanques de 250 L de capacidad, con agua marina filtrada y aireación permanente, por un periodo de 72 horas.

Este periodo de aclimatación, se estableció teniendo en cuenta que para bioensayos en campo con moluscos bivalvos, debe tener una duración mínima de 48 horas, como periodo de depuración (APHA, AWWA, WEF, 2005). Transcurrido este periodo de tiempo, los organismos fueron distribuidos en doce acuarios de vidrio aforados a 20L para el inicio de las pruebas, colocándolos en número de diez en cada recipiente.

Previo inicio de las pruebas, se evaluó la estabilidad del naftaleno y del fluoranteno en el agua de disolución, bajo condiciones ambientales. Cada compuesto se diluyó en acetona y, luego, para cada uno de ellos, se preparó un recipiente de vidrio, con 3,0L de agua marina filtrada, al que se adicionaron 5,00mL de una solución de  $1,2 \times 10^3$  mg/L, obteniendo una concentración de 2,0mg/L de cada compuesto. Se tomaron 0,50L del agua de cada recipiente, con periodicidad de seis horas, para determinar la concentración a lo largo de la prueba.

Posteriormente, se realizó una prueba de bioacumulación con cada compuesto, exponiendo ejemplares de *A. tuberculosa* a concentraciones de 0,1mg/L. Durante cada prueba, se expusieron un total de 60 organismos al compuesto de ensayo, 30 al agua de disolución (control) y 30 más a un control con adición de 10mL de acetona (cantidad correspondiente a la proporcionada en solución con el compuesto de ensayo).

Durante las pruebas no se suministró aireación, pues esta acentúa la pérdida de los compuestos. Se realizaron recambios diarios del 100% del agua de disolución (cada 24 horas) en los recipientes de control (agua marina filtrada y solución de acetona) y en los recipientes de ensayo. El agua de recambio, se saturó con aire, con el fin de incrementar la concentración de oxígeno (OD).

Diariamente, se registraron los parámetros fisicoquímicos, salinidad, pH, temperatura y oxígeno disuelto, empleando un

equipo multiparámetros WTW Multi 340i. Con periodicidad de cinco días, se proporcionó alimento con el agua de recambio, suministrando diatomeas (*Chaetoceros* sp.), proporcionadas por el laboratorio de la empresa camaronera IDELPACIFICO S.A., con una densidad promedio de  $3 \times 10^6$  cel/mL, adicionando volúmenes equivalentes a 1L, en cada acuario.

Antes de iniciar cada bioensayo, se tomó una muestra de diez organismos, para determinar el contenido del compuesto que pudiesen presentar previo inicio de la prueba. La talla media registrada por los organismos de ensayo fue de 4,5 y 4,4cm de longitud total (LT) para las pruebas con naftaleno y con fluoranteno, respectivamente.

Las muestras para determinar la concentración de los compuestos acumulados consistieron en tomar diez organismos, con periodicidad de cinco días, determinando, a la vez, el contenido de lípidos.

La determinación de lípidos, se realizó empleando el método de extracción directa Soxhlet, utilizando éter etílico como solvente y la de los compuestos de ensayo, siguiendo las metodologías descritas por Russell *et al.* (2002), para la determinación por cromatografía de gases, para lo cual, se empleó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N), acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies – 5973N).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración inicial de naftaleno en el recipiente de ensayo equivalente a 2mg/g descendió a 1,04mg/g, tras seis horas de exposición y a 0,5mg/g, transcurridas 12 horas, razón, por la cual, durante la prueba de bioacumulación, se realizó una adición del 50% de la concentración inicial, suministrada para reponer la cantidad de compuesto que se pierde por volatilización. Esta disminución en concentración obedece a que el naftaleno es un compuesto moderadamente volátil (Preuss *et al.* 2003).

El fluoranteno no registró disminución en la concentración, aun transcurridas 24 horas de ensayo, lo que evidencia una mayor estabilidad de este compuesto en el medio, asociada a un mayor peso molecular (PM).

Los niveles de naftaleno en los organismos al inicio del experimento fueron de 1,04mg/g y durante la prueba los niveles del compuesto en los organismos variaron entre la concentración registrada, luego de 15 días de iniciada la prueba, con 3,42mg/g, como máximo nivel incorporado y la concentración presentada el día 20, con 0,157mg/g, siendo este el nivel más bajo registrado durante el ensayo (Figura 1).

La incorporación de este compuesto presentó un comportamiento con ascensos y con descensos a lo largo de la prueba, ya que el naftaleno es el compuesto que presenta mayor solubilidad, lo que le hace más disponible, pero, además, es el compuesto más volátil y cuenta con la menor lipofilia

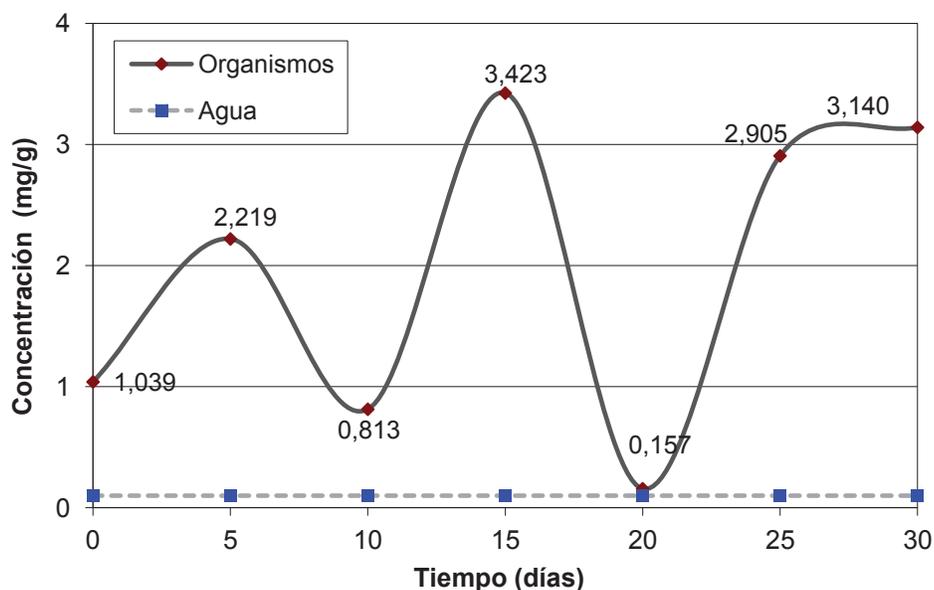


Figura 1. Comportamiento del naftaleno en *Anadara tuberculosa* durante la prueba de bioacumulación (mg/g - peso seco).

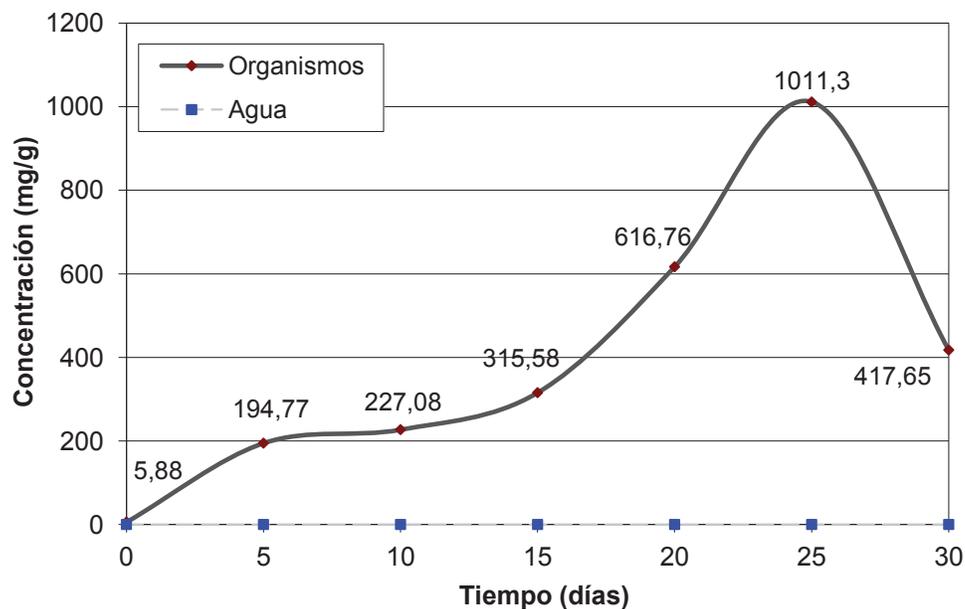


Figura 2. Comportamiento del fluoranteno en *Anadara tuberculosa* durante la prueba de bioacumulación (mg/g - peso seco).

dentro del grupo de los HAP (CCME, 2010), por lo que su retención por parte de los organismos es menos eficiente con respecto a los otros compuestos que poseen un mayor PM.

Este comportamiento cíclico se relaciona con el hecho que la bioconcentración del compuesto ocurre en un grado moderado; la depuración y el metabolismo proceden rápidamente en organismos acuáticos y, por esta razón, su impacto es considerado un problema de corto plazo (Irwin *et al.* 1997b).

El fluoranteno registró una concentración inicial de 5,88mg/g y, a lo largo de la prueba, las concentraciones incorporadas presentaron niveles entre los 194,77mg/g, para el quinto día de prueba y de 1011,30mg/g, para el día 25. La tendencia de incorporación de este compuesto fue creciente hasta el día 25 de exposición, con un posterior descenso del 41,3%, en la muestra correspondiente, al día 30 de ensayo (Figura 2).

Al igual que los HAP de alto peso molecular (4 - 6 anillos), el fluoranteno es más persistente que los compuestos más ligeros (Heath *et al.* 1993) y se acumula en mayor proporción con respecto a los mismos, tal y como se ha reportado en estudios realizados con otras especies de moluscos (Hellou *et al.* 1993; Krishnakumar *et al.* 1994; 1997).

Su incremento en concentración, se relaciona con los diferentes grados de lipofilia, de toxicidad y de persistencia de los HAP, que son más elevados cuanto mayor es el número

de anillos de la molécula (Bocio *et al.* 2005); su posterior descenso sugiere un proceso eficiente de depuración tras alcanzar un determinado nivel de incorporación, comportamiento similar al presentado en estudios realizados con otros invertebrados expuestos a este compuesto (Landrum *et al.* 2002; Krishnakumar *et al.* 1997).

La captación, la acumulación y la persistencia depende de la relación entre la hidrofobicidad (relación entre el coeficiente de partición octanol/agua -  $\text{Log}K_{ow}$ ) y el contenido de lípidos (Belfroid *et al.* 1996), siendo el  $\text{Log}K_{ow}$  para el naftaleno y el fluoranteno de 3,51 y 5,1, respectivamente (Peña *et al.* 2003), valores que se encuentran en el rango en el que se producen las mayores tasas de bioacumulación. A estas características, se suma como factor importante, la alta tasa de filtración que presentan los bivalvos, que para esta especie se estima en 50L/día (Fernández & Brunker, 1977), siendo esta la principal ruta de incorporación.

Pese a las diferencias en cuanto a incorporación, ambos compuestos son bioacumulables, debido a sus características hidrofóbicas y lipofílicas, por lo que, una vez, ingeridos su eliminación metabólica se hace lenta y dificultosa, tendiendo a acumularse en órganos de almacenamiento, como los constituidos por tejidos grasos (Fernández & Freire, 2005); sin embargo, son las características específicas de cada compuesto las que hacen que los niveles incorporados de naftaleno sean bastante inferiores con respecto al fluoranteno, pese a ser adicionados en concentraciones

iguales, ya que su bajo PM le concede una mayor movilidad con respecto a otros HAP y, por ende, es retenido por cortos periodos de tiempo, tal y como se mencionó previamente.

Los ascensos y los descensos en la concentración de ambos compuestos constituyen un comportamiento usual en los organismos expuestos a contaminantes, pues estos los incorporan y los eliminan, aunque se mantenga la exposición a los mismos (Calero & Zambrano, 1997; CSIC, 2003).

Los niveles de naftaleno y de fluoranteno incorporados por los organismos a lo largo de cada prueba fueron altos con respecto a la concentración proporcionada en el medio y evidencian la capacidad bioacumulativa de *A. tuberculosa*, lo que ratifica su importancia como organismo biomonitor y como una importante herramienta en la evaluación de contaminantes ambientales en el medio marino.

**Contenido de lípidos:** Durante ambas pruebas los organismos presentaron un comportamiento similar en cuanto a contenido lipídico, con ascensos y con descensos; estando influenciados por diferentes factores, entre ellos la presencia del compuesto.

Previo inicio de la prueba con naftaleno, el contenido lipídico registrado fue de 1,09% y de 1,43%, para los organismos de la prueba realizada con fluoranteno. Los niveles máximos se registraron transcurridos 15 días de prueba, con 1,59% y 1,77% y, los menores, a los de cinco días, con 0,58% y 0,83% para el naftaleno y fluoranteno, respectivamente (Figura 3).

Este descenso inicial en el contenido lipídico puede estar relacionado con una respuesta de los organismos ante las condiciones experimentales.

El mayor porcentaje de lípidos coincidió con el nivel más alto de naftaleno incorporado por los organismos, mientras que para el fluoranteno, se registró un ascenso importante en el contenido de lípidos, tras un significativo descenso en la concentración del compuesto.

El contenido de grasas constituye un aspecto fundamental en la retención de los HAP, pues son un importante reservorio de compuestos altamente liposolubles, por lo que el mismo se asocia con un mayor o menor grado de bioacumulación; sin embargo, el potencial de los tejidos para acumular estos compuestos esta en función de múltiples variables, como el estado nutricional, la concentración de lípidos, la duración de la exposición y la concentración en el medio (Riley *et al.* 1981).

El comportamiento de las grasas a lo largo de las pruebas no evidencia una relación con la concentración de los compuestos en los organismos, esto se debe, además, a que las movilizaciones de las reservas energéticas en respuesta a las condiciones ambientales y a que los contenidos de los diferentes sustratos energéticos pueden variar entre especies del mismo género; lo que ocurre en función de las necesidades metabólicas del organismo en un periodo dado (Acosta *et al.* 2010).

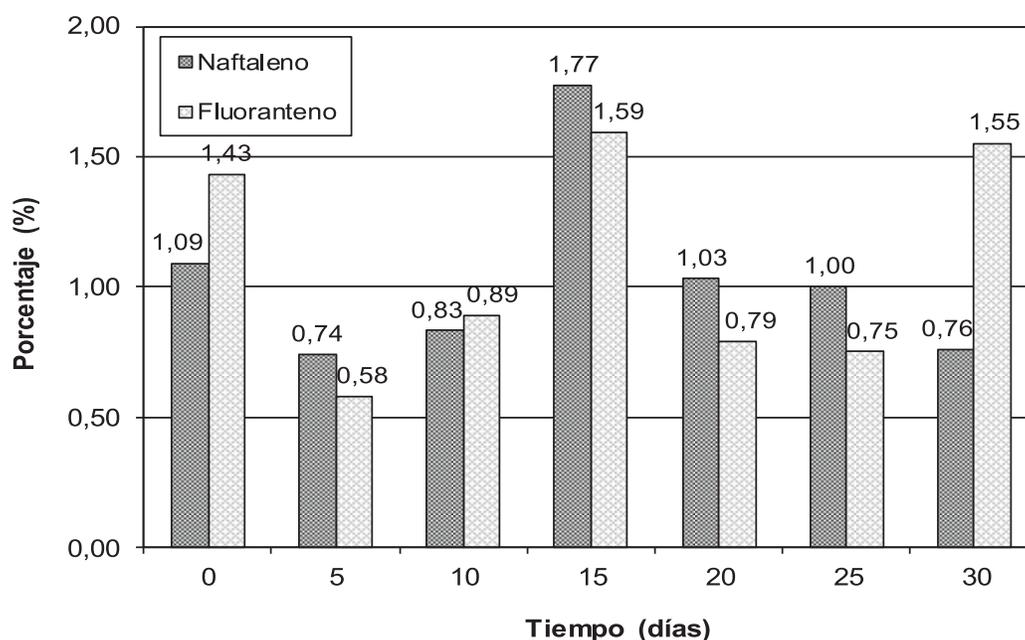


Figura 3. Comportamiento del contenido de grasas en *Anadara tuberculosa* durante las pruebas de bioacumulación.

**Parámetros fisicoquímicos:** Los valores registrados durante las pruebas de bioacumulación fueron en promedio de 24,3°C, para la temperatura; de 7,60, para el pH; de 30 ups, de salinidad y 4,7mg O<sub>2</sub>/L, de O.D.

Estos registros, se encuentran dentro de los rangos vitales conocidos para *A. tuberculosa* y otras especies del mismo género; en el caso específico del OD, esta especie tolera largos períodos de anoxia (Bayne, 1973), ya que las zonas estuarinas presentan cambios bruscos en los diferentes parámetros fisicoquímicos, causados por los cambios mareales (Prah *et al.* 1990) y, en periodos de marea baja, la concentración de OD disminuye notablemente.

Los rangos de temperatura en los que se desarrolla la especie varían entre 26 y 35°C (Borrero, 1986), rangos en los que se encuentran los organismos dentro de la bahía; la salinidad es un factor importante en la distribución de la especie, con mayores densidades entre 10 y 34 ups, disminuyendo en sitios, cuya salinidad desciende a niveles que pueden afectar la reproducción y el crecimiento (Silva-Benavides & Bonilla-Carrión, 2001).

La tolerancia de la especie a rangos amplios de parámetros fisicoquímicos y su adaptabilidad a condiciones de cautiverio, hacen de la misma un organismo adecuado en el desarrollo de este tipo de pruebas, permitiendo realizar evaluaciones del comportamiento y de los efectos adversos que generan determinados contaminantes al ingresar al ambiente marino.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Dirección del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – Cccp, por la financiación para el desarrollo del presente estudio; a los investigadores del Área de Protección del Medio Marino y al personal de apoyo civil y militar, por la colaboración logística durante el desarrollo del proyecto.  
**Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.  
**Financiación:** Este estudio fue financiado por el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – Cccp de la Dirección General Marítima – DIMAR.

## BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, V.; NATERA, Y.; LODEIROS, C.; FREITES, L.; VÁSQUEZ, A. 2010. Componentes bioquímicos de los tejidos de *Perna perna* y *P. viridis* (Lineo, 1758) (Bivalvia: Mytilidae), en relación al crecimiento en condiciones de cultivo suspendido. Lat. Am. J. Aquat. Res. (Chile). 38(1):37-46.
- ACHTEN, C; HOFMANN, T. 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – a hardly recognized source of environmental contamination. Sci. Total Environ. 407:2461-2473.
- APHA, AWWA, WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association. Washington, DC. Part 8000 Toxicity. 8, 94-100.
- BAYNE, B.L. 1973. The responses of three species of bivalve mollusk to declining oxygen tension at reduced salinity. Comp. Biochem. Phys. 45A:793-806.
- BELFROID, A.C.; SIJIM, D.T.H.M.; VAN GESTEL, C.A.M. 1996. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. Environ. Rev. (Canada). 4:276-299.
- BORRERO, J.F. 1986. The collection of early juveniles of *Anadara spp.* as a potential source of seed for culturing mangrove cockles on the Pacific coast of Colombia. Aquaculture. 59:61-69.
- BOCIO, A.; CASTELL, V.; FALCÓ, G.; GOSÁLBEZ, P.; RAMOS, J. 2005. Contaminants químicos, estudio de dieta total a Catalunya. Agència Catalana de Seguretat Alimentària. Generalitat de Catalunya. Generalitat de Catalunya. Barcelona (España). 143p.
- BOSCOLO, R., CACCIATORE, F.; GIOVANNARDI, O. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in transplanted Manila clams (*Tapes philippinarum*) from the Lagoon of Venice as assessed by PAHs/shell weight index: a preliminary study. Mar. Pollut. Bull. 55:485-493.
- CALERO, L; ZAMBRANO, M. 1997. Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos del petróleo en un molusco bivalvo *Anadara tuberculosa*. Bol. Cient. CCCP (Colombia). 6:131-137.
- CASANOVA, R. 1995. Estudio de la contaminación marina por compuestos organoclorados en el Pacífico colombiano. Bol. Cient. CCCP (Colombia). 5:146-160.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 2010. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and

- Human Health Effects). Scientific Criteria Document (revised). Quebec (Canada). 216p.
12. CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). 2003. Impacto de un vertido de petróleo sobre los organismos marinos. Algunas lecciones del vertido del Aegean sea. Informe técnico No. 15. (España). Disponible desde Internet en: <http://csicprestige.iim.csic.es/informes/info15.pdf> (con acceso 03/04/2011).
  13. FERNÁNDEZ, B.; BRUNKER, T. 1977. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica (I Parte). Rev. Biol. Trop. (Costa Rica). 25:101-107.
  14. FERNÁNDEZ, L.; FREIRE, J. 2005. Relaciones entre la salud de los ecosistemas marinos y la seguridad alimentaria: La marea negra del Prestige como un caso de estudio. (España). Disponible desde Internet en: [http://otvm.uvigo.es/investigacion/informes/documentos/archivos/Salud\\_ecosistemas\\_seguridad\\_alimentaria.pdf](http://otvm.uvigo.es/investigacion/informes/documentos/archivos/Salud_ecosistemas_seguridad_alimentaria.pdf) (con acceso 04/06/2011).
  15. HANSEN, B.H.; ALTIN, D.H.; VANG, SH.; NORDTUG, T.; OLSEN, A.J. 2007. Effect of naphthalene o gene transcription in *Calanus finmarchinus* (Crustacea, Copepoda). Aquatic Toxicol. 86:157-165.
  16. HEATH, J.S.; KOBLIS, K.; SAGER, S.; DAY, C. 1993. Risk assessment for total petroleum hydrocarbons. In: Irwin, R.J.; VanMouwerik, M.; Stevens, L.; Seese, M.D.; Basham, W. (eds). Environmental Contaminants Encyclopedia Fluoranthene Entry. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. (Estados Unidos). Disponible desde internet en: <http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/fluorant.pdf> (con acceso 03/04/2011).
  17. HELLOU, J.; UPSHALL, C.; PAYNE, J.F.; NAIDU, S.; PARANJAPE, M.A. 1993. Total unsaturated compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in mollusks collected from waters around Newfoundland. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24(2):249-257.
  18. IARC. 1983. Polynuclear Aromatic Compounds: Part 1, Chemical, environmental and experimental data. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO. Vol. 32. p.95-431, (Francia). Last updated: 17 April 1998.
  19. INCODER. 2007. Sistema de información sectorial pesquero. En: Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. (A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte eds.). Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma (Italia), FAO. p.115-128.
  20. IRWIN, R.J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M.D.; BASHAM, W. 1997a. Environmental Contaminants Encyclopedia Fluoranthene Entry. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. (Estados Unidos). Disponible desde Internet en: <http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/fluorant.pdf> (con acceso 07/05/2011).
  21. IRWIN, R.J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M.D.; BASHAM, W. 1997b. Environmental Contaminants Encyclopedia Naphthalene Entry. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. (Estados Unidos). Disponible desde internet en: <http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/naphthal.pdf> (con acceso 07/05/2011).
  22. KRISHNAKUMAR, P.K.; CASILLAS, E.; VARANASI, U. 1994. Effects of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 106:249-261.
  23. KRISHNAKUMAR, P.K.; CASILLAS, E.; VARANASI, U. 1997. Cytochemical reponses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAH or PCBs. Comp. Biochem. Physiol. 118:11-18.
  24. LANDRUM, P.F.; GEDEON, M.L.; BURTON, G.A.; GREENBERG, M.S.; ROWLAND, C.D. 2002. Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42:292-302.
  25. LIU, Y.; CHEN, L.; HUANG, Q.H.; LI, W.Y.; TANG, Y.J.; ZHAO, J.F. 2009. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in surface sediments of the Huangpu River, Shangai, China. Sci. Total Environm. 407:2931-2938.
  26. LORS, C.; PERIE, F.; GRAND, C.; DAMIDOT, D.

2009. Benefits of ecotoxicological bioassays in the evaluation of a field biotreatment of PAHs polluted soil. *Global NEST J.* 11(3):251-259.
27. MARRUGO, A.J. 1993. Estudio de la contaminación marina por hidrocarburos en el Pacífico Colombiano – Fase III. *Bol. Cient. CCCP (Colombia).* 4:47-60.
28. OKAY, O.S.; DONKIN, P.; PETERS, L.D.; LIVINGSTONE, D.R. 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*, *Environ. Pollut.* 110:103-113.
29. PANE, L.; BOCCARDO, S.; BONFIGLIOLI, F.; MARIOTTINI, G.L.; PRIANO, F.; CONIO, O. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, seston and copepods in a harbour area in the Western Mediterranean (Ligurian Sea). *Mar. Ecol.* 26:89-99.
30. PEÑA, A.; MORALES, J.; LABASTIDA, A.; CAPELLA, S. 2003. Extracción en Fase Sólida como una Alternativa para el Procedimiento de Limpieza en la Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por Cromatografía de Gases. *Rev. Int. Contam. Ambient. (México).* 19(1):13-23.
31. PRAHL, H. von; CANTERA, J.R.; CONTRERAS, R. 1990. Manglares y hombres del Pacífico colombiano. Fondo FEN. Bogotá (Colombia). 193p.
32. PREUSS, R.; ANGERER, J.; DREXLER, H. 2003. Naphthalene an environmental and occupational toxicant. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 76(8):556-576.
33. REY-SALGUEIRO, L.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GARCÍA-FALCÓN, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. 2009. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources. *Food. Res. Int.* 42:983-988.
34. RILEY, R.T.; MIX, M.C.; SCHAFFER, R.L.; BUNTING, D.L. 1981. Uptake and accumulation of naphthalene by the oyster *Ostrea edulis*, in a flow-through system. *Mar. Biol.* 61(4):267-276.
35. RUSSELL, M.L.; GOTH-GOLDSTEIN, R.; APTE, M.G.; FISK, W.J. 2002. Analytical Method for the determination of Individual (N-alkanes and Isoprenoids) and Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Biomarker Triterpanes and Steranes in Oil and Oil-spill-related. Environmental Samples (Water, Particulates and Soils/Sediment): Berkeley (CA): Lawrence Berkeley National Laboratory, Environmental Energy Technologies Division; 2002 Jan. Report No.: LBNL49574. Contract No.: DEAC0376SF00098. Sponsored by the Department of Energy. Ottawa. ON, K1A 0H3.
36. SERICANO, J.L.; WADE, T.L.; JACKSON, T.J.; BROOKS, J. M.; TRIPP, B.W.; FARRINGTON, J.W.; MEE, L.D.; READMAN, J.W.; VILLENEUVE, J.P.; GOLDBERGS, E.D. 1995. Trace organic contamination in the Americas: An Overview of the US National Status & Trends and the International "Mussel Watch" Programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 31(4-12):214-225.
37. SILVA BENAVIDES, A.M.; BONILLA CARRIÓN, R. 2001. Abundancia y morfometría de *Anadara tuberculosa* y *A. similis* (Mollusca: Bivalvia) en el Manglar de Purruja, Golfo Dulce, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop. (Costa Rica).* 49(2):315-320.
38. VAGI, M.C.; KOSTOPOULOU, M.N.; PETSAS, A.S.; LALOÛSI, M.E.; RASOULI, C.H.; LEKKAS, T.D. 2005. Toxicity of organophosphorous pesticides to the marine alga *Tetraselmis suecica*. *Global NEST J.* 7(2):222-227.
39. VELÁSQUEZ, O.; CORTES, L.M. 1997. Estudio y evaluación de metales traza (Pb, Cr, Cu, Cd y Hg) en aguas, sedimentos y organismos marinos de la bahía de Buenaventura. *Bol. Cient. CCCP (Colombia).* 6:57-61.
40. VIJAYAVEL, K.; GOMATHI, R.D.; DURGABHAVANI, K.; BALASÚBRAMANIAN, M.P. 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. *Mar. Pollut. Bull.* 48:429-433.
41. ZAGHDEN, H.; KALLEL, M.; ELLEUCH, B.; OUDOT, J.; SALIOT, A. 2007. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia. Mediterranean Sea, *Mar. Chem.* 105(1-2):70-89.

Recibido: Octubre 11 de 2011

Aceptado: Junio 15 de 2012

# CINÉTICA DE BIOACUMULACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN *Anadara similis* (ADAMS, 1852) Y *Anadara tuberculosa* (SOWERBY, 1833) (ARCOIDA: ARCIDAE)

## KINETICS OF BIOACCUMULATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN *Anadara similis* (ADAMS, 1852) AND *Anadara tuberculosa* (SOWERBY, 1833) (ARCOIDA: ARCIDAE)

Mónica Zambrano<sup>1\*</sup>, Robinson Casanova<sup>2\*</sup>, Gustavo Arencibia<sup>3</sup>, Alexis Vidal<sup>4</sup>, Norberto Capetillo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones Marinas CIM. Universidad de la Habana. La Habana. Cuba. monyazambrano@yahoo.com; <sup>2</sup>Magister Gestión e Ingeniería Ambiental. Jefe Laboratorio de Química. \*Grupo de Protección del Medio Marino. Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico Cccp, Tumaco Colombia. rcasanova@dimar.mil.co; <sup>3</sup>Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos. Centro de Investigaciones Pesqueras CIP. La Habana, Cuba. garen04@gmail.com; <sup>4</sup>Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Profesor Titular. Grupo de Farmacología-Toxicología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. alexis.vidal@infomed.sld.cu; <sup>5</sup>Magister en Biología Marina y Acuicultura. Estudiante Doctorado Ciencias Marinas, Depto de Pesquería y Biología Marina, La Paz, Baja California Sur, México, norbertcap@yahoo.com

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 291 - 302, 2012

### RESUMEN

Se determinó la bioacumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en las los moluscos bivalvos *Anadara similis* y *A. tuberculosa*, siendo esta última especie empleada como organismo biomonitor, en el Pacífico colombiano. Un total de 120 organismos de cada especie fueron expuestos a una mezcla de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios, por la Environmental Protection Agency (US EPA), suministrados a concentraciones establecidas a partir de niveles considerados seguros para la vida acuática. Los organismos fueron expuestos a una concentración de 15,48ng/mL de la mezcla de HAP, por un periodo de 45 días, para *A. tuberculosa* y 30, para *A. similis*; la prueba con esta última especie tuvo menor duración, debido a la mortalidad registrada durante el ensayo, la cual, se asocia con la duración del periodo de aclimatación, que abarcó 10 días. Los máximos niveles de acumulación registrados en *A. tuberculosa* ( $48,00 \times 10^2$  ng/g) y *A. similis* ( $75,00 \times 10^2$  ng/g), se presentaron luego de 30 y 25 días de exposición, respectivamente, evidenciándose una mayor capacidad de bioacumulación por parte de *A. similis* y, por ende, un alto potencial de la misma, como organismo biomonitor de las condiciones ambientales.

Palabras clave: Bioacumulación, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), Bivalvos.

### SUMMARY

The bioaccumulation of aromatic polycyclic hydrocarbons (PAH`s) in the bivalve mollusk *Anadara similis* and *A. tuberculosa*, was determined, being the latter species used as bio-monitor organism in the Colombian Pacific. A total of 120 organisms of each species were exposed to a mixture of 16 APH considered priority pollutants to the Environmental Protection Agency (US EPA), supplied to established concentrations from levels considered safety to the aquatic life. The organisms were exposed to concentrations of 15.48ng/mL of PAH's mixture for a period of 45 days to *A. tuberculosa* and 30 days to *A. similis*, the test with the latter species had less duration due to the mortality registered during the test, associated with the acclimatization period that included 10 days. The highest accumulation levels registered in *A. tuberculosa* ( $48.00 \times 10^2$  ng/g) and *A. similis* ( $75.00 \times 10^2$  ng/g) were detected, respectively, after 30 and 25 days of exhibition, demonstrating a major bioaccumulation

capacity of *A. similis* and for therefore a high potential of this organism as bio-monitor of the environmental conditions.

Key words: Bioaccumulation, Aromatic Polycyclic Hydrocarbons (HAP), Bivalves.

## INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son constituyentes naturales del petróleo crudo y conforman una fracción de hasta el 20% del total de hidrocarburos, siendo, a la vez, el grupo potencialmente más tóxico (Eisler, 2000). Se conocen aproximadamente 100HAP en el aire, en el suelo, en los alimentos y en el agua (Zedeck, 1980); sin embargo, solo 16 son considerados de interés en función de sus aplicaciones industriales y como contaminantes ambientales tóxicos, por la EPA (Achten & Hofmann, 2009; Rey-Salgueiro *et al.* 2009), la ATSDR (2011) y la IARC (1983), fundamentalmente, por sus efectos mutagénicos y cancerígenos (Potin *et al.* 2004). Estos compuestos, se encuentran entre los más comunes contaminantes orgánicos persistentes en ambientes acuáticos (Nesto *et al.* 2010), que causan efectos biológicos a largo plazo y su toxicidad sobre organismos acuáticos, se incrementa con la exposición a la radiación solar y por la por fotoactivación de las moléculas (Pelletier *et al.* 2006; Bellas *et al.* 2008; Okay & Karacik, 2008).

Para realizar estudios de seguimiento a este tipo de contaminantes en ambientes acuáticos se ha recurrido al uso de bivalvos, como organismos biomonitores (Page *et al.* 2005; Chęć *et al.* 2008), considerando al mejillón entre los mejores centinelas en el seguimiento de la contaminación marina, por ser organismos sedentarios, filtradores y por poseer una limitada capacidad de metabolización (Soriano-Sanz *et al.* 2006); sin embargo, en el Pacífico colombiano su presencia es escasa, situación que generó la necesidad de seleccionar una especie representativa de la zona.

En Colombia, las especies de moluscos bivalvos *Anadara similis* y *A. tuberculosa*, conocidas comúnmente como Piangua, son ampliamente explotadas y cuentan con una alta demanda en el mercado, por ende, son de gran interés comercial, llegando a constituir el 96% de la producción total de bivalvos del país (INCODER, 2007). Ambas especies habitan en el ecosistema de manglar, en especial, entre las raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle*), siendo *A. tuberculosa* más abundante, razón por la que sobre la misma, se realiza un importante esfuerzo de captura, que la ha llevado a ser catalogada como especie vulnerable (Ardila *et al.* 2002). Si bien *A. similis* no se encuentra catalogada dentro de este grupo es extraída de manera simultánea durante las faenas de recolección y teniendo en cuenta su

menor abundancia es muy factible que se encuentre bajo las mismas condiciones de vulnerabilidad.

Debido a la importancia comercial con que cuentan ambas especies y, en particular *A. tuberculosa*, su amplia distribución en el Pacífico colombiano y su condición de organismo sésil y filtrador, ha sido utilizada para predecir exposición, efectos y susceptibilidad ante la presencia de sustancias antropogénicas (Sericano *et al.* 1995); en Colombia (Marrugo, 1993; Casanova, 1995; Calero & Zambrano, 1997; Velásquez López & Cortes, 1997) y en diversos países de la región (De la Cruz, 1994; Lauenstein, 1995; Sericano *et al.* 1995; Beliaeff *et al.* 1997; Herrero *et al.* 1999).

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio, se evaluó la capacidad de bioacumulación de ambas especies al ser expuestas a una mezcla de 16 HAP, comparando las respuestas presentadas entre ellas, bajo las mismas condiciones experimentales. Así mismo, se realizó un seguimiento al comportamiento de incorporación y de depuración de los compuestos, lo que permitirá, adicionalmente, determinar periodos de cuarentena, en caso de eventos de contaminación asociados a hidrocarburos, tendientes a proteger la salud de los consumidores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los organismos de ensayo, se recolectaron en la Bahía de Tumaco, en el Pacífico colombiano, cuyas coordenadas corresponden a los 1°53'10" N y 78°39'50" W (Figura 1) y fueron adquiridos a través de pescadores artesanales, trasladados al laboratorio del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – CCCP, en donde fueron sometidos a un periodo de aclimatación en tanques de 250L.

La duración de este periodo abarcó 10 días, con el fin que los organismos no solamente se adaptaran a las condiciones de laboratorio, sino que también depuraran los niveles de compuestos de alto peso molecular (PM), que pudieran haber acumulado en el medio antes de la captura, pues estos compuestos tienen una mayor persistencia con respecto a los de bajo y medio PM. Este periodo, se determinó teniendo como referencia el hecho que los bivalvos marinos utilizados en pruebas similares requieren de dos días de depuración (APHA, AWWA, WEF, 2005).

El agua marina usada para el desarrollo de los experimentos fue tomada de un área alejada a las instalaciones del CCCP (Figura 1), durante los periodos de marea alta, empleando una motobomba que la impulsaba hacia unos tanques de almacenamiento, pasando, posteriormente, a través de un filtro para su uso en las pruebas.

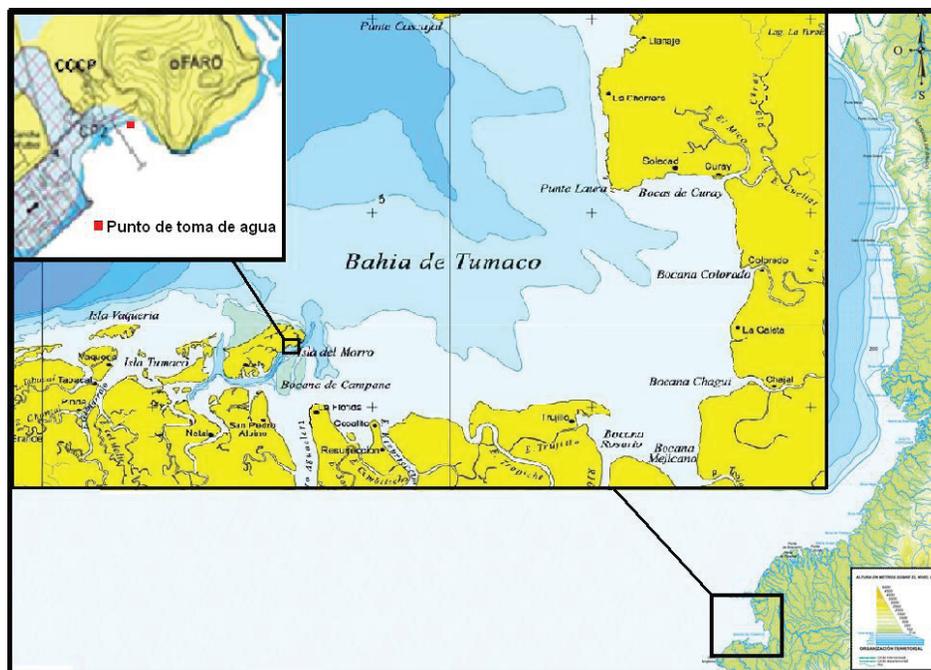


Figura 1. Bahía de Tumaco.

Las pruebas realizadas fueron de tipo semiestático, con recambios del 100% del volumen de agua (20L), cada 24 horas, en todos los recipientes: los dos tipos de control (agua marina filtrada y con adición de acetona) y, en los recipientes de ensayo, con la solución. No se realizó suministro de aireación durante las pruebas, por lo que el agua de recambio se sometía previamente a varias horas de aireación, con el fin de saturar de oxígeno disuelto (OD).

Los controles empleados consistían en mantener un grupo de organismos en los recipientes de ensayo en agua marina, pero sin adición de la solución (mezcla de HAP), por lo que se tenía un control con solo agua de disolución (agua marina filtrada) y otro al que adicionalmente se añadía el solvente (acetona), con un volumen igual al empleado en la adición del compuesto (15mL); en ambos casos, se trabajaron por triplicado.

Como recipientes de ensayo, se utilizaron acuarios de vidrio aforados a 20,0L y, en cada uno de ellos, se expusieron un total de 10 organismos. La prueba consistió en exponer 120 organismos de cada especie (*A. similis* y *A. tuberculosis*) a una mezcla de los 16 HAP, alcanzando una concentración de 15,48ng/mL en los recipientes de ensayo. Culminado el periodo de aclimatación, se tomó una muestra de 10 organismos, para determinar los niveles de los compuestos a evaluar que pudieran presentar los organismos.

Las concentraciones establecidas para cada compuesto en la mezcla equivalen a los niveles guía de calidad del

Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME, 2010), los cuales, no representan riesgo para la vida acuática (estos niveles solamente se encuentran estipulados para ecosistemas dulceacuícolas). Para los compuestos que no cuentan con un nivel de referencia, se estableció una concentración inferior a la estipulada para el antraceno, que cuenta con la mayor restricción entre los compuestos que pertenecen a este grupo dentro de la guía.

La mezcla de HAP requirió la preparación de tres soluciones patrón (de acuerdo a la similitud en la concentración requerida para cada compuesto), empleando acetona como solvente, que fueron adicionadas en diferentes alícuotas, con el fin de obtener las concentraciones estipuladas para adelantar la prueba, obteniendo una concentración final de 15,48 ng/mL (de los 16 analitos), requerida en los recipientes de ensayo. La composición de la mezcla al igual que las características fisicoquímicas de cada compuesto, se presenta en la tabla 1.

Diariamente, se registraron parámetros fisicoquímicos, tales como: salinidad, pH, temperatura y OD, empleando un multiparámetros WTW Multi 340i. Así mismo, se proporcionó alimento a los organismos, suministrando 1,0L de diatomeas (con una densidad promedio de  $3 \times 10^6$  células/mL) en cada recipiente de ensayo, tras realizar el recambio. Las diatomeas, se cultivaron en el laboratorio, a partir de células obtenidas tras filtrar agua marina en la zona de la que se abastecía el laboratorio.

Tabla 1. Composición de la mezcla de HAP utilizada en las pruebas de toxicidad (ng/g) y características fisicoquímicas de los compuestos de ensayo.

Compuesto	Concentración de ensayo (ng/mL)	Directrices* (ng/mL)wz	PM g/mol	PF °C	S a 25°C mg/L	LogK <sub>ow</sub>	H	D cm <sup>2</sup> /s	PE °C	VM Cm <sup>3</sup> /mol	F a 25°C	P <sup>s</sup> a 25°C (mPa)
Naftaleno	1,1	1,1	128,16	80,5	31,7	3,5	43,01	7,5x10 <sup>-6</sup>	218	148	0,2830	11960
Acenafileno	5,0		152,20	95	3,93	4,0		7,5x10 <sup>-6</sup>	270			0,89
Acenafeno	5,8	5,8	154,21	95	3,93	4,33	12,17	7,6 x10 <sup>-6</sup>	277	173	0,1980	594
Fluoreno	3,0	3,0	166,00	116,5	1,98	4,18	7,87	7,8x10 <sup>-6</sup>	295	188	0,1260	94,7
Fenantreno	0,4	0,4	178,24	101	1,29	4,5	3,24	7,4x10 <sup>-6</sup>	339	199	0,1770	90,7
Antraceno	1,2 x 10 <sup>-2</sup>	0,012	178,24	216	0,045	4,5	3,96	7,7x10 <sup>-6</sup>	340	197	0,0129	25
Fluoranteno	0,4 x 10 <sup>-1</sup>	0,04	202,26	111	0,26	5,1	1,03	6,3x10 <sup>-6</sup>	375	217	0,1410	1328
Pireno	2,5 x 10 <sup>-2</sup>	0,025	202,26	156	0,135	4,9	0,92	7,2x10 <sup>-6</sup>	360	214	0,0506	91,3 x 10 <sup>6</sup>
Benzo[a]antraceno	1,8 x 10 <sup>-2</sup>	0,018	228,00	162	0,0057	5,6	0,58	9x10 <sup>-6</sup>	435	248	0,0462	14,7x10 <sup>-3</sup>
Criseno	2,5 x 10 <sup>-2</sup>		228,30	255	0,0018	1,64	5,86	6,2x10 <sup>-6</sup>	448	179	0,0053	
Benzo[k]fluoranteno	0,1 x 10 <sup>-1</sup>		252,32	217	0,0043	6,06	0,016	5,5x10 <sup>-6</sup>	481	268	0,0126	2,8x10 <sup>-9</sup>
Benzo[a]pireno	1,5 x 10 <sup>-2</sup>	0,015	252,32	179	0,0038	6,0	0,046	9,0x10 <sup>-6</sup>	495	263	0,0328	0,37x10 <sup>-6</sup>
Benzo[b]fluoranteno	0,1 x 10 <sup>-1</sup>		252,32	168	0,014	6,06		5,5x10 <sup>-6</sup>	481	268	0,0385	13x10 <sup>3</sup> -0,133 a20°C
Indeno [1,2,3-cd]pireno	0,5 x 10 <sup>-2</sup>		276,00	164	5,3x10 <sup>-4</sup>	6,40		4,4x10 <sup>-6</sup>				1,3x10 <sup>-5</sup>
Benzo[ghi]perileno	0,1 x 10 <sup>-1</sup>		276,34	277	2,6x10 <sup>-4</sup>	6,50	0,075	5,6x10 <sup>-6</sup>	525	277	0,0032	
Dibenzo[ah]antraceno	0,1 x 10 <sup>-1</sup>		278,36	270	0,0006	6,75		5,2x10 <sup>-6</sup>	524	300	0,0040	

Fuente: \*Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2010. Peña et al. 2003.

PM: Peso molecular; PF: Punto de fusión; PE: Punto de ebullición; V<sup>m</sup>: Volumen molar; F: Proporción de fugacidad; P<sup>s</sup>: Presión de vapor; S: Solubilidad; LogK<sub>ow</sub>: Coeficiente de partición octanol/agua; Hi: Constante de la ley de Henry; D: Coeficiente de difusión en agua.

La duración de los ensayos, se determinó teniendo en cuenta que para pruebas de bioacumulación en campo, la exposición abarca 30 días o más para evaluar concentraciones de contaminantes en tejidos; si los compuestos son debajo PM, este periodo puede ser inferior, pero para compuestos orgánicos de alto PM, se puede prolongar la prueba a 60 o 90 días (APHA, AWWA, WEF, 2005).

La talla media de los organismos de ensayo fue de 4,88cm de longitud total (LT), para *A. tuberculosa* y, de 4,48cm, para *A. similis*. La determinación de los niveles de HAP incorporados, se realizó con periodicidad de cinco días, tomando 10 organismos como muestra, extrayendo el tejido de los mismos y homogenizándolo, para realizar el análisis respectivo (a partir de  $\pm 10$ g de muestra).

La determinación de los HAP, se realizó por cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), siguiendo las metodologías descritas por Russell *et al.* (2002), utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD – 7683B Series); bajo el método de monitoreo de ion selectivo (SIM), empleando estándares de marca Supelco, de alta pureza analítica, para su determinación y su cuantificación.

Con el propósito de evaluar el desempeño analítico del método, se participó regularmente en pruebas interlaboratorio, con el Laboratorio Ambiental Marino (MEL) de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), obteniendo resultados satisfactorios.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros fisicoquímicos presentaron valores entre los 23,30 y 25,70°C, para la temperatura; de 7,91 a 8,24, para el pH; entre 29,30 y 30,00 psu, para la salinidad y entre 3,25 y 7,80mg O<sub>2</sub>/L, para OD. Estos niveles son adecuados para la supervivencia de ambas especies, teniendo en cuenta que habitan en zonas fangosas en las que se presentan cambios bruscos en los diferentes parámetros fisicoquímicos, causados por los cambios mareales (Prahl *et al.* 1990).

Durante el periodo de aclimatación no se registró mortalidad y, al término de este lapso, la concentración de los HAP totales presentó niveles de 143,50ng/g, en organismos de la especie *A. tuberculosa* (Tabla 2) y de 22,00ng/g, en *A. similis* (Tabla 3).

A lo largo de la prueba ninguna de las dos especies presentó incorporación de naftaleno ni de fluoranteno; esto obedece a que el naftaleno es el compuesto de menor PM entre los HAP y la tendencia en este grupo de compuestos es que se incrementa la volatilidad al disminuir el PM (CCME, 2010), lo que hace del naftaleno el compuesto con mayor volatilidad entre los HAP. Adicionalmente, la no incorporación de estos compuestos, también se puede relacionar con la baja concentración suministrada durante la prueba.

Este comportamiento es similar al registrado por algunos compuestos en mejillones expuestos a la fracción acomodada del crudo del Prestige, en el que se presentó una

Tabla 2. Concentración de HAP en *Anadara tuberculosa* durante la prueba de bioacumulación (ng/g - peso seco).

Tiempo (días) Compuesto	CONCENTRACIÓN									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Antraceno	20,0	102,0	220,0	114,0	193,0	112,0	294,0	155,0	190,0	195,0
Pireno	25,0	67,0	185,0	90,0	130,0	100,0	165,0	90,0	150,0	100,0
Benzo[k]fluoranteno	1,6	57,0	110,0	114,0	163,0	122,0	172,0	226,0	100,0	130,0
Benzo[ghi]perileno	1,7	40,0	140,0	120,0	118,0	110,0	216,0	155,0	110,0	130,0
Benzo[a]pireno	4,7	32,0	85,0	69,0	130,0	75,0	153,0	142,0	75,0	950,0
Benzo[b]fluoranteno	4,3	47,0	110,0	109,0	147,0	118,0	170,0	240,0	110,0	140,0
Benzo[a]antraceno	1,7	54,0	100,0	87,0	160,0	100,0	148,0	175,0	98,0	120,0
Indeno[1,2,3-cd]pireno	19,0	65,0	100,0	205,0	250,0	173,0	308,0	346,0	145,0	224,0
Dibenzo[ah]antraceno	11,0	40,0	137,0	107,0	110,0	96,0	220,0	168,0	113,0	140,0
Fluoranteno	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
Criseno	0,5	102,0	140,0	161,0	270,0	173,0	250,0	332,0	150,0	210,0
Naftaleno	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
Acenaftileno	15,0	313,0	200,0	564,0	590,0	364,0	370,0	540,0	530,0	610,0
Acenafteno	13,0	757,0	347,0	1236,0	1210,0	838,0	790,0	1156,0	1070,0	1290,0
Fluoreno	14,0	440,0	480,0	575,0	630,0	506,0	704,0	637,0	610,0	730,0
Fenantreno	12,0	320,0	510,0	360,0	410,0	350,0	600,0	440,0	420,0	520,0
Sumatoria HAP	143,5	2436,0	2864,0	3911,0	4511,0	3237,0	4560,0	4802,0	3871,0	5489,0

< L.D: Menor al límite de detección.

Tabla 3. Concentración de HAP en *Anadara similis* durante la prueba de bioacumulación (ng/g - peso seco).

Tiempo (días) Compuesto	CONCENTRACIÓN						
	0	5	10	15	20	25	30
Antraceno	0,7	114,0	114,0	145,0	280,0	375,0	194,0
Pireno	8,7	50,0	180,0	204,0	166,0	340,0	220,0
Benzo[k]fluoranteno	< L.D	130,0	93,0	122,0	40,0	120,0	166,0
Benzo[ghi]perileno	< L.D	84,0	55,0	64,0	90,0	80,0	100,0
Benzo[a]pireno	< L.D	68,0	46,0	56,0	27,0	94,0	90,0
Benzo[b]fluoranteno	< L.D	95,0	96,0	120,0	56,0	140,0	193,0
Benzo[a]antraceno	< L.D	84,0	104,0	120,0	80,0	214,0	206,0
Indeno[1,2,3-cd]pireno	< L.D	107,0	83,0	115,0	36,0	136,0	147,0
Dibenzo[ah]antraceno	< L.D	83,0	60,0	77,0	24,0	96,0	96,0
Fluoranteno	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
Criseno	5,0	160,0	222,0	315,0	176,0	410,0	460,0
Naftaleno	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D	< L.D
Acenaftileno	3,4	135,0	40,0	814,0	1040,0	1100,0	645,0
Acenafteno	< L.D	504,0	153,0	1930,0	2247,0	2320,0	1550,0
Fluoreno	4,4	536,0	425,0	880,0	1144,0	1150,0	840,0
Fenantreno	< L.D	600,0	678,0	702,0	865,0	930,0	670,0
Sumatoria HAP	22,0	2750,0	2380,0	5664,0	6270,0	7505,0	5580,0

< L.D: Menor al límite de detección.

baja bioacumulación de HAP, que podría estar relacionada con la presencia de compuestos de bajo PM, los que pueden ser rápidamente liberados a la atmósfera y, por lo tanto, no son disponibles para los organismos acuáticos (Solé *et al.* 2007)

Los compuestos restantes fueron incorporados por los organismos en mayor proporción para aquellos de alto PM, teniendo en cuenta los niveles determinados frente a las concentraciones suministradas. A este comportamiento, se suma una baja variabilidad a lo largo del periodo de exposición; mientras que los compuestos de menor PM presentaron un comportamiento inverso, situación derivada de la mayor disponibilidad y menor persistencia que les caracteriza.

Los máximos niveles de HAP en los organismos, se registraron luego de 25 días de exposición, en *A. similis*, alcanzando una concentración de  $75,05 \times 10^2$  ng/g (Tabla 3), frente a  $45,60 \times 10^2$  ng/g, para el mismo periodo de tiempo, en *A. tuberculosa*, cuya máxima concentración se registró luego de 35 días de prueba, con  $48,00 \times 10^2$  ng/g (Tabla 2), lo que indica que la velocidad y la capacidad de incorporación de estos compuestos, por parte de la primera especie, es mucho mayor.

En cuanto a los niveles de HAP incorporados por los organismos, estos fueron mayores para el acenafteno y fluoreno, en ambas especies, siguiéndole en concentración el fenantreno y el acenaftileno, en *A. similis* y, ambos compuestos, de manera invertida, en *A. tuberculosa*, como se puede observar en las figuras 2 y 3. Los compuestos de bajo PM presentaron oscilaciones importantes durante las pruebas y una mayor incorporación con respecto a los de alto PM.

Este comportamiento es similar al presentado por el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, al exponerse bajo condiciones de laboratorio, a concentraciones de HAP, pues en esta especie se registró una mayor acumulación de compuestos de bajo PM (Baussant *et al.* 2001a,b; Neff, 2002; Meador, 2003). Así mismo, se encontró que la depuración de los compuestos de menor PM y mayor solubilidad en agua, como el naftaleno, fue mucho más rápida (Baussant *et al.* 2001a,b).

El benzo[a]pireno registró la menor concentración acumulada por ambas especies, mientras que los compuestos restantes no presentaron un patrón o relación en cuanto a acumulación comparable entre ellas; sin embargo, se observó un comportamiento bastante similar entre los compuestos de alto PM, en ambas especies.

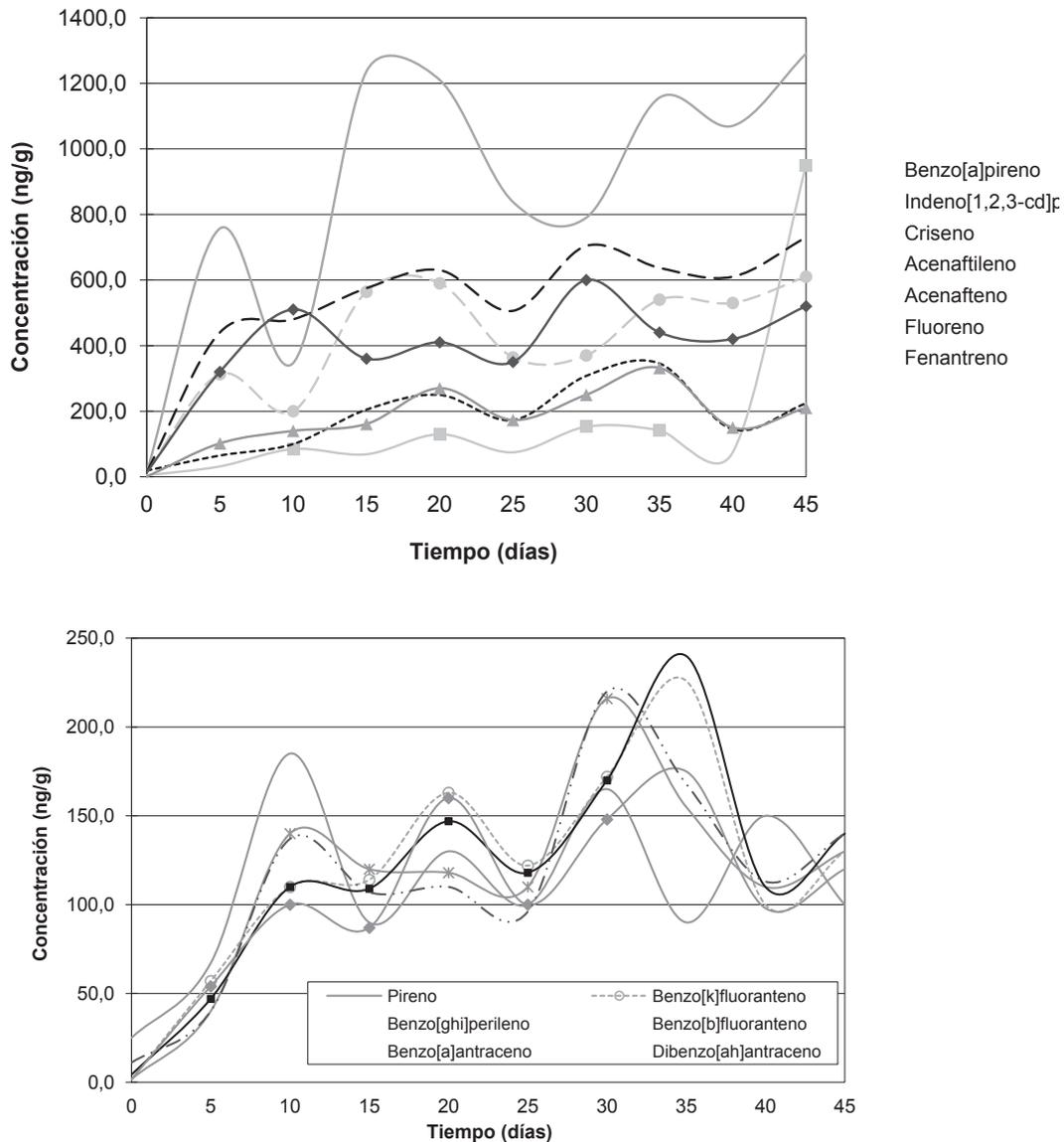


Figura 2. Comportamiento de HAP en *Anadara tuberculosa* durante la prueba de bioacumulación.

El reglamento de la Comisión Europea CE (2011) establece que el contenido máximo de HAP en moluscos bivalvos (frescos, refrigerados o congelados) se ha estimado en 5,0ng/g, para el benzo[a]pireno; sin embargo, como es posible que el mismo no se encuentre acumulado por los organismos, se ha planteado una concentración de 30ng/g para la suma de benzo[a]pireno benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno y criseno, con el fin de emplear estos cuatro compuestos como un marcador o indicador de toxicidad, para los HAP.

Teniendo en cuenta este reglamento, las concentraciones de HAP determinadas para los organismos de ensayo (Tablas 2

y 3), evidencian que los mismos solamente se encontraban aptos para el consumo humano antes de dar inicio a las pruebas (tras varios días, bajo condiciones de aclimatación), pues luego de ser expuestos a la mezcla de HAP, tanto el nivel de benzo[a]pireno como el de la sumatoria de compuestos relacionados como indicadores, superaron el contenido máximo estipulado.

Las concentraciones de HAP en los organismos presentaron variaciones a lo largo de las pruebas, comportamiento usual ante la exposición a contaminantes en el medio, ya que los organismos no solo incorporan los contaminantes, sino que, a la vez, pueden realizar excreción de los mismos,

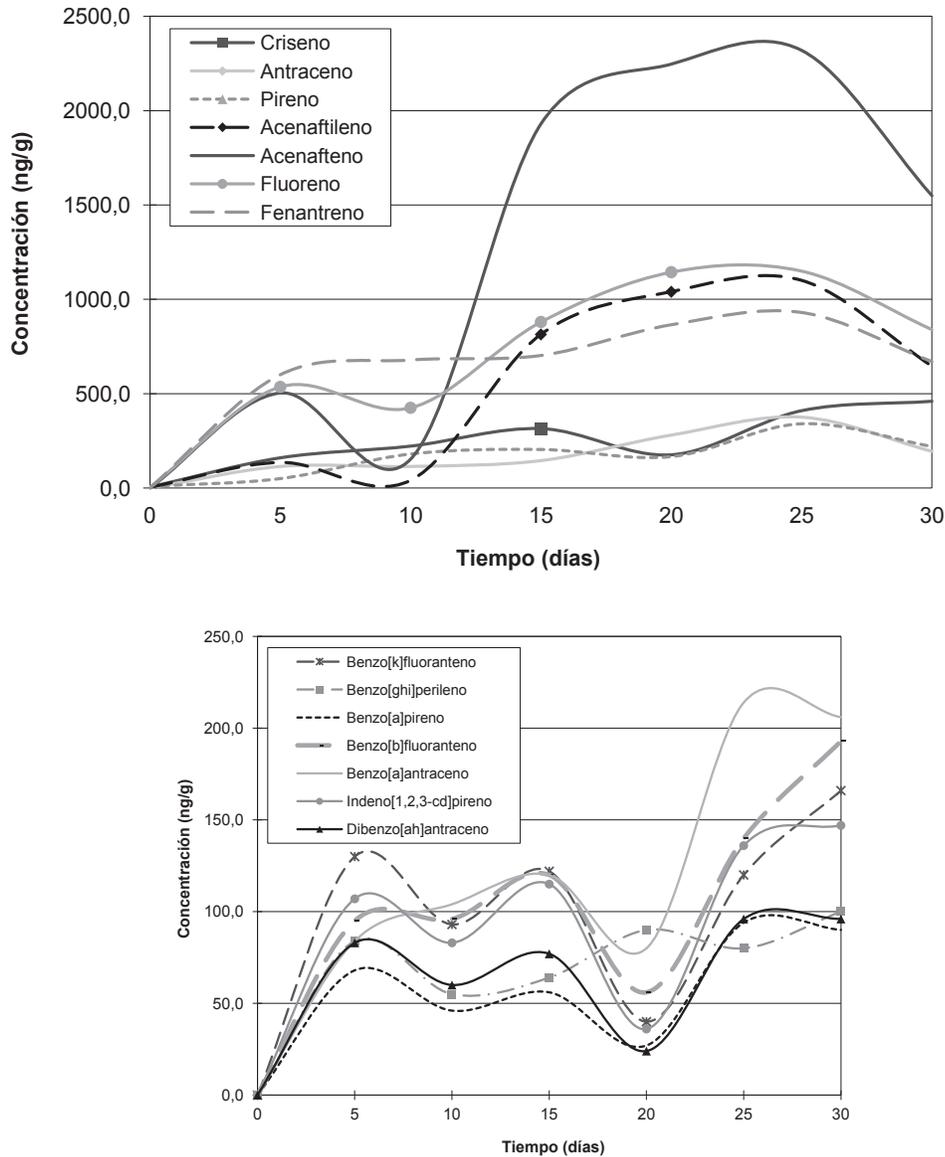


Figura 3. Comportamiento de HAP en *Anadara similis* durante la prueba de bioacumulación.

aumentando y disminuyendo las concentraciones en sus tejidos, aún en presencia de los compuestos en el medio (Calero & Zambrano, 1997; CSIC, 2003; Prada-Ríos & Zambrano-Ortiz, 2006).

Estos procesos de incorporación y de depuración han sido reportados en organismos presentes en el ambiente natural, tras evaluaciones en zonas afectadas por el ingreso de petróleo al medio marino, presentando, inicialmente, un proceso rápido de incorporación y, luego, los compuestos son excretados y disminuyen o se eliminan totalmente, cuando la contaminación en el medio desciende o desaparece (CSIC, 2003).

Lo que define la mayor o menor capacidad de bioacumulación de un compuesto es el tamaño de la molécula, que al aumentar el PM genera un incremento en la persistencia, en la toxicidad y en el carácter lipofílico, siendo los organismos acuáticos altamente afectados por estas características de los HAP (Antón & Lizaso, 2003).

Ambas especies registraron mortalidad a lo largo de la prueba, alcanzando un 43,50%, en *A. tuberculosa* (entre los días dos y 29) y, un 48,50%, en *A. similis* (del día dos al 21, con un alto porcentaje entre los días dos y 12). En los recipientes de control, *A. tuberculosa* alcanzó una mortalidad del 33,33% (entre los días 13 y 33) y, de un 53,33%, en

*A. similis* (entre los días siete y 18), en el control. En los recipientes a los que se adicionó acetona, se registró una mortalidad correspondiente al 56,66%, para *A. tuberculosa* (en los días 16 y 22) y, del 66,66%, *A. similis* (entre los días cinco y 13).

Esta tasa de mortalidad, se puede relacionar con una alta sensibilidad de los organismos expuestos, pues no solo se presentó en los recipientes que contenían la mezcla de HAP, sino también en los dos tipos de recipientes de control. Sin embargo, debido a que durante el periodo de aclimatación (10 días) la sobrevivencia fue total, es claro que los organismos se encontraban en óptimas condiciones al inicio del ensayo.

Por otra parte, el que se registrara mortalidad en los organismos de ambos tipos de control (agua de disolución y agua-acetona) descarta la posibilidad que la misma se asociara exclusivamente con la exposición al solvente o a la mezcla suministrada. Esta mortalidad, evidencia la presencia de un factor adicional a la mezcla de HAP suministrada, que ejerció una influencia negativa sobre los organismos, probablemente, asociado con el periodo previo de aclimatación, pues pruebas de bioacumulación en las que *A. tuberculosa* se expuso a concentraciones de HAP, de manera individual o en mezcla bajo condiciones similares a la del presente ensayo, y en las que este periodo no superó los cinco días, no se registró mortalidad en los recipientes de control ni en aquellos en que se expusieron los organismos a la solución de prueba (Calero & Zambrano, 1997; Prada-Ríos & Zambrano-Ortiz, 2006).

El periodo de aclimatación fue mayor al empleado en bioensayos previos, con el fin que los organismos depuraran los niveles de HAP que pudieran haber incorporado del medio antes de su captura.

El cese total de la mortalidad transcurrido en un determinado periodo de tiempo evidencia una respuesta de adaptación por parte de los organismos, tras una mayor sensibilidad inicial que, sin duda, fue acentuada por la presencia de la mezcla tóxica en el medio. Esta "adaptabilidad", se puede comparar con las respuestas presentadas por los organismos en el medio natural, después del ingreso de compuestos tóxicos que, en principio, genera una alta mortalidad, la cual, disminuye paulatinamente.

Los altos niveles de HAP incorporados por los organismos, no solo ratifican la importancia de las especies de bivalvos en los estudios de evaluación de contaminantes, sino que, a la vez, evidencian el alto riesgo que representa para la salud de los consumidores de estos productos, situación que se potencializa cuando los mismos provienen de áreas contaminadas.

La alta capacidad de bioacumulación, especialmente, presentada por parte de *A. similis* frente a *A. tuberculosa*, evidencia un mayor potencial de la misma como especie biomonitora; así mismo, el mayor porcentaje de mortalidad registrado por esta especie puede estar influenciado por los altos niveles de contaminantes incorporados en cortos periodos de tiempo y, a la vez, sugiere una mayor sensibilidad de la especie ante condiciones adversas.

Estas características no solo ratifican la importancia y el potencial de ambas especies como organismos biomonitores, sino que resultan muy importantes, si se tiene en cuenta que se ha determinado que especies de bivalvos, como *Mya arenaria*, tras acumular concentraciones elevadas de HAP, necesitan varias semanas en tanques de depuración para reducirlos a niveles insignificantes (Lee *et al.* 2010), lo que, sin duda, evidencia la necesidad de realizar seguimientos a las concentraciones de estos compuestos en las especies estudiadas, con el fin de evaluar su calidad, teniendo en cuenta la gran demanda para su consumo por parte de las poblaciones, ubicadas en el litoral Pacífico colombiano y en otros países de la región.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Dirección del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – CCCP de la Dirección General Marítima – DIMAR, por la financiación para el desarrollo del presente estudio y al personal del laboratorio de química por su valiosa colaboración en los análisis de las muestras. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Financiación:** Este estudio fue financiado por el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – CCCP.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ACHTEN, C.; HOFMANN, T. 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – a hardly recognized source of environmental contamination. *Sci. Total Environ.* 407:2461-2473.
2. ANTÓN, A.; LIZASO, J. 2003. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid (España). 225 p.
3. APHA, AWWA, WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st ed. American Public Health Association. Washington, DC. (Estados Unidos). Part 8000. 8, p.94-100.

4. ARDILA, N.; NAVAS, G.R.; REYES, J. (Eds.). 2002. Libro rojo de invertebrados marinos de Colombia. INVEMAR. Ministerio de Medio Ambiente. La serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Bogotá (Colombia), p.96-98.
5. ATSDR. 2011. 2007 CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Atlanta, GA, (Estados Unidos). Disponible desde Internet en: [www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html](http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html) (con acceso 26/04/2011).
6. BAUSSANT, T.; SANNI, S.; JONSSON, G.; SKADSHEIM, A.; BORSETH, J.F. 2001a. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (6):1175-1184.
7. BAUSSANT, T.; SANNI, S.; SKADSHEIM, A.; JONSSON, G.; BORSETH, J.F.; GAUDEBERT, B. 2001b. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 2. Modeling bioaccumulation in marine organisms chronically exposed to dispersed oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(6):1185-1195.
8. BELIAEFF, B.; O'CONNOR, T.P.; DASKALAKIS, D.K.; SMITH, P.J. 1997. U.S. Mussel Watch data from 1986-1994: Temporal Trend detection at large spatial scales. *Environ. Sci. Technol.* 3:1411-1415.
9. BELLAS, J.; SACO-ÁLVAREZ, L.; NIETO, O.; BEIRAS, R. 2008. Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. *Mar. Pollut. Bull.* 57:493-502.
10. CALERO, L.; ZAMBRANO, M. 1997. Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos del petróleo en un molusco bivalvo *Anadara tuberculosa*. *Bol. Cient. Cccp. (Colombia)*. 6:131-137.
11. CASANOVA, R. 1995. Estudio de la contaminación marina por compuestos organoclorados en el Pacífico colombiano. *Bol. Cient. Cccp. (Colombia)*. 5:146-160.
12. CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. 2010. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environm. and Human Health Effects). *Sci. Criteria Document (revised)*. Quebec (Canada). 216p.
13. CE, Comisión Europea. 2011. REGLAMENTO (UE) No. 835/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011. Contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. *Diario oficial de la Unión Europea*. Bruselas (Bélgica). L 215/4-8. Disponible desde Internet en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:ES:PDF> (con acceso 22/05/2012).
14. CHEĆ, E.; PODGÓRSKA, B.; WĘGRZYN, G. 2008. Comparison of the use of mussels and semipermeable membrane devices for monitoring and assessment of accumulation of mutagenic pollutants in marine environment in combination with a novel microbiological mutagenicity assay. *Environ. Monit. Assess.* 140:83-90.
15. CSIC. 2003. Impacto de un vertido de petróleo sobre los organismos marinos. Algunas lecciones del vertido del Aegean sea. Informe técnico No. 15. (España). Disponible desde Internet en: <http://csicprestige.iim.csic.es/informes/info15.pdf> (con acceso 03/04/2011).
16. DE LA CRUZ, E. 1994. Stable pollutants in the bivalve *Anadara tuberculosa*, from the Nicoya Gulf, Costa Rica. En: Otchere, F.A. 2005. Organochlorines (PCBs and pesticides) in the bivalves *Anadara (Senilis) senilis*, *Crassostrea tulipa* and *Perna perna* from the lagoons of Ghana. *Sci. Total. Environ.* 348:102-114.
17. Diario Oficial de la Unión Europea. 2011. REGLAMENTO (UE) No. 835/2011 DE LA COMISIÓN de 19 de agosto de 2011. Contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. Bruselas. Bélgica. 5p.
18. EISLER, R. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Eisler, R. (ed.) *Handbook of chemical risk assessment*. Volume II. Boca Raton, FL. Lewis Publishers (Estados Unidos), p.1343-1411.
19. HERRERO, L.; PALACIOS, A.; HÜN, L.; VEGA, F. 1999. Ausencia de detección de enterovirus en bivalvos *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) por contaminación química en el Pacífico de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop. (Costa Rica)*. 47:419-427.
20. IARC. 1983. Polynuclear Aromatic Compounds: Part 1, Chemical, environmental and experimental data. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. World Health Organization. 32:95-431. (Francia). Last updated: 17 April 1998.

21. INCODER. 2007. Sistema de información sectorial pesquero. En: Lovatelli, A.; Farias, A.; Uriarte, I. (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. p.115-128.
22. LAUENSTEIN, G.G. 1995. Comparison of organic contaminants founding mussels and oysters from a current Mussel Watch Project with those from archived mollusk samples of the 1970s. *Mar. Pollut. Bull.* 30:826-833.
23. LEE, R.; LOVATELLI, A.; ABABOUICH, L. 2010. Depuración de bivalvos: Aspectos fundamentales y prácticos. FAO. Documento Técnico de Pesca. No. 511. Roma. (Italia). 153p.
24. MARRUGO, A.J. 1993. Estudio de la contaminación marina por hidrocarburos en el Pacífico Colombiano – Fase III. *Bol. Cient. Cccp. (Colombia)*. 4:47-60.
25. MEADOR, J.P. 2003. Bioaccumulation of pahs in marine invertebrates. in: Douben, P.E.T. (ed.) PAHs: An ecotoxicological perspective. John Wiley & Sons Ltd. Londres (Reino Unido). p.147-171.
26. NEFF, J.M. 2002. Bioaccumulation in marine organisms. Effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier Science Publishers. Oxford. (Reino Unido). 452p.
27. NESTO, N.; CASSIN, D.; DA ROS, L. 2010. Is the polychaete, *Perinereis rullieri* (Pilato 1974), a reliable indicator of PCB and PAH contaminants in coastal sediments? *Ecotox. Environ. Safe.* 73:143-151.
28. OKAY, O.S.; KARACIK, B. 2008. Bioconcentration and phototoxicity of selected PAHs to marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Environ. Sci. Health.* 43(11):1234-1242.
29. PAGE, D.S.; BOEHM, P.D.; BROWN, J.S.; NEFF, J.M.; BURNS, W.A.; BENCE, A.E. 2005. Mussels document loss of bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and the return to baseline conditions for oiled shorelines in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Environ. Res.* 60:422-436.
30. PELLETIER, E.; SARGAIN, P.; PAYET, J.; DEMERS, S. 2006. Ecotoxicological effects of combined UVB and organic contaminants in coastal waters: a review. *Photochem. Photobiol.* 82(4):981-993.
31. POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. 2004. Bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 54(1):45-52.
32. PRADA-RÍOS, J.E.; ZAMBRANO-ORTIZ, M.M. 2006. Toxicidad aguda y bioacumulación de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno y fluoranteno) en *Anadara tuberculosa*. *Bol. Cient. Cccp. (Colombia)*. 13:53-64.
33. PRAHL, H. von; CANTERA, J.R.; CONTRERAS, R. 1990. Manglares y hombres del Pacífico colombiano. Fondo FEN. Bogotá (Colombia). 193p.
34. REY-SALGUEIRO, L.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GARCÍA-FALCÓN, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. 2009. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources. *Food. Res. Int.* 42:983-988.
35. RUSSELL, M.L.; GOTH-GOLDSTEIN, R.; APTE, M.G.; FISK, W.J. 2002. Analytical Method for the determination of Individual (N-alkanes and Isoprenoids) and Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Biomarker Triterpanes and Steranes in Oil and Oil-spill-related. Environmental Samples (Water, Particulates and Soils/Sediment): Berkeley (CA): LawrenceBerkeleyNationalLaboratory, Environmental Energy Technologies Division; 2002 Jan. Report No.: LBNL49574. Contract No.: DEAC0376SF00098. Sponsored by the Department of Energy. Ottawa (Canada), ON, K1A 0H3.
36. SERICANO, J.L.; WADE, T.L.; JACKSON, T.J.; BROOKS, J.M.; TRIPP, B.W.; FARRINGTON, J.W.; MEE, L.D.; READMAN, J.W.; VILLENEUVE, J.P.; GOLDBERGS, E.D. 1995. Trace organic contamination in the Americas: an overview of the US National Status & Trends and the International "Mussel Watch" Programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 31(4-12):214-225.
37. SOLÉ, M.; BUET, A.; ORTIZ, L.; MAYNOU, F.; BAYONA, J.J.; ALBAIGÉS, J. 2007. Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the Prestige fuel oil. *Sci. Mar. (España)*. 71(2):373-382.
38. SORIANO-SANZ, J.A.; FRANCO-HERNÁNDEZ, A.; VIÑAS-DIÉGUEZ, L.; CAMBEIRO-CAMBEIRO,

- B.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.J. 2006. Datos preliminares de hidrocarburos aromáticos policíclicos en mejillón silvestre de la costa cantábrica (España) después del vertido del Prestige. *Cienc. Mar. (España)*. 32(2B):457-463.
39. VELÁSQUEZ LÓPEZ, O.; CORTES, L.M. 1997. Estudio y evaluación de metales traza (Pb, Cr, Cd y Hg) en aguas, sedimentos y organismos marinos de la bahía de Buenaventura. *Bol. Cient. Cccp. (Colombia)*. 6:57-61.
40. ZEDECK, M.S. 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *J Environ. Pathol. Tox.* 3:537-567.

Recibido: Octubre 11 de 2011

Aceptado: Agosto 17 de 2012

# CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN EL DEPARTAMENTO DEL ATLÁNTICO, COLOMBIA

## PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROPOLIS COLLECTED IN THE ATLÁNTIC DEPARTMENT, COLOMBIA

Yeray Rodríguez<sup>1</sup>, Fredys Sánchez-Catalán<sup>2</sup>, Benjamín Rojano<sup>3</sup>, Diego Durango<sup>4</sup>, Jesús Gil<sup>5</sup>, Juan Marín-Loaiza<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Químico, Estudiante Maestría en Ciencias-Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. yarodriguezn@unal.edu.co; <sup>2</sup>Químico, Estudiante Maestría en Ciencias-Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. fsanchezca@unal.edu.co; <sup>3</sup>Químico. M.Sc. Ph.D. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. brojano@unal.edu.co; <sup>4</sup>Químico. M.Sc. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. dldurango@unal.edu.co; <sup>5</sup>Químico. Ph.D. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. jhgilg@unal.edu.co; <sup>6</sup>Químico Farmacéutico. M.Sc. Ph.D. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Carrera 30 No. 45-03. Edificio 450. jcmarinlo@unal.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 303 - 311, 2012

### RESUMEN

Se realizó una comparación de las propiedades fisicoquímicas de los propóleos recolectados en los municipios de Galapa, Sabanalarga, Santo Tomás y Juan de Acosta, del departamento del Atlántico (Colombia). Adicionalmente, se estableció la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleos (EEP), mediante las técnicas de DPPH, ABTS, FRAP y ORAC. El análisis fisicoquímico de los propóleos mostró valores de 8,48 - 24,21%, 1,77 - 6,07%, 55,57 - 77,93%, 5,74 - 11,69% y 0,35 - 3,86%, para el EEP, ceras, insolubles, humedad y cenizas, respectivamente. La determinación para los fenoles totales, se encuentra entre 63,72 y 94,55mg, de ácido gálico/g de muestra. Las absorbancias específicas de los EEP estuvieron dentro del rango de 26 a 96 y el contenido de flavonoides totales mostró valores entre 1,90 y 3,36mg, de quercetina/g de muestra. De los extractos, el que presentó mayor capacidad antioxidante fue el propóleos, recolectado en el municipio de Galapa, con los siguientes valores DPPH: 190,41 TEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ), ABTS: 1918,41 TEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ) y FRAP: 321,27 AEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ) y el segundo valor más alto en ORAC (1964,80  $\mu\text{mol Trolox/g}$  de propóleos). Los resultados obtenidos indican que los propóleos estudiados presentaron variación en las propiedades fisicoquímicas. Los valores de algunos de los parámetros fi-

sicoquímicos estimados no cumplieron con las normativas de calidad establecidas internacionalmente; no obstante, los extractos etanólicos de propóleos evaluados presentaron un alto contenido de fenoles, los cuales, están relacionados con las propiedades antioxidantes encontradas experimentalmente.

Palabras clave: Propóleos, compuestos fenólicos, caracterización fisicoquímica, capacidad antioxidante.

### SUMMARY

A comparison of the physicochemical properties of the propolis collected in the Galapa, Sabanalarga, Santo Tomás and Juan de Acosta's municipalities of the Atlantic department (Colombia) was made. Additionally, the *in vitro*'s antioxidant activity of ethanol extracts of propolis (EEP) through the DPPH, ABTS, FRAP and ORAC methods was established. The physicochemical analysis of propolis indicated values between 8.48–24.21%, 1.77–6.07%, 55.57–77.93%, 5.74–11.69% and 0.35–3.86%, for EEP, waxes, insoluble residues, humidity and ashes respectively. The determination for the total phenolic content was between 63.72 and 94.55mg of gallic acid/g of sample. The EEP's specific absorbance

ranged from 26 to 96 and the total flavonoid content showed values between 1.90 and 3.36mg of quercetin/g of sample. The extract that showed the highest antioxidant capacity was the propolis collected in the municipality of Galapa with the following values, DPPH: 190,41 TEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ), ABTS: 1918,41 TEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ), FRAP: 321,27 AEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ), and the second highest value in ORAC (1964,80  $\mu\text{mol TROLOX/g}$  of propolis). The results obtained indicated that the propolis studied showed a variation in its physicochemical properties. Some of the estimated physicochemical parameter values did not fulfill the established international quality regulations. Nevertheless, the ethanol extracts of the evaluated propolis presented a high content of phenols, related with the antioxidant properties found experimentally.

**Key words:** Propolis, phenolic compounds, physicochemical properties, antioxidant properties.

## INTRODUCCIÓN

Las abejas recolectan exudados de varias especies de plantas, que al mezclarlos con polen y sus secreciones enzimáticas generan un material resinoso, conocido como propóleos (Kalogeropoulos *et al.* 2009). La función primordial de este producto natural es actuar como un agente sellante, para mantener la temperatura de la colmena y protegerla de agentes invasores y microorganismos (Sforcin & Bankova, 2011). Adicional a estas propiedades, para el propóleos se han demostrado actividades biológicas y farmacológicas, tales como: anti-inflamatoria (McLennan *et al.* 2008), antioxidante (Yang *et al.* 2011), antiproliferativa (Russo *et al.* 2004), hepatoprotectora (Banskota *et al.* 2001) e inmunomoduladora (Sforcin, 2007).

El propóleos contiene, aproximadamente, entre un 50-55%, de resina y bálsamos; 30%, de cera; 10%, de volátiles y 5%, de polen (Libério *et al.* 2009). El 5% restante corresponde a una gran variedad de compuestos que van desde metabolitos secundarios, como polifenoles, quinonas sesquiterpénicas, cumarinas, terpenoides, hasta esteroides, aminoácidos, ácidos grasos y compuestos inorgánicos (Bankova *et al.* 2000). Adicionalmente, un gran número de estudios confirman que la composición química de los propóleos es altamente compleja y varía de acuerdo con la vegetación circundante, el periodo y la zona donde fueron recolectados, así como la especie de abeja que lo produce (Bermúdez-Camps *et al.* 2000; Kujumgiev *et al.* 1999; Marcucci, 1995).

Existe un elevado número de artículos en que se describe la caracterización fisicoquímica y la evaluación de las diversas actividades biológicas de propóleos obtenidos en países de los continentes Europeo (Valente *et al.* 2011), Asiático (Ahn *et al.* 2007), Africano (Petrova *et al.* 2010) y America-

no (Russo *et al.* 2004), llegando a la conclusión que existen diferencias evidentes en cuanto a composición cualitativa y cuantitativa de actividad, aun cuando las muestras analizadas sean recolectadas en el mismo país (Koo *et al.* 1999). En la literatura disponible son escasas y dispersas las publicaciones relacionadas con el estudio de propóleos colombianos (Ferreira-Bastos *et al.* 2011; Palomino-García *et al.* 2009; Salamanca-Grosso *et al.* 2007; Ortega *et al.* 2011); debido a esto y con miras a establecer una norma de calidad que permita estandarizar el propóleos como insumo para la elaboración de diversos productos, consideramos importante realizar estudios sobre las características de los propóleos, que en Colombia han sido poco estudiados, como es el caso de muestras de propóleos provenientes del departamento del Atlántico. Estas caracterizaciones podrían conllevar al conocimiento de nuevos constituyentes con actividades biológicas promisorias (Popova *et al.* 2011).

En el presente trabajo, se reporta la caracterización fisicoquímica (cenizas, ceras, humedad, material insoluble, EEP, fenoles, flavonoides totales) y los análisis de la actividad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP y ORAC), de propóleos recolectados en los municipios de Galapa, de Juan de Acosta, de Sabanalarga y de Santo Tomás, pertenecientes al departamento del Atlántico-Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección del propóleos.** Los propóleos de abejas *Apis mellifera* africanizada, se obtuvieron de apiarios, del departamento del Atlántico, provenientes de los municipios de Sabanalarga (Latitud: 10° 38' N, Longitud: 74° 55' O; 108 msnm), de Galapa (Latitud: 10° 53' N, Longitud: 74° 53' O; 50 msnm), de Juan de Acosta (Latitud: 10° 50' N, Longitud: 72° 03' O; 50 msnm) y de Santo Tomás (Latitud: 10° 46' N, Longitud: 74° 55' O; 8 msnm). Las muestras, se colectaron en el segundo trimestre de 2009 (periodo de sequía), por el método de raspado, empleando espátulas para remover el producto adherido en las caras laterales (tapa y entretapa), de cada colmena. El muestreo, se efectuó en forma aleatoria en diferentes colmenas de cada apiario, hasta formar una muestra compuesta representativa y en cantidad suficiente, para realizar los análisis. Los propóleos crudos, se maceraron y se les retiraron las impurezas mecánicas.

**Obtención de los extractos:** 30g de muestra, se sometieron a extracción sucesiva con etanol del 96% v/v (3 x 100mL), durante 48 horas, a temperatura ambiente y en ausencia de luz; luego, el material se cribó y el filtrado fue enfriado a -18°C, para precipitar las ceras.; el extracto, se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida y una temperatura de 40°C; los extractos etanólicos de propóleos (EEP), se almacenaron en viales ámbar y se preservaron a -18°C.

**Caracterización fisicoquímica:** Para la caracterización fisicoquímica del propóleo crudo, se siguieron los métodos recomendados en la Norma del Ministerio de Agricultura de Brasil (Ministerio de Agricultura de Brasil-APACAME, 1999).

**Absorbancia específica del espectro UV:** La absorbancia específica del espectro UV de cada muestra de EEP, se obtuvo siguiendo el método propuesto por Miyataka *et al.* (1997).

**Contenido de fenoles y flavonoides totales:** El contenido de fenoles totales, se determinó por el método colorimétrico de Singleton & Rossi (1965), con algunas modificaciones (Palomino-García *et al.* 2009); para construir la curva de calibración, se usaron soluciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich) entre 50 y 500 µg/mL y los resultados se expresaron como mg, equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de EEP.

El contenido de flavonoides totales en el EEP fue determinado por el método de Kumazawa *et al.* (2004); para construir la curva de calibración, se usaron soluciones de quercetina (Sigma-Aldrich), entre 5 y 25 µg/mL y el contenido total fue calculado como mg, equivalentes de quercetina (QE)/g de EEP.

**Capacidad antioxidante:** La actividad antioxidante de los extractos, se evaluó mediante la capacidad captadora del radical 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH<sup>•</sup>) y se utilizó la metodología de Rojano *et al.* (2008). Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición y expresados como capacidad antioxidante en µmol, de equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico; TE)/g de EEP (TEAC). El antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT), se usó como sustancia de referencia externa.

Para establecer la actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS<sup>•+</sup>), se empleó el método propuesto por Aubad *et al.* (2007). Se utilizó una curva de calibración de Trolox como estándar y los resultados, se expresaron como capacidad antioxidante en µmol de equivalentes Trolox (TE)/g de EEP (TEAC). Se usó como sustancia de referencia externa el BHT.

La actividad antioxidante reductora de Fe<sup>3+</sup> (FRAP), se llevó a cabo según el método de Benzie & Strain (1996); se utilizó una curva de calibración de ácido ascórbico (AA) y las actividades de los extractos de propóleos se expresaron como µmol de equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/g de EEP (AEAC). Los valores, se expresaron como la media de tres réplicas; como sustancia de referencia, se empleó el antioxidante BHT.

El procedimiento experimental del ensayo ORAC estuvo basado en la metodología reportada por Ou *et al.* (2001), con algunas modificaciones (Naranjo *et al.* 2011). Se empleó

Trolox, como sustancia de referencia.

Los datos mostrados en las tablas son el resultado promedio de tres réplicas y son presentados como la media ± su error estándar. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), para establecer si había diferencias significativas entre las medias. Los resultados son expresados como valores de probabilidad con una  $p < 0.05$ , adoptada como criterio de significancia. Para la evaluación antioxidante, se llevó a cabo un análisis de varianza de una sola vía con tres repeticiones y una prueba de comparaciones múltiples de medias de  $n$  tratamientos, con un control de Dunnett, para comparar las muestras con la referencia; el valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo. Todos los cálculos se realizaron en el programa estadístico SPSS Statistics 17.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización fisicoquímica:** Los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de los propóleos del departamento del Atlántico, se ilustran en la tabla 1. El valor del EEP es un parámetro que se relaciona directamente con la calidad del propóleo crudo, debido a que con este extracto se obtienen resinas solubles en alcohol, que es donde se presume están contenidas las sustancias biológicamente activas, que le brindan las características particulares a la muestra.

La norma brasilera señala que el porcentaje de EEP debe ser mínimo 35%. Para las muestras analizadas, los porcentajes de EEP están por debajo (8,48 hasta 24,21% p/p), de lo que indica la norma; el valor más alto correspondió al propóleo de Galapa. Un resultado similar (14,08%) fue obtenido por Palomino-García *et al.* (2010), cuando analizaron el propóleo del municipio de La Unión (Antioquia). Algunos autores atribuyen las diferencias en el contenido de resinas a diversos factores, tales como: la vegetación circundante, el periodo y la zona de cosecha, así como la especie de abeja que lo produce (Bermúdez-Camps *et al.* 2000; Kujumgiev *et al.* 1999; Marcucci, 1995).

Otro parámetro que se emplea como indicador de calidad es el porcentaje de humedad, ya que valores altos reflejan condiciones no apropiadas de manipulación y de almacenamiento (Cunha *et al.* 2004); además, se pueden generar condiciones propicias para el crecimiento microbiano (Carpes *et al.* 2009). Los valores de porcentaje de humedad de los propóleos analizados fueron de 5,74% (Sabanalarga), 8,68% (Santo Tomás), 10,51% (Juan de Acosta) y 11,69% (Galapa). La norma brasilera reporta que el porcentaje de humedad no debe ser mayor del 8%; de acuerdo con esto, únicamente el propóleo recolectado en el municipio de Sabanalarga está dentro de los valores permitidos.

Tabla 1. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de propóleos recolectadas en el Departamento del Atlántico.

Característica fisicoquímica <sup>#</sup>	Propóleos				
	Galapa	Sabana_larga	Santo Tomás	Juan de Acosta	Norma Brasileira (%) <sup>*</sup>
EEP (%)	24,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	8,5 ± 2,7 <sup>b</sup>	12,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,6 ± 0,9 <sup>c</sup>	Mínimo 35,0
Ceras (%)	5,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	Máximo 25,0
Impurezas mecánicas (%)	55,6 ± 3,7 <sup>a</sup>	77,9 ± 2,9 <sup>b</sup>	65,3 ± 3,3 <sup>c</sup>	71,2 ± 1,3 <sup>d</sup>	Máximo 40,0
Humedad (%)	11,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	8,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	10,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	Máximo 8,0
Cenizas (%)	3,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	Máximo 5,0

<sup>#</sup> Todas las determinaciones están dadas en g/100 g de propóleos

<sup>\*</sup>Requisitos de calidad exigidos de acuerdo con la Normatividad Brasileira (Ministerio de Agricultura de Brasil-APACAME, 1999).

Cada valor corresponde al promedio de tres experimentos diferentes ± error estándar. En una misma fila, los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas. El nivel de significancia es  $P < 95\%$ .

En el propóleos no es recomendable un alto porcentaje de material insoluble y ceras, ya que la presencia de estos va en detrimento de la calidad al no hacer ningún aporte significativo a la actividad biológica. Para el material insoluble (impurezas mecánicas), los propóleos del departamento del Atlántico presentaron valores muy superiores (55-78%) a los permitidos por la norma brasileira (40%) (Tabla 1), lo que puede estar relacionado con la metodología de colecta empleada por el apicultor (Sawaya *et al.* 2011).

Contrario a lo obtenido para los otros parámetros determinados, el análisis de porcentaje de ceras mostró que todas las muestras están dentro del rango de valores, propuesto por la normatividad brasileira (máximo 25%). El propóleos con menor porcentaje de ceras fue el recolectado en Sabanalarga. Asimismo, el porcentaje de cenizas de los cuatro propóleos analizados se encuentra por debajo del valor máximo permitido (5%), que cumple con lo establecido en la norma. En este caso, la muestra con menor porcentaje de cenizas fue el propóleos procedente de Santo Tomás.

**Contenido de fenoles y flavonoides totales:** En el propóleos, la presencia de fenoles y flavonoides se asocia con la actividad biológica y se considera como un indicador de calidad por los entes reguladores de la producción de propóleos en países, como Brasil (Ministerio de Agricultura de Brasil-APACAME, 1999) y Argentina (Norma IRAM-INTA, 2004). Los resultados consignados en la tabla 2 indican que el contenido de compuestos fenólicos osciló entre valores que van desde 63,72 hasta 94,55mg de GAE/g de EEP. La muestra de Sabanalarga presentó el menor contenido de compuestos fenólicos.

Los propóleos de Juan de Acosta, de Santo Tomás y de Galapa presentaron un contenido fenólico mayor, al reportado para propóleos del departamento de Antioquia-Colombia, que estuvieron en un rango comprendido entre 22,11 a 75,22mg GAE/g de EEP (Palomino-García *et al.* 2009). Finalmente, todas las muestras analizadas superan el requisito mínimo (50mg de GAE/g de EEP), establecido por la legislación brasileira para la presencia de compuestos fenólicos, como determinante de la calidad.

Adicionalmente, dentro del grupo de los polifenoles, se encuentran los flavonoides, los cuales, son reconocidos por sus propiedades antioxidantes y se les atribuye, en gran parte, aunque no exclusivamente, la actividad biológica del propóleos (Libério *et al.* 2009). Los valores obtenidos para el contenido de flavonoides en los extractos estuvieron entre 1,90 y 5,16mg de QE/g de EEP. De todas las muestras evaluadas, la única que cumple con la norma brasileira (5mg/g) es el propóleos de Santo Tomás (5,16mg/g de EEP, Tabla 2), la cual, a su vez presentó el segundo mayor contenido de fenoles (86,63mg/g de EEP).

El propóleos de Juan de Acosta, a pesar de presentar el mayor contenido de fenoles totales (94,55mg de GAE/g de EEP), tiene el menor valor de contenido de flavonoides (1,90mg de QE/g de EEP), lo cual, indica una mayor distribución de fenoles diferentes a los flavonoides. Comparando los resultados de este análisis con los datos obtenidos por Palomino-García *et al.* 2009 (fenoles: 22,11-75,22mg de GAE/g EEP; flavonoides: 4,75-42,37mg QE/g EEP) y Salamanca-Grosso *et al.* 2007 (flavonoides totales: 6,30-22,33mg/g EEP), para otros propóleos colombianos, se puede considerar al propóleos de Santo Tomás como una muestra con un contenido

apreciable de fenoles ( $86,63 \pm 4,38$  mg de GAE/g EEP) y flavonoides ( $5,16 \pm 0,21$  mg QE/g EEP); no obstante, el contenido de fenoles y flavonoides de los propóleos evaluados fue inferior a los valores reportados en muestras de otras regiones del mundo (Ahn *et al.* 2004; 2007; Kumazawa *et al.* 2004).

La variación en la composición de los propóleos ha sido descrita previamente y se puede deber, principalmente, a factores como las características geográficas y climáticas donde fueron colectadas las muestras, la vegetación a la que las abejas tienen acceso para elaborar la resina y la especie de abeja, entre otros (Bankova, 2005a). Estudios previos relacionados con la composición del propóleos en diferentes países han permitido concluir que aunque los flavonoides son las principales sustancias activas, también se pueden encontrar otro tipo de metabolitos (lignanós, benzofenonas preniladas, ácidos diterpénicos, ácidos coumáricos y cinámicos con sus respectivos ésteres), como los responsables de la actividad biológica (Bankova, 2005b). Para establecer una correlación adecuada entre la variación del contenido de fenoles y flavonoides y la procedencia de la muestra, se hace necesario realizar estudios más detallados con los propóleos del departamento del Atlántico, que conduzcan a establecer: la composición química, las plantas empleadas por las abejas para su producción y las propiedades biológicas de los mismos.

El valor de absorbancia específica ( $E_{1cm}^{1\%}$ ), calculada en el máximo de absorbancia del espectro de absorción UV del EEP, es un parámetro usado para evaluar la calidad del propóleos (Kumazawa *et al.* 2004), debido a que varias de las actividades biológicas de este producto apícola se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y ácidos caféicos, los cuales, presentan absorciones máximas entre

las longitudes de onda de 240 y 350 nm. Como se muestra en la tabla 2, los valores de absorbancia específica estuvieron en el rango de 26,54 (283 nm) a 79,32 (291 nm); siendo más bajos para las muestras de Juan de Acosta y de Sabanalarga, cuyo contenido de flavonoides también fue el menor. Resultados semejantes fueron previamente reportados por Kumazawa *et al.* (2004) para propóleos de Tailandia ( $E_{1cm}^{1\%} = 5$ , determinado a 275 nm) y África ( $E_{1cm}^{1\%} = 102$ , determinado 290 nm). Además, todas las muestras presentaron una absorción máxima a longitudes de onda entre 274 y 291 nm. Es posible inferir que las diferencias en la longitud de onda máxima correspondan a diversas composiciones de fenoles y flavonoides presentes en los propóleos, como consecuencia de los diferentes orígenes botánicos y geográficos.

**Capacidad antioxidante:** Al determinar la actividad antioxidante de los cuatro propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, empleando los métodos de DPPH, ABTS, FRAP y ORAC, con el fin de establecer la presencia de algunos componentes con características antioxidantes en la muestra, se obtuvieron los resultados consignados en la tabla 3.

Los valores de inhibición del radical DPPH obtenidos muestran que el propóleos de Galapa fue el más activo ( $190,41 \mu\text{mol TE/g}$  de EEP), seguido por el de Santo Tomás ( $134,18 \mu\text{mol TE/g}$  de EEP) y el de Juan de Acosta ( $103,79 \mu\text{mol TE/g}$  de EEP). De las muestras analizadas, el propóleos de Sabanalarga fue el de más baja capacidad captadora del radical DPPH ( $65,14 \mu\text{mol TE/g}$  de EEP). Comparando estos valores con propóleos de diferentes regiones del departamento de Antioquia, se encontró que las muestras del Atlántico presentaron una actividad mayor que los propóleos de Caldas (CR:  $54,6 \text{ TE/g}$  de EEP) y el Apiario Lima ( $33,9 \text{ TE/g}$  de EEP), pero fue inferior a la de los propóleos de Caldas (CT:  $324,6$

Tabla 2. Contenido de fenoles totales y flavonoides en las muestras de propóleos.

MUESTRA	Coefficiente de extinción en el máximo de absorbancia $E_{1cm}^{1\%} (\lambda)$	Contenido de Fenoles Totales <sup>A</sup>	Contenido de Flavonoides Totales <sup>B</sup>
Galapa	73,5 (290)	$81,2 \pm 10,0^a$	$3,4 \pm 0,8^a$
Sabanalarga	29,0 (274,5)	$63,7 \pm 16,1^b$	$2,3 \pm 0,1^a$
Santo Tomás	79,3 (291,5)	$86,6 \pm 4,4^c$	$5,2 \pm 0,2^a$
Juan de Acosta	26,5 (283,5)	$94,6 \pm 21,1^b$	$1,9 \pm 0,1^a$

<sup>A</sup> mg de ácido gálico / g de muestra (mg de GAE/g de EEP).

<sup>B</sup> mg de quercetina / g de muestra (mg de QE/g de EEP). Los valores representan la media de tres repeticiones  $\pm$  la desviación estándar.

En una misma columna, los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas. El nivel de significancia es  $P < 95\%$ .

TE/g de EEP), de Betania (BR: 263,3 TE/g de EEP) y el estándar BHT (517,4 TE/g de EEP) (Palomino-García et al. 2009). Posiblemente, estas diferencias en la actividad se deban a las variaciones en composición de fenoles y flavonoides presentadas entre las muestras. En general, los propóleos del Atlántico presentaron una mayor concentración de fenoles y un contenido de flavonoides inferior, en comparación con los propóleos antioqueños.

Las muestras analizadas, mediante la técnica ABTS, presentaron un comportamiento similar al reportado para la prueba de DPPH, donde el propóleos de Galapa mostró la mayor decoloración del radical ABTS ( $1918,41 \pm 44,45 \mu\text{mol trolox/g}$  de EEP) y el propóleos de Sabanalarga la menor ( $739,74 \pm 14,51 \mu\text{mol trolox/g}$  de EEP). Adicionalmente, se puede apreciar la relación que se da entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos.

La actividad antioxidante esperada en mezclas puede ser el resultado de los posibles efectos sinérgicos, cooperativos o antagonistas de las sustancias presentes. Al tener en cuenta los resultados obtenidos, se puede inferir que no solo los fenoles son los responsables de la capacidad antioxidante, sino que puede haber otras sustancias implicadas (Huang et al. 2005).

Los valores de FRAP para las muestras de propóleos analizadas estuvieron entre 112,05 y 321,27 AEAC ( $\mu\text{mol de ácido ascórbico/g}$  de EEP) (Tabla 3). El propóleos de Galapa y el de Sabanalarga fueron las muestras con el mayor y el menor valor antioxidante en el ensayo de FRAP, conservándose la misma tendencia mostrada en las pruebas de actividad an-

tioxidante (DPPH y ABTS). También se aprecia que ninguno de los extractos probados supera la capacidad antioxidante, mostrada por el estándar empleado (BHT).

En la tabla 3, se reportan los valores ORAC para los extractos etanólicos de propóleos, expresados como  $\mu\text{mol}$  de equivalente de Trolox/g de EEP. Los valores más altos de ORAC fueron 2211,94 y 1964,80  $\mu\text{moles}$  de Trolox/g de EEP, que corresponden a las muestras de Santo Tomás y de Galapa, respectivamente. El valor más bajo de ORAC fue para la muestra de Sabanalarga (475,02  $\mu\text{moles}$  de Trolox/g de EEP). Estos resultados son semejantes a los encontrados en análisis realizados para propóleos uruguayos (Silva et al. 2011), específicamente, para las muestras que fueron clasificadas en el grupo de bajo valor ORAC (1,8 - 2,6  $\mu\text{mol TE/mg}$  de EEP).

Los extractos de Galapa, de Santo Tomás y de Juan de Acosta fueron los que mostraron el mayor contenido de fenoles totales. De igual manera, el contenido de flavonoides fue mayor para el propóleos de Santo Tomás, seguido del de Galapa. Por otro lado, el extracto del municipio de Sabanalarga fue el que mostró menor contenido de compuestos fenólicos y el tercer valor en contenido de flavonoides (Tabla 2). En diversos estudios con propóleos provenientes de Europa y de Sur América se han correlacionado la capacidad antioxidantes, por diversas metodologías con el contenido de polifenoles y se ha reportado que estas sustancias no son las únicas responsables de la actividad (Ahn et al. 2007; Kumazawa et al. 2004; Sawaya et al. 2011). En este trabajo, se encontró que el contenido de fenoles no correlaciona significativamente (datos no presentados) con ninguna de las formas de medir la actividad antioxidante; sin embargo, el contenido de

Tabla 3. Actividad antioxidante de los extractos etanólicos de los propóleos recolectados en diferentes municipios del departamento del Atlántico, Colombia.

Muestra	DPPH TEAC <sup>#</sup> ± DE ( $\mu\text{mol/g}$ EEP)	ABTS TEAC <sup>#</sup> ± DE ( $\mu\text{mol/g}$ EEP)	FRAP AEAC <sup>&amp;</sup> ± DE ( $\mu\text{mol/g}$ EEP)	ORAC ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ de EEP)
Galapa	$190,4 \pm 6,9^a$	$1918,4 \pm 44,5^a$	$321,3 \pm 55,6^a$	1964,8
Sabanalarga	$65,1 \pm 2,1^b$	$739,7 \pm 14,5^b$	$112,1 \pm 11,5^b$	475,0
Santo Tomás	$134,2 \pm 3,5^c$	$1322,6 \pm 4,7^c$	$262,7 \pm 24,5^c$	2211,9
Juan de Acosta	$103,8 \pm 2,5^d$	$1061,1 \pm 19,6^d$	$191,1 \pm 31,5^d$	709,5
BHT (Estándar)	$517,4 \pm 0,1^e$	$884,9 \pm 0,1^e$	$500,6 \pm 5,5^e$	

<sup>#</sup> Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TE).

<sup>&</sup> Capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico. Los valores representan la media de tres repeticiones  $\pm$  la desviación estándar (DE).

En una misma columna, los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas. El nivel de significancia es  $P < 95\%$ .

flavonoides correlaciona significativamente ( $R^2 = 83,4\%$ ;  $F = 10$ ) con los valores ORAC mediante la expresión:

$$\text{Valor ORAC} = -8983,2 + 1814,7 \text{ Ln (Fenoles Totales)}$$

En conclusión, el fenómeno oxidativo exhibido por los propóleos del Atlántico puede ser debido a que los flavonoides atrapan radicales libres mediante un mecanismo de transferencia de protones, medidos por la metodología ORAC.

Los resultados entre los diferentes métodos de ensayo no son completamente comparables, dado que el fundamento de cada ensayo antioxidante varía. En particular, la muestra de Sabanalarga presentó los valores más bajos de actividad en los cuatro modelos evaluados, mientras que el propóleo de Galapa presentó la mayor capacidad antioxidante, exceptuando el resultado obtenido en ORAC.

Las muestras analizadas de propóleos crudo del departamento del Atlántico presentaron variaciones en las características fisicoquímicas; donde se observó que los contenidos de ceras y de cenizas se encontraron entre los valores establecidos por las normas internacionales. Esto permite realizar dos consideraciones: la primera, relacionada con las condiciones de recolección y de almacenamiento de los propóleos, que quizás no sean las más adecuadas y repercuten en el detrimento de la calidad de las muestras; y, la segunda, la diferencia de los resultados obtenidos al compararlos con los propóleos provenientes de otros departamentos de Colombia permite pensar en un escenario diferente para el manejo, la producción y la generación de normativas en nuestro país. Adicionalmente, los extractos etanólicos analizados presentaron alto contenido de fenoles ( $> 50\text{mg GAE/g EEP}$ ), lo cual, se relaciona con la buena actividad antioxidante evaluada, a través de los cuatro métodos para las muestras de Galapa y de Santo Tomás.

Basados en estas observaciones, se debe generar una discusión en torno a los parámetros de calidad que representen apropiadamente los propóleos colombianos, con miras a establecer una normatividad que conduzca a consolidar la industria apícola nacional. Por último y, no por eso menos importante, se hace evidente la necesidad de establecer cuáles son las especies de abejas que producen el propóleo, identificar las plantas empleadas por estas para la elaboración de la resina y determinar las propiedades biológicas de las muestras y los compuestos responsables de la actividad.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen a los laboratorios de Separaciones Químicas y Productos Naturales de la Universidad Nacional, por facilitar el empleo de equipos y la disposición de reactivos. **Conflicto de intereses:** Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.; NAKAYAMA, T. 2004. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 52(24):7286-7292.
2. AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101(4):1383-1392.
3. ACIBAD, P.; ROJANO, B.; LOBO, T. 2007. Actividad antioxidante en musgos. *Scientia Et Technica.* 13(33):23-26.
4. BANKOVA, V. 2005a. Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM.* 2(1):29-32.
5. BANKOVA, V. 2005b. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100(1-2):114-117.
6. BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M. 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31(1):3-15.
7. BANSKOTA, A.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. 2001. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine.* 8(1):16-23.
8. BENZIE, I.; STRAIN J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239(1):70-76.
9. BERMÚDEZ-CAMPS, I.; REYES-HERNÁNDEZ, I.; LEÓN-FERNÁNDEZ, O. 2000. Evaluación de la actividad antioxidante del propóleo de la región de Manzanillo. Provincia Granma. Cuba. *Bioquímica.* 25(3):69-74.
10. CARPES, S.; MOURÃO, G.; DE ALENCAR, S.; MASSON, M. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Braz. J. Food Technol.* 12(3):220-229.
11. CUNHA, I.; SAWAYA, A.; CAETANO, F.; SHIMIZU, M.; MARCUCCI, M.; DREZZA, F.; POVIA, G.; CARVAL-

- HO, P. de O. 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 15(6):964-970.
12. FERREIRA-BASTOS, E.; GUZMÁN, D.; FIGUEROA, J.; TELLO, J.; DE OLIVEIRA SCOARIS, D. 2011. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (hymenoptera: apidae) de la región andina colombiana. *Acta biol. Colomb.* 16(1):175-184.
13. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):1841-1856.
14. KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis from Greece and Cyprus. *Food Chem.* 116(2):452-461.
15. KOO, H.; ROSALEN, P.; CURY, J.; PARK, Y.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. 1999. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res.* 33(5):393-400.
16. KIJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64(3):235-240.
17. KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84(3):329-339.
18. LIBÉRIO, S.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, M.; DUTRA, R.; NASCIMENTO, F.; MONTEIRO-NETO, V.; RIBEIRO, M.; GONÇALVES, A.; GUERRA, R. 2009. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J. Ethnopharmacol.* 125(1):1-9.
19. MARCÚCCI, M. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 26(2):83-99.
20. MCLENNAN, S.; BONNER, J.; MILNE, S.; LO, L.; CHARLTON, A.; KURUP, S.; JIA, J.; YUE, D.; TWIGG, S. 2008. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair Regen.* 16(5):706-713.
21. MINISTERIO DE AGRICULTURA DE BRASIL-APACAME- Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias. 1999. Regulamentos técnicos para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Revista Mensagem Doce.* 52(3):13-14.
22. MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. 1997. Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol. Pharm. Bull.* 20(5):496-501.
23. NARANJO, M.; VÉLEZ, T.; ROJANO, B. 2011. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 16(2):164-173.
24. NORMA IRAM-INTA 15935-1 Scheme 1. 2004. Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de productos agroalimentarios del NOA. Buenos Aires, Argentina.
25. ORTEGA, N.S.; BENITEZ-CAMPO, N.; CABEZAS-FAJARDO, F. 2011. Antibacterial activity and cualitative composition propolis from two climatic regions Cauca department. *Biotechn. Sector Agropec. Agroind.* 9(1):8-16.
26. OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agr. Food. Chem.* 49(10):4619-4626.
27. PALOMINO-GARCÍA, L.; GARCÍA, C.; GIL, J.; ROJANO, B.; DURANGO, D. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae.* 16(3):388-395.
28. PALOMINO-GARCÍA, L.; MARTÍNEZ-GALÁN, J.; GARCÍA-PAJÓN, C.; GIL-GONZÁLEZ, J.; DURANGO-RESTREPO, D. 2010. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de la Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Nacional de Agronomía – Medellín.* 63(1):5373-5383.
29. PETROVA, A.; POPOVA, M.; KUZMANOVA, C.; TSVETKOVA, I.; NAYDENSKI, H.; MÜLL, E.; BANKOVA, V. 2010. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia.* 81(6):509-514.
30. POPOVA, M.; TRÚSHEVA, B.; ANTONOVA, D.; CÚTAR, S.; MIFSÚD, D.; FARRÚGIA, C.; TSVETKOVA,

- I.; NAJDENSKI, H.; BANKOVA, V. 2011. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* 126(3):1431-1435.
31. ROJANO, B.; SAEZ, J.; SCHINELLA, G.; QUIJANO, J.; VÉLEZ, E.; GIL, A.; NOTARIO, R. 2008. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J. Mol. Struct.* 877(1-3):1-6.
32. RUSSO, V.; CARDILE, V.; SANCHEZ, F.; TRONCOSO, N.; VANELLA, A.; GARBARINO, J.A. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci.* 76(5):545-558.
33. SALAMANCA-GROSSO, G.; CORREA-CARVAJAL, I.V.; PRINCIPAL, J. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zoot. Trop.* 25(2):95-102.
34. SAWAYA, A.; DA SILVA CUNHA, I.; MARCUCCI, M. 2011. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem. Centr. J.* 5(1):27.
35. SFORCIN, J. 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113(1):1-14.
36. SFORCIN, J.; BANKOVA, V. 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *J. Ethnopharmacol.* 133(2):253-260.
37. SILVA, V.; GENTA, G.; MÖLLER, M.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D.; LAURINDO, F.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. 2011. Antioxidant activity of uruguyan propolis. *In vitro* and cellular assays. *J. Agric. Food Chem.* 59(12):6430-6437.
38. SINGLETON, V.; ROSSI Jr, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Ame. J. Enol. Vitic.* 16(3):144-158.
39. VALENTE, M.; BALTAZAR, A.; HENRIQUE, R.; ESTEVINHO, L.; CARVALHO, M. 2011. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* 49(1):86-92.
40. YANG, H.; DONG, Y.; DU, H.; SHI, H.; PENG, Y.; LI, X. 2011. Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules.* 16(4):3444-3455.

Recibido: Noviembre 2 de 2011

Aceptado: Agosto 24 de 2012

# CARACTERÍSTICAS DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DERIVADOS DE *Sarconesiopsis magellanica* (LE GUILLOU, 1842) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

## PRIMARY CELL CULTURES DERIVED FROM *Sarconesiopsis magellanica* (LE GUILLOU, 1842) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Mónica Cruz B.<sup>1</sup>, Felio J. Bello<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bióloga. Joven Investigador Colciencias. Laboratorio de Entomología Médica y Forense, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario; <sup>2</sup> M.Sc. Ph.D. Laboratorio de Entomología Médica y Forense, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario. Bogotá D.C., Colombia. Dirección para correspondencia: Calle 63D No. 24-31, E-mail: felio.bello@urosario.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 313 - 321, 2012

### RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue obtener cultivos celulares primarios derivados de tejido embrionario de *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae), mosca importante por sus aplicaciones en el establecimiento del intervalo post-mortem. Se evaluaron siete medios de cultivo (Grace, Grace/L15, MM, VP12, MM/VP12, Eagle y Schneider), suplementados con 20% de suero fetal bovino. Se observó adhesión, crecimiento y proliferación celular en los medios L15, Schneider y Grace/L15, lográndose mejores resultados en los dos últimos. La obtención de la monocapa confluyente, se presentó en un tiempo promedio de doce días, después de realizados los explantes. El patrón de crecimiento de los cultivos primarios mostró la presencia de vesículas con células adheridas a sus paredes, las cuales, ayudaron a la formación de la monocapa confluyente. La morfología celular predominante en la monocapa correspondió a formas fibroblastoides y, en menor proporción, a epitelioides, mostrando las primeras una apariencia similar a células nerviosas. Adicionalmente, se registraron en los primeros días de los cultivos primarios, especialmente, en algunos conglomerados de células, movimientos contráctiles semejantes a los realizados por células musculares. Estos cultivos celulares primarios derivados de *S. mangellanica* representan, potencialmente, sustratos adecuados para realizar ensayos posteriores de susceptibilidad a infección con arbovirus y parásitos.

Palabras clave: Moscas, medios de cultivo, tejido embrionario, vesículas, morfología celular.

### SUMMARY

The present work was aimed at obtaining and characterizing cell cultures from *Sarconesiopsis magellanica* embryonic tissue (Diptera: Calliphoridae). This fly is important by its applications in the establishment of post-mortem interval. This study evaluated seven culture medium (Grace, Grace/L15, MM, VP12, MM/VP12, Eagle and Schneider), supplemented with 20% fetal bovine serum. The adhesion, cell growth and proliferation were observed in L15 medium, Schneider and Grace/L15, achieving better results in the last two. The confluent monolayer was present in an average of twelve days after that the explants were made. The growth pattern of the primary cultures showed the presence of vesicles with cells adhering to its walls, which helped to form a confluent monolayer. The predominant cell morphology in monolayer correspond to fibroblastoid a lesser extent to epithelioid, showing the first similar to nerve cells. Additionally, there was in the early days of primary cultures, especially in some clusters of cells, contractile movement, similar to those made by muscle cells. These primary cell cultures derived from *S. magellanica* represent potentially suitable substrates for further testing of susceptibility to infection with arboviruses and parasites.

Key words: Flies, culture media, embryonic tissue, vesicles, cell morphology.

### INTRODUCCIÓN

*Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou, 1842) pertenece a la familia Calliphoridae y es una mosca necrófaga y

hemisfantrópica (Mariluis & Schnack, 1996; Pinilla *et al.* 2012). En Colombia, esta especie tiene, al igual que la mayoría de las pertenecientes a la familia Calliphoridae, importancia a nivel ecológico, médico y sanitario, debido a sus hábitos de alimentación y a las etapas en su desarrollo biológico, razón por la cual, pueden ser vectores mecánicos de patógenos, tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (Ferreira & Barbola, 1998; Förster *et al.* 2007) y también sus larvas pueden llegar a causar miasis en algunos vertebrados, incluido el hombre (Stevens, 2003; Visciarelli *et al.* 2003; Pape *et al.* 2004; Montoya *et al.* 2009). Así mismo, *S. magellanica* es importante en investigaciones médico-legales, debido a que puede ser utilizada en la determinación del intervalo post-mortem, al participar como primer colonizador de cuerpos en descomposición (Martínez *et al.* 2007; Segura *et al.* 2009). En Bogotá, específicamente en una zona semirural, fue registrada como la primera especie colonizadora de cuerpos de cerdo en descomposición, el cual, a su vez, se considera el principal biomodelo animal usado para experimentación en Entomología Forense (Segura *et al.* 2009). La presencia de esta especie ha sido reportada en Argentina (Mariluis & Mulieri, 2003), en Bolivia, en Chile, en Ecuador y en Perú (Pape *et al.* 2004). Mariluis & Mulieri (2003) describen a este insecto como especialmente adaptado a las alturas, en razón a que se encuentra en zonas superiores a los 900 msnm. En Colombia, está distribuido en los departamentos de Antioquia, de Boyacá, de Cundinamarca y Norte de Santander (Pape *et al.* 2004).

Desde comienzos del siglo XX, algunos investigadores trataron de obtener células de insecto *in vitro* (Lynn, 2002), pero no fue sino hasta 1962 cuando Grace, a partir de ovarios de un lepidóptero, la polilla Emperador Australiana (*Antheraea eucalypti* Scott, 1864), estableció la primera línea celular. Desde entonces hasta nuestros días, se han establecido más de 500 líneas celulares de insectos, correspondientes a, aproximadamente, 120 especies, la mayoría, de las cuales, pertenecen a los órdenes Diptera y Lepidoptera (Lynn, 2001; 2007).

Los cultivos celulares de insectos han contribuido al desarrollo de estudios fisiológicos de las especies, de las cuales, se derivan (Khurad *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2011). También, son herramientas importantes en campos como la inmunología, la biología del desarrollo y en investigaciones sobre biopesticidas (Suddep *et al.* 2005; Harrison & Lynn 2008; Xu *et al.* 2010). Por otro lado, estos sustratos celulares son considerados un recurso potencial importante en biología molecular, debido a su uso en un amplio rango de investigaciones aplicadas (Wu & Wang, 2006; Iwanaga *et al.* 2009); así mismo, han resultado de gran utilidad en el estudio de las interrelaciones parásito-hospedero (Takahashi *et al.* 1980; Côrtes *et al.* 2011), en la propagación de patógenos

específicos (Hoshino *et al.* 2009), en biofarmacéutica y en la expresión de proteínas recombinantes (Iwanaga *et al.* 2009; Khurad *et al.* 2009; Kharat *et al.* 2010; Pan *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011). Cervarix®, vacuna contra el virus del papiloma humano, fue el primer producto comercial producido por el sistema baculovirus-vector (Mena & Kamen, 2011). La aparición del sistema vector de expresión baculovirus a comienzos de 1980, para la producción de proteínas heterólogas, adicional a los avances en ingeniería metabólica, ha permitido convertir el cultivo de células de insecto en una nueva tecnología de gran utilidad en estudios biomédicos (Ikonomou *et al.* 2001), aumentando así el interés en el desarrollo de nuevas líneas celulares (Suddep *et al.* 2005).

Además de las aplicaciones de los cultivos celulares derivados de insectos, señaladas anteriormente, existe una demanda creciente de ellos en biología celular y, particularmente, en estudios genómicos funcionales de insectos, sin descartar el hecho que estas líneas celulares, originadas de una gran variedad de especies, difieren en su capacidad para replicar virus y expresar proteínas recombinantes (Hink *et al.* 1991; Iwanaga *et al.* 2009; Goodman *et al.* 2012), razón por la cual, se hace necesario establecer nuevas líneas celulares de insectos (Hoshino *et al.* 2009; Khurad *et al.* 2009; Wen *et al.* 2009; Pan *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011), precisamente, para apoyar y para avanzar en todos los procesos indicados. En la actualidad, no se conocen registros en la literatura especializada universal de cultivos celulares de *S. magellanica*. Para la familia Calliphoridae solamente existe un registro de cultivos celulares primarios, que corresponde a la especie *Lucilia sericata* (Echeverry *et al.* 2009). Por otro lado, con respecto a especies de importancia forense de la familia Sarcophagidae, se registra la línea celular de *Sarcophaga peregrina* (Takahashi *et al.* 1980).

El objetivo principal del presente trabajo fue obtener cultivos celulares primarios derivados de tejidos embrionarios de *S. magellanica*, los cuales, se caracterizaron de acuerdo con el patrón de crecimiento y la morfología celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico:** Para la iniciación de los cultivos primarios de *S. magellanica*, se utilizaron huevos embrionados, tomados de una colonia previamente establecida, en el laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Universidad del Rosario, mantenida a una temperatura entre 22 a 25°C; humedad relativa de 60-70% y periodos de luz y de oscuridad de doce horas. Como fuente de carbohidratos, se utilizó una torunda impregnada con una solución azucarada y suplementada con 1mL de vitaminas del complejo B.

Como alimento y sustrato proteico, para inducir las posturas de los adultos hembras, se utilizó hígado de cerdo.

Desinfección del material biológico y obtención de cultivos primarios: Los huevos recolectados de la colonia, aproximadamente 200 para cada ensayo, fueron previamente incubados en el insectario, durante 20 a 22 horas, seguido de una refrigeración a 4°C por tres horas y un tiempo adicional de incubación de dos horas, a 37°C, antes de la realización del explante. Después del tiempo de incubación, se depositaron en un tubo estéril cónico Falcom de 15mL, donde se realizó un proceso de desinfección, de acuerdo con el procedimiento registrado por Figueroa *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Se llevaron a cabo lavados seriados de los huevos, el primero de ellos con 8mL de hipoclorito de sodio al 0,5% con agitación continua durante cinco minutos; luego, al decantarse, se retiró la solución y, a continuación, se realizó un segundo lavado con 8mL de formaldehído al 5%, también con agitación continua, durante cinco minutos. Finalmente, siguiendo los pasos anteriores, se efectuaron tres lavados sucesivos de los huevos, en agua destilada estéril con antibiótico (penicilina/estreptomicina al 1%).

Después del procedimiento de asepsia, a los huevos se les adicionó 3mL de tripsina al 1% y luego se llevaron a un homogenizador de tejidos, donde se maceraron. El producto del procedimiento anterior, se incubó durante cuatro minutos a 37°C; pasado este tiempo, se adicionaron 5mL del medio de crecimiento seleccionado, con el propósito de desactivar la tripsina. El contenido, se centrifugó a 432g, durante siete minutos. Después de descartar el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 5mL de medio de cultivo seleccionado y, de inmediato, se vertió la mezcla en un frasco de cultivo de 25cm<sup>2</sup>. Finalmente, el frasco con el contenido, se llevó a incubación, a una temperatura de 28°C, sin atmosfera de CO<sub>2</sub>.

Medios de cultivo evaluados: Para la iniciación de los cultivos celulares primarios, se evaluaron los medios de cultivo siguientes: L-15 (Gibco®), Grace/L-15 (Gibco®), Eagle MEM (Gibco®), MM (Mitsubishi & Maramorosh, 1964), VP12 (Varma & Pudney, 1969), MM/VP12 (Varma & Pudney 1969) y Schneider (Sigma®); suplementados, cada uno de ellos, con 20% de Suero fetal Bovino (SFB) y una solución de antibiótico-antimicótico al 1%.

Morfología celular y patrón de crecimiento: Se realizaron observaciones diarias de los cultivos primarios, haciendo uso de un microscopio invertido (Leica DMIL), donde se identificaron las formas celulares. También, se hizo seguimiento diario a las características del crecimiento y patrones morfológicos, que se fueron configurando en los cultivos, a través del tiempo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Iniciación de cultivos celulares primarios y medios de cultivo: El crecimiento celular, se inició a las 48 horas, posterior a la siembra de los tejidos embrionarios, en los medios L15, Grace/L15 y Schneider. No hubo crecimiento en los medios MM, VP12, MM/VP12 y Eagle (Tabla 1). La principal fuente para la obtención de cultivos primarios, se presentó alrededor de pequeños fragmentos del explante, adheridos a la superficie inferior del frasco de cultivo; sin embargo, hubo también proliferación de células sueltas, algunas, inicialmente, en suspensión y en otras, formando colonias aisladas, similar a lo registrado por Grasela *et al.* (2012), Li *et al.* (2012) y Zhang *et al.* (2012). El tiempo relativamente corto empleado en la iniciación del crecimiento celular, a partir de los tejidos embrionarios de *S. magellanica* sembrados en los tres medios de cultivos antes indicados como óptimos, es una característica poco común en cultivos celulares de insectos, lo cual, es excepcionalmente similar al tiempo post-siembra registrado en el medio de cultivo L-15, en la iniciación de los cultivos celulares primarios derivados de tejidos embrionarios de la mosca *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) donde el crecimiento celular se inició en las primeras horas después de haberse realizado los explantes (Echeverry *et al.* 2009).

La selección del tiempo de incubación de los huevos constituye uno de los factores determinante para la iniciación del crecimiento celular y, en el presente trabajo, los mejores resultados, se lograron en aquellos que alcanzaron las dos terceras partes del desarrollo embrionario (22 y 24 horas de incubación), siendo similar esta situación a lo registrado en cultivos celulares de mosquitos (Charpentier *et al.* 1995; Bello *et al.* 2001; Ardila *et al.* 2005) y también de flebotomos (Rey *et al.* 2000; Zapata *et al.* 2005). Además, un período de incubación de los huevos a una temperatura de 37°C, durante un tiempo no superior a dos horas, antes de su uso en los explantes de tejido embrionarios, tal como ocurrió en el presente trabajo, estimula la división celular e incrementa su metabolismo, lográndose, de esta forma, en los medios de cultivo óptimos, un menor tiempo en la iniciación del crecimiento y la proliferación celular de los cultivos primarios (Oelofsen *et al.* 1990).

Por otro lado, el tiempo empleado en la formación de las monocapas confluentes en los tres medios de cultivo (Figuras 1a, b, c) donde se inició el crecimiento celular, no se dio por igual en todos ellos; así tenemos que el medio de cultivo, con un registro menor de duración, fue Grace/L15, con ocho días, seguido de Schneider, con diez días y, por último, L15, con 19 días. Esta situación es diferente a lo registrado en los cultivos celulares primarios derivados de *L. sericata*, donde la formación de la monocapa celular se obtuvo solamente en el medio L15, a pesar que se evaluaron los mismos medios

Tabla 1. Resumen del proceso de obtención de los cultivos celulares primarios derivados de tejidos embrionarios de *S. magellanica*.

Números de explantes	Fuente	Medio de cultivo	Inicio crecimiento	Morfología celular	Formación monocapa
6	Huevo	MM	-----	-----	-----
6	Huevo	VP12	-----	-----	-----
6	Huevo	MM/VP12	-----	-----	-----
19	Huevo	L15	1-3	Epitelioides y similares a nerviosas	SI
28	Huevo	Grace/L15	1-3	Epitelioides y similares a nerviosas	Si
25	Huevo	Schneider	1-3	Epitelioides y similares a nerviosas	SI

de cultivo comparados con los empleados en el presente trabajo y, además, se estableció un tiempo mayor en la configuración de la monocapa, correspondiente a 45 días (Echeverry *et al.* 2009); sin embargo, en cultivos celulares de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), teniendo como fuente nutritiva el medio Grace/L15, se necesitaron seis meses para la formación de la monocapa confluyente (Ardila *et al.* 2005).

Estas diferencias, en los tiempos prolongados o cortos, evidenciadas en la duración en la formación de las monocapa confluentes, dependen fundamentalmente del proceso de adaptación y de proliferación de las células en respuesta a las condiciones nutricionales, físico-químicas y ambientales, establecidas en los cultivos celulares primarios, derivados de insectos (Zhang *et al.* 2011). También, el hecho que algunos medios de cultivo, tal como se indicó

arriba, no resultaron viables, se explica por la ausencia de nutrientes adecuados y suficientes para la adaptación y el crecimiento celular. Así mismo, los tres medios de cultivo donde hubo crecimiento celular y formación de monocapas tuvieron diferencias notables en el proceso de evolución y desarrollo de los subcultivos que se produjeron, así se pudo establecer que en L-15 solamente se obtuvieron tres pases, en Grace/L-15 hubo seis y en Schneider se han mantenido hasta el momento siete pases. Estas diferencias, se pueden deber a la variabilidad en la composición de los medios de cultivo, en términos de mayor o menor similitud con las sustancias que conforman la hemolinfa de los insectos, de donde se derivan los cultivos celulares (Grace, 1962).

En concordancia con la adaptación de las células, la evolución favorable de ellas en el crecimiento, en menor

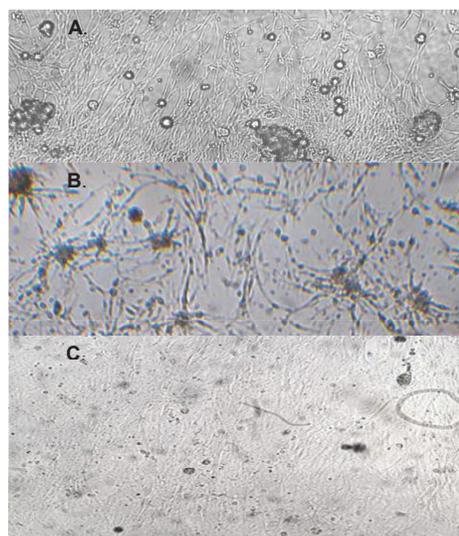


Figura 1. Monocapas confluentes obtenidas en diferentes medios de cultivo. **A.** Medio Grace/L15 después de 8 días de cultivo (20X). **B.** Medio Schneider después de 10 días de cultivo (20X). **C.** Medio L15 después de 19 días de cultivo (20X).

tiempo, hasta la formación de la monocapa y el posterior desarrollo de subcultivos, a través de los pases sucesivos, los medios que mejores resultados produjeron fueron: Grace/L15 y Schneider; sin embargo, el medio de cultivo en donde se presentó una mejor adaptación celular, a partir de los explantes de tejidos embrionarios de *S. magellanica*, fue Grace/L15, siendo, a su vez, el que tuvo concentraciones de iones de calcio, de potasio y de sodio, similares a las registradas en la hemolinfa de los dípteros de la familia Calliphoridae (Le Douarin, 1971), a la cual, pertenece dicha especie. Este hecho, probablemente, contribuyó en forma decisiva a simular las condiciones *in vitro* óptimas de las células cultivadas, parecidas a las del insecto seleccionado, permitiendo así la posterior evolución de los cultivos celulares primarios hasta la formación de la monocapa, en un tiempo relativamente menor. Por otro lado, el medio Schneider, a pesar de tener menores concentraciones de iones minerales, comparado con el anterior, es el único de los evaluados que registra la presencia de dos sustancias nutritivas necesarias en los procesos fisiológicos de los insectos: trehalosa y extracto de levadura. La primera sustancia es un componente importante en la hemolinfa de los insectos, que aumenta la sobrevivencia de las células en los cultivos, mientras que el extracto de levadura mejora la adherencia de los tejidos y de las células a la superficie de los frascos de cultivo, promoviendo, a su vez, la disociación de las células en las masas de tejido. En síntesis, estos dos compuestos y sus interacciones promueven la adherencia, el crecimiento y la propagación de células en la superficie de los frascos de cultivo (Zhang *et al.* 2011).

**Patrón de crecimiento:** Aunque en la iniciación de los cultivos primarios se registraron pocas células y fragmentos de tejidos en suspensión temporal en los medios de cultivo, el patrón definitivo en el crecimiento y en la propagación de las células se dio en forma de adherencia a la superficie; sin embargo, también se observaron vesículas (Figura 2) con células adheridas a su superficie, situación que fue común para los tres medios de cultivo señalados como óptimos, las cuales, después de un tiempo, relativamente corto, se disociaron y contribuyeron a la formación de nuevas colonias celulares en la superficie del frasco de cultivo que, luego de unirse con otras previamente constituidas, tuvieron una evolución favorable en su crecimiento ulterior hasta monocapas confluentes. Estas vesículas también han sido reportadas en trabajos previos sobre cultivos celulares de insectos, entre otros, por Bello *et al.* (1999); Suddep *et al.* (2005); Echeverry *et al.* (2009), Segura *et al.* (2012) y Goodman *et al.* (2012).

Otra característica fenotípica observada como un marcador importante en el crecimiento de los cultivos celulares primarios de *S. magellanica*, en los primeros días, fue la presencia de una contracción rítmica que se localizó en algunos conglomerados de células adheridas a la superficie de los frascos, pero, luego de los tres primeros subcultivos, no se volvió a observar. Este movimiento también se ha registrado en varios trabajos sobre establecimiento y caracterización de líneas celulares de insectos, tales como los efectuados por Inoue *et al.* (1991); Bello *et al.* (1999); Khurad *et al.* (2009); Echeverry *et al.* (2009); Wen *et al.* (2009); Pan *et al.* (2010) y Xu *et al.* (2010). Posiblemente, el movimiento rítmico es debido a la acción de proteínas

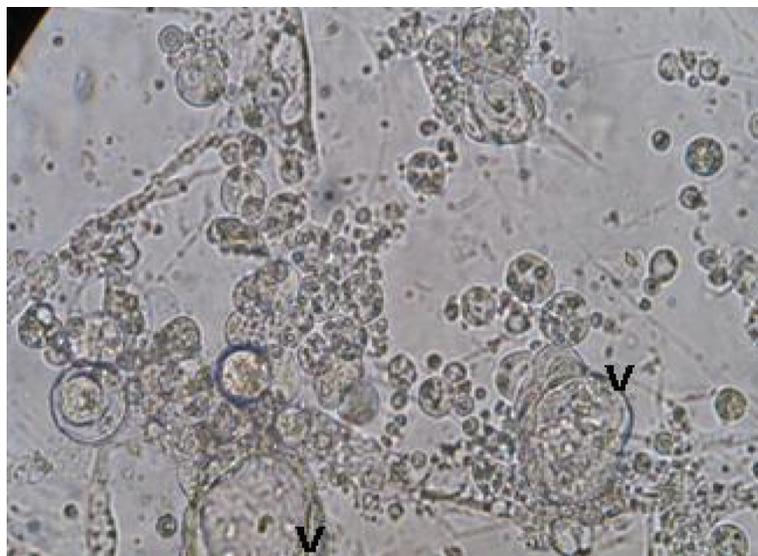


Figura 2. Vesículas observadas en los primeros días de cultivo en el medio Schneider (40X).

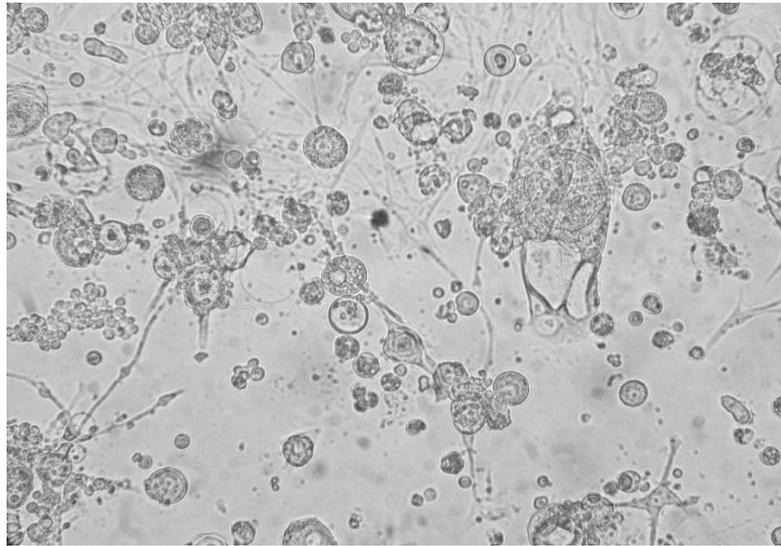


Figura 3. Morfología celular en los primeros días de cultivo en el medio Grace/L15 (20X).

contráctiles propias de células derivadas de tejido muscular (Segura *et al.* 2012). La pérdida del movimiento, a través del número de pases, puede ser consecuencia de un proceso de selección adaptativa de las células a las condiciones establecidas en el medio de cultivo (Takahashi *et al.* 1980; Khurad *et al.* 2009).

**Morfología celular.** La forma de las células al inicio de los cultivos celulares primarios fue heterogénea: esféricas pequeñas, alargadas discontinuas y gigantes irregulares (Figura 3). No obstante, a los pocos días del crecimiento celular, se configuraron mayoritariamente las formas alargadas fibroblastoides y, en menor proporción, las epitelioideas, similar a lo registrado por Li *et al.* (2012) y Zhang *et al.* (2012), pero ya constituida la monocapa las formas fibroblastoides fueron prácticamente las únicas registradas. En los primeros subcultivos, se observaron en las células finos filamentos o prolongaciones citoplasmáticas que, algunas veces, formaron redes de apariencia similar a las células nerviosas. Esta situación es concordante con la descripción registrada por Echeverry *et al.* (2009) en los cultivos celulares primarios de *L. sericata*. La presencia de grupos con morfologías celular diferente en los cultivos celulares primarios, se debe, posiblemente, a los diversos tipos de tejidos disponibles en los huevos embrionados utilizados en los explantes (Rey *et al.* 2000; Miranda *et al.* 2008; Ardila *et al.* 2005).

En conclusión, se obtuvieron cultivos celulares primarios a partir de tejido embrionarios de *S magellanica*, en los medios L-15, Grace/L15 y Schneider; sin embargo, los mejores resultados se lograron en los dos últimos medios.

Se estableció la tipificación del cultivo, mediante el patrón de crecimiento y las características morfológicas de las células hasta el desarrollo exitoso de monocapas confluentes, con lento crecimiento posterior, a través de los subcultivos. Estos sustratos celulares, se consideran una herramienta importante por sus aplicaciones potenciales en los campos biotecnológicos y biomédicos, incluyendo inmunología, endocrinología, toxicología, bioquímica y parasitología. De forma inicial, se usarán en ensayos de susceptibilidad a infecciones con arbovirus y también como sustratos para el desarrollo del ciclo biológico de algunos parásitos, principalmente, del género *Leishmania* (Côrtes *et al.* 2011).

**Agradecimientos:** A Colciencias, por la cofinanciación de la joven investigadora y a la Universidad del Rosario, Fondo de Investigaciones (FIUR), por la financiación del presente trabajo. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ARDILA, A.; ESCOVAR, J.; BELLO, F. 2005. Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biomédica* (Colombia). 25(1):65-75.
2. BELLO, F.; RODRÍGUEZ, J.; MORALES, A.; OLANO, V. 1999. Estudio de cultivos celulares primarios

- de *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae). *Biomédica* (Colombia). 19(2):127-135.
3. BELLO, F.; RODRÍGUEZ, J.; ESCOVAR, J.; OLANO, V.; MORALES, A.; GONZÁLEZ, M.; REY, G. 2001. A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infections with some arboviruses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Brasil). 96(6):865-873.
  4. CHARPENTIER, G.; BELLONCIK, S.; DUCROS, G.; FONTENILLE, D.; TIAN, L.; QUIOT, J. 1995. Establishment and characterization of three cell lines from *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*(Estados Unidos). 32(6):793-800.
  5. CÔRTEZ, L.; SILVA, R.; PEREIRA, B.; GUERRA, C.; ZAPATA, A.; BELLO, F.; FINKELSTEIN, L.; MADEIRA, M.; BRAZIL, R.; CÔRTE-REAL, S.; ALVES, C. 2011. Lulo cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction. *Parasit. Vectors* (Inglaterra). 4:216-220.
  6. ECHEVERRY, L.; ZAPATA, A.; SEGURA, A.; BELLO, F. 2009. Estudio de cultivos celulares primarios derivados de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Cienc. Salud* (Colombia). 7(3):17-28.
  7. FERREIRA, M.J.M.; BARBOLA, I.F. 1998. Sinantropía de Califorídeos (Insecta, Diptera) de Curitiba, Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Biol* 58 (2): 203-209.
  8. FIGUEROA, L.; FLORES, J.; RODRÍGUEZ, S. 2007. Método de cultivo de larvas de *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol. Latinoam.* (Chile). 62:79-82.
  9. FÖRSTER, M.; KLIMPEL, S.; MEHLHORN, H.; SIEVERT, K.; MESSLER, S.; PFEFFER, K. 2007. Pilot study on synanthropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fannia*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms. *Parasitol Res.* 101:243-246.
  10. GOODMAN, C.L.; STANLEY, D.; RINGBAUER, J.A. Jr.; BEEMAN, R.W.; SILVER, K.; PARK, Y. 2012. A cell line derived from the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* PMID: 22752637 [Epub ahead of print].
  11. GRACE, T. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* (Inglaterra). 195:788-789.
  12. GRASELA, J.; MCINTOSH, A.; RINGBAUER, J.; JR, GOODMAN, C.; CARPENTER, J.; POPHAM, H. 2012. Development of cell lines from the cactophagous insect: *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) and their susceptibility to three baculoviruses. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* (Alemania). 48(5):293-300.
  13. HARRISON, R.; LYNN, D. 2008. New cell lines derived from black cutworm, *Agrotis ipsilon*, that support replication of the *A. ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus and several group I nucleopolyhedroviruses. *J. Invertebr Pathol* (Estados Unidos). 99(1):28-34.
  14. HINK, W.; THOMSEN, D.; DAVIDSON, D.; MEYER, A.; CASTELLINO, F. 1991. Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines. *Biotech. Prog.* (Estados Unidos). 7(1):9-14.
  15. HOSHINO, K.; HIROSE, M.; IWABUCHI, K. 2009. A new insect cell line from the longicorn beetle *Plagionotus christophi* (Coleoptera: Cerambycidae). *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 45(1-2):19-22.
  16. IKONOMOU, L.; BASTIN, G.; SCHNEIDER, Y.; AGATHOS, S. 2001. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 37(9):549-559.
  17. INOUE, H.; KOBAYASHI, J.; KAWAKITA, H.; MIYAZAKI, J.; HIRABAYASHI, T. 1991. Insect muscle cell line forms contractile tissue networks *In vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A(11):837-840.
  18. IWANAGA, M.; ARAI, R.; SHIBANO, Y.; KAWASAKI, H.; IMANISHI, S. 2009. Establishment and characterization of the *Bombyx mandarina* cell line. *J. Invertebr. Pathol.* 101(2):124-129.
  19. KHARAT, K.; SAWANT, M.; PETER, S.; HARDIKAR, B. 2010. Development and characterization of new cell line BPH22 from midgut epithelial cells of *Poeciloceris pictus* (Fabricius, 1775). *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 46(10):824-827.
  20. KHURAD, A.; ZHANG, M.; DESHMUKH, C.; BAHEKAR, R.; TIPLE, A.; ZHANG, C. 2009. A new continuous

- cell line from larval ovaries of silkworm, *Bombyx mori*. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 45(8):414-419.
21. LE DOUARIN, N. 1971. Organ culture methods. En: Vago, C. (ed.) Invertebrate tissue culture. Volume I. Nueva York: Academic Press. p.41-114.
  22. LI, X.; QIN, Q.; ZHANG, N.; ZHU, W.; ZHANG, J.; WANG, H.; MIAO, L.; ZHANG, H. 2012. A new insect cell line from pupal ovary of *Spodoptera exigua* established by stimulation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 48(5):271-275.
  23. LYNN, D. 2002. Methods for maintaining insect cell cultures. J. Insect. Sci. (Estados Unidos). 2(9):1-6.
  24. LYNN, D. 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. In vitro Cell Dev. Biol. 37(6):319-321.
  25. LYNN, D. 2007. Available lepidopteran insect cell lines. In: Murhamme D. (ed.) Methods in molecular biology: baculoviruses and insect cell expression protocols, vol. 338 2<sup>nd</sup> ed. Humana, Totowa, New Jersey. p.117-137.
  26. MARILUIS, J.; MULIERI, P. 2003. The distribution of the Calliphoridae in Argentina (Diptera). Rev. Soc. Entomol. Argent. 62(1):85-97.
  27. MARILUIS, J.; SCHNACK, J. 1996. Elenco específico y aspectos ecológicos de Calliphoridae (Insecta, Diptera) de San Carlos de Bariloche, Argentina. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Secc. Biol. 92(1-4):203-213.
  28. MARTÍNEZ, E.; DUQUE, P.; WOLFF, M. 2007. Succession pattern of carrion-feeding insects in Paramo, Colombia. Forensic Sci. Int. (Irlanda).166(2-3):182-189.
  29. MENA, J.A.; KAMEN, A.A. 2011. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. Expert Rev Vaccines. 10(7):1063-1081.
  30. MIRANDA, A.; SARMIENTO, L.; CALDAS, M.; ZAPATA, C.; BELLO, F. 2008. Morfología y citoquímica de cultivos celulares de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y susceptibilidad a *Leishmania panamensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Rev. Biol. Trop. (Costa Rica). 56(2):447-458.
  31. MITSUHASHI, J.; MARAMOROSH, K. 1964. Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. Contrib Boyce Thompson Inst (Estados Unidos). 22:435-460.
  32. OELOFSEN, M.; GERICKE, A.; SMITH, M.; VAN DER LINDE, T. 1990. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex (Culex) theileri* (Diptera: Culidae) and its susceptibility to infection with arbovirus. J. Med. Ent. (Estados Unidos). 27(6):939-944.
  33. MONTOYA, A.; SANCHEZ, J.; WOLFF, M. 2009. Sinantropía de Calliphoridae (Diptera) del Municipio La Pintada, Antioquia – Colombia. Rev. Colomb. Entomol. 35(1):73-82.
  34. PAN, M.; CAI, X.; LIU, M.; LV, J.; TANG, H.; TAN, J.; LU, C. 2010. Establishment and characterization of an ovarian cell line of the silkworm. *Bombyx mori*. Tissue cell. (Estados Unidos). 42(1):42-46.
  35. PAPE, T.; WOLFF, M.; AMAT, E. 2004. Los Califóridos, Éstridos, Rinofóridos y Sarcófáridos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. Biota Colomb. 5(2): 201-208.
  36. PINILLA, Y.; SEGURA, A.; BELLO, F. 2012. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in Bogotá, Colombia. Neotrop Entomol (Brasil). 41(3):237-242.
  37. REY, G.; FERRO, C.; BELLO, F. 2000. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Brasil). 95(1):103-110.
  38. SEGURA, N.; USAQUÉN, W.; SÁNCHEZ, M.; CHUAIRE, L.; BELLO, F. 2009. Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia. Forensic Sci. Int. (Irlanda). 187(1-3):66-72.
  39. SEGURA, N.; SANTAMARÍA, E.; CABRERA, O.; BELLO, F. 2012. Establishment and characterisation of a new cell line derived from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 107(1):89-95.
  40. STEVENS, J.R. 2003. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). Int. J. Parasitol. 33:1105-1113.

41. SUDDEP, A.; KHUSHIRAMANI, R.; ATHAWALE, S.; MISHRA, A.; MOURYA, D. 2005. Characterization of a newly established potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller) cell line. *Indian J. Med. Res.* 121(3):159-163.
42. TAKAHASHI, M.; MITSUHASHI, J.; OHTAKI, T. 1980. Establishment of a cell line from embryonic tissues of the fleshfly, *Sarcophaga peregrine* (insect: Diptera). *Developm., Growth Differ. (Japón)*. 22(1):11-19.
43. VARMA, M.; PUDNEY, M. 1969. The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* (L) larvae in different media. *J. Med. Entomol. (Estados Unidos)*. 6(4):432-439.
44. VISCIARELLI, E.C.; GARCÍA, S.H.; SALOMÓN, C.; JOFRÉ, C.; COSTAMAGNA, S.R. 2003. Un caso de miasis humana por *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) asociado a pediculosis en Mendoza, Argentina. *Parasitol. Latinoam.* 58:166-168.
45. WEN, F.; ZHANG, Y.; QI, L.; ZHANG, H.; YANG, Z.; QIN, Q.; WANG, Y.; WANG, W. 2009. Two new cell lines originated from the embryos of *Clostera anachoreta* (Lepidoptera: Notodontidae): characterization and susceptibility to baculoviruses. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 45(8):409-413.
46. WU, C.; WANG, C. 2006. New cell lines from *Lymantria Xylina* (Lepidoptera: Lymantriidae): Characterization and susceptibility to baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* 93(3):186-191.
47. XU, F.; LYNN, D.; ROODE, E.; MUÑOZ, D.; VAN LENT, J.; VLAK, J.; VAN OERS, M. 2010. Establishment of a cell line from *Chrysodeixis chalcites* permissive for *Chrysodeixis chalcites* and *Trichoplusia ni* nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 105(1):56-62.
48. ZAPATA, A.; CÁRDENAS, E.; BELLO, F. 2005. Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) and their susceptibility to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Med. Sci. Monit. (Estados Unidos)*. 11(12):457-464.
49. ZHANG, X.; FENG, Y.; DING, W.; CHEN, X.; WANG, C.; MA, T. 2011. Establishment and characterization of an embryonic cell line from *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 47(4):327-332.
50. ZHANG, X.; FENG, Y.; DING, W.; CHEN, X.; WANG, C.; MA, T. 2012. Characterization of a new insect cell line that is derived from the neonate larvae of *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae) and its susceptibility to AcNPV. *Tissue Cell. (Inglaterra)*. 44(3):137-142.

Recibido: Febrero 15 de 2012

Aceptado: Agosto 21 de 2012

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ACCESIONES DE ÑAME (*Dioscorea alata* L.) DE LA REGIÓN CARIBE COLOMBIANA

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF YAM (*Dioscorea alata* L.) ACCESSIONS FROM THE COLOMBIAN CARIBBEAN REGION

Hernando Rivera-Jiménez<sup>1</sup>, Andrés Álvarez<sup>2</sup>, Juan Palacio-Mejía<sup>3</sup>, Alba Ochoa<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Universidad de Córdoba. Colombia. autor para correspondencia: hriveraj@gmail.com, hernandorivera@sinu.unicordoba.edu.co - Ciudad Universitaria Carrera 6 No. 76-103 Código Postal 354. Montería - Córdoba, Colombia; <sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Universidad de Córdoba. M.Sc. Montería - Córdoba, Colombia. andresalvarez864@hotmail.com; <sup>3</sup> Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Estudiante de doctorado The University of Texas at Austin, jdpalacio@utexas.edu, EUA; <sup>4</sup> Tecnólogo Agrícola. Universidad de Córdoba. Colombia.

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 323 - 330, 2012

### RESUMEN

El ñame (*Dioscorea* spp.) hace parte esencial de la dieta de la Costa Norte colombiana, donde es cultivado, llegando, incluso, a ser parte de su identidad cultural. Como estrategia para la conservación, el conocimiento y el uso de esta agrobiodiversidad, la Universidad de Córdoba ha logrado consolidar una colección de germoplasma de ñame, dentro de la que se destacan 14 accesiones de la especie *Dioscorea alata* L., la especie más representativa de la colección. El conocimiento de esta colección comenzó con una caracterización morfológica, que es ahora complementada con la presente caracterización molecular. El objetivo de esta investigación fue evaluar la variabilidad genética de *D. alata* y cómo se relaciona con la caracterización morfológica, previamente realizada, utilizando para ello los marcadores moleculares AFLP. Los datos fueron analizados mediante los métodos de agrupación de análisis correspondencia múltiple y análisis de similitud de Dice, estableciendo los niveles de confiabilidad de los grupos genéticos formados mediante remuestreos. La variabilidad genética de las 14 accesiones de ñame fue alta, permitiendo diferenciar cuatro grupos y dos sub-grupos, mediante un patrón de organización estructural bien definido, con una asociación de caracteres moleculares, botánicos y morfológicos, al interior de cada grupo.

Palabras clave: Ñame, germoplasma, variabilidad genética, recursos fitogenéticos, AFLP.

### SUMMARY

Yam (*Dioscorea* Spp) is an essential part of the diet of the Colombian North Coast, where it is cultivated, even becoming part of their cultural identity. As a strategy to enhance the conservation, use and knowledge of its agrobiodiversity, the University of Cordoba has established a germplasm collection of yam, which stores 14 accessions of the species *Dioscorea alata*, the most representative of the collection. The goal of this study was to evaluate the genetic variability of the collection and its relationship to the morphological characterization previously performed, using AFLP molecular markers. The data were analyzed by clustering methods of multiple correspondence analysis and Dice similarity, establishing levels of reliability of genetic groups by resampling. The genetic variability of the 14 yam accessions was high, allowing to-differentiate four groups and two sub-groups through a pattern of well-defined organizational structure with a combination of molecular data, botanical and morphological characteristics.

Key words: Yam, germplasm, genetic variability, plant genetic resources, AFLP.

### INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp.) es un alimento de importancia económica para los habitantes del Oeste de África, de Asia, del Lejano Oriente, del Pacífico y del Caribe (Obidiegwu *et al.* 2009). El ñame es un rizoma de amplia distribución en la

región Caribe colombiana, siendo *D. alata*, la especie más ampliamente distribuida, debido a su potencial productivo. A pesar de la importancia de *D. alata* en la dieta de miles de personas en la región Caribe y su participación en la economía regional (Álvarez, 2000), varios cultivares presentan susceptibilidad a plagas y enfermedades, en especial, a la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Estos problemas crean la necesidad de desarrollar variedades mejoradas que combinan altos rendimientos, tolerancia a la antracnosis y de buena aceptación en el mercado (Campo *et al.* 2009).

La Universidad de Córdoba tiene en su colección accesiones caracterizadas morfológicamente y evaluadas agrónomicamente, de interés directo para los agricultores. Complementando estas con caracterización molecular, se puede obtener una información sobre la diversidad del germoplasma, para ser utilizado por los fitomejoradores, además, se proporciona datos útiles para la selección de progenitores de la población básica y es aplicada, frecuentemente, como una herramienta para estimar variabilidad genética en una especie (Bonin *et al.* 2007).

La accesiones de ñame conservadas en el banco de germoplasma de la Universidad de Córdoba presenta una amplia diversidad genética, tanto a nivel inter como intra-específico (Rivera *et al.* 2011). Los intentos de caracterizar el ñame empleando marcadores morfológicos (Hamon & Touré, 1990b) e isoenzimáticos (Hamon & Touré, 1990a; Dansi *et al.* 2000), no han revelado resultados concluyentes, debido a su alto grado de variabilidad (Tamiru *et al.* 2007). Estudios de diversidad mostraron diferencias, tanto en especies de ñame de origen silvestre como cultivadas en

el sur de Etiopia y especies cultivadas en África occidental, como *D. alata* L., *D. bulbifera* L., *D. cayenensis* L. y *D. rotundata* Poir (Tamiru *et al.* 2007). La utilización de marcadores moleculares, como la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Vos *et al.* 1995), se ha utilizado en ñame para estudios taxonómicos, filogenéticos y de diversidad genética (Ramser *et al.* 1997; Mignouna *et al.* 1998; Dansi *et al.* 2000; Rivera *et al.* 2011).

El objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad genética de 14 accesiones de ñame de la colección de germoplasma de la Universidad de Córdoba, mediante la técnica de marcadores AFLP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención del ADN, se colectó tejido foliar de 14 accesiones de *D. alata*, pertenecientes a la colección de germoplasma de ñame de la Universidad de Córdoba (Tabla 1), las cuales, fueron colectadas en los departamentos de Córdoba, de Sucre, de Bolívar y del Magdalena (Colombia). El tejido foliar, se almacenó en bolsas plásticas de cierre hermético, con 50g de sílica gel, suficientes para mantener la estabilidad del ADN, de hasta 5g de tejido. Posteriormente, el tejido se maceró con nitrógeno líquido y se almacenó, a una temperatura de -196°C.

La caracterización molecular, se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". Para la extracción del ADN, se tomó tejido foliar de las diferentes accesiones maceradas con nitrógeno líquido. La extracción de ADN, se realizó utilizando el kit comercial de Qiagen®

Tabla 1. Listado de accesiones de ñame *Dioscorea alata* L. estudiadas.

Código	Nombre común	Departamento
0406- 002	Ñame pepita	Córdoba
9502- 005	Osito	Sucre
0406- 008	Ñame peludo	Córdoba
0406- 009	Mampuján	Córdoba
9506- 022	Pico de botella	Córdoba
9506- 027	Diamantes	Córdoba
0406- 037	Mampuján	Córdoba
9605- 054	Ñame seda	Magdalena
0406- 062	Manteco	Córdoba
0406- 094	Mampuján	Córdoba
0406- 098	Mampuján	Córdoba
0406- 100	Ecuatoriano	Córdoba
0406- 130	Te encontré	Bolívar
0504- 140	Coco	Córdoba

2006, modificando condiciones, como la reducción de la temperatura de incubación a 60°C y tiempo de centrifugado, a 5min. La concentración de ADN, se determinó mediante el uso del marcador de peso de ADN Lambda 20-bp., mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizados en luz UV. Finalmente, las extracciones fueron diluidas en buffer TE, obteniendo una concentración final de 50ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , por muestra.

**Marcadores AFLP y amplificación por PCR:** El ADN aislado de cada una de las accesiones, se sometió a digestión previa con enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*, de acuerdo a las instrucciones del kits comercial de Invitrogen, 2003 (Life Technologies®); posteriormente, fueron adicionados dos adaptadores a los fragmentos de ADN generados en el proceso de restricción, para ser amplificados mediante el uso de PCR (Polymerase Chain Reaction). Se utilizaron cebadores complementarios a la secuencia de los adaptadores, se hizo una preamplificación +1/+1 con nucleótidos adicionales; los fragmentos de ADN se amplificaron, a partir de los fragmentos generados en la reacción de digestión de cada una de las muestras en estudio (Tabla 2). Para la amplificación selectiva +3/+3 nucleótidos, se evaluaron, inicialmente, cinco genotipos de ñame, tomados al azar, con seis combinaciones de cebadores, reportados por Tamiru *et al.* (2007), para seleccionar las tres combinaciones más polimórficas y de mayor resolución, que serían usados para evaluar todos los genotipos de ñame.

El programa de PCR para el inicio del ciclo +3/+3 fue el siguiente: un ciclo a 94°C, por 30s; 65°C, por 30s y 72°C, por 60s; se bajó la temperatura de apareamiento 0,7°C en cada ciclo, durante 12 ciclos y se realizaron 23 ciclos así (tiempo total: 2h, 2min): 94°C, por 30s, 56°C, por 30s y 72°C, por 60s; el producto amplificado, se almacenó, finalmente, a 4°C. Las reacciones de amplificación fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata, de donde se capturó la distribución de los *loci*.

Para el análisis de datos, debido a la naturaleza dominante de los marcadores AFLP, se construyeron matrices binarias originadas en la amplificación de los fragmentos digeridos. Con la matriz de datos, se calculó el índice de similitud de Dice, adaptado por Nei & Li (1979), para datos moleculares. El índice promedia los valores de similitud por par de individuos, mediante la siguiente ecuación:  $S_{ij} = 2a / (2a+b+c)$ ; donde,  $S_{ij}$  = similitud entre los individuos  $i$  y  $j$ ;  $a$  = número de loci compartidos por  $i$  y  $j$ ;  $b$  = número de loci presentes en  $i$ , pero ausentes en  $j$ , y,  $c$  = número de loci presentes en  $j$ , pero ausentes en  $i$ . Las matrices y los dendrogramas de similitud, se construyeron con el programa NTSYS-PC, versión 2.02i (Rohlf, 1998), mediante el método UPGMA y el agrupamiento SAHN, respectivamente. También, se analizaron las relaciones entre individuos, mediante el Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) con toda la población, para obtener una representación gráfica de la distancia entre las accesiones. Para estimar la confiabilidad de los grupos genéticos designado en los dendrogramas,

Tabla 2. Secuencia de enzimas, oligonucleótidos adaptadores y cebadores utilizados en AFLP.

Nombre	Código	Secuencia
<i>EcoRI</i>		G AATTC
<i>MseI</i>		T TAA
Adaptador <i>EcoRI</i>		5´-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3´ 3´-CC ATG CGT CAG ATG CTC-5´
Adaptador <i>MseI</i>		5´-TAC TCA GGA CTC AT-3´ 3´-G AGT CCT GAG TAG GAG-5´
Cebador <i>EcoRI</i>	E-A00	5´-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C A-3´
Cebador <i>MseI</i>	M-C00	5´-GAT GAG TCC TGA GTA A C-3´
<i>EcoRI</i> + 3-ACA	E-ACA	5´-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C ACA-3´
<i>EcoRI</i> + 3-AAC	E-AAC	5´-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C AAC-3´
<i>EcoRI</i> + 3-AAG	E-AAG	5´-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C AAG-3´
<i>MseI</i> + 3-CAT	M-CAT	5´-GAT GAG TCC TGA GTA A CAT-3´
<i>MseI</i> + 3-CAC	M-CAC	5´-GAT GAG TCC TGA GTA A CAC-3´
<i>MseI</i> + 3-CTC	M-CTC	5´-GAT GAG TCC TGA GTA A CTC-3´

se realizó la confirmación del análisis de conglomerados y de los grupos de diversidad, mediante remuestreo de 1000 permutaciones, para lo cual, se utilizó el software WINBOOT (Yap & Nelson, 1996).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las combinaciones de cebadores empleados en esta investigación presentaron patrones altamente polimórficos entre las accesiones, mostrando así perfiles de loci diferentes, garantizando un buen poder de discriminación, que permitió la identificación de grupos genéticos disímiles dentro de la especie *D. alata*. El número total de loci, que se obtuvo en todo el estudio, fue de 184, que se extendieron en un rango de 68 loci, para la combinación del cebador E-AAC/M-CAC, hasta 53 loci, para la combinación del cebador E-ACA/M-CAT, con un promedio de 61,33 loci, por par de cebadores. La combinación del cebador E-AAG/M-CTC (Figura 1), que se utilizó en el presente trabajo, muestra porcentajes de fragmentos polimórficos de 95,23%, muy similar a la reportada por Tamiru *et al.* (2007); la combinación del cebador E-AAC/M-CAC y E-ACA/M-CAT presentaron un porcentaje polimorfismo, de 77,94% y 62,26% (Tabla 3), respectivamente. Estos porcentajes son diferentes a los reportados por Tamiru *et al.* 2007, quien reportó porcentajes polimórficos para estas mismas combinaciones de cebadores, de 98,7 y 100%, respectivamente. Lo antes anotado, evidencia que el marcador es lo suficientemente sensible, para mostrar diferencias entre las accesiones estudiadas.

El análisis de correspondencia múltiple (ACM) estimó la variación de los individuos en tres dimensiones (ejes x, y, z) (Figura 2), mostrando un patrón de información similar a la obtenida en el dendrograma de similitud; las muestras que se encuentran más alejadas en cada coordenada, se deben separar como muestras diferenciadas genéticamente, en tanto que aquellas que se agrupan, se deben considerar muy cercanas, desde el punto de vista genético.

El estudio muestra cuatro grupos principales con cierto grado de variabilidad genética. El grupo 1 está conformado por ocho genotipos colectados en el departamento de Córdoba y uno colectado en el departamento de Bolívar. Se separa de las demás accesiones un primer sub-grupo, representado por los genotipos 9506-027 y 0406-100 (Figura 3-A), caracterizado por presentar flores masculinas y presencia en el tallo alas de color verde, rizomas subterráneos de color de pulpa blanca; este grupo presenta un valor promedio de 0,976 de similaridad. Un segundo subgrupo conformado por los genotipos 0406-002, 0406-009, 0406-037, 0406-098, 0406-062, 0406-094 y 0406-130, representado con un valor promedio de 0,972 de similitud; se caracteriza por presentar floración femenina, tallo cuadrado y presentar alas muy pequeñas de color morado, material completamente rústico y crecimiento vigoroso. Las hojas presentaron ápice agudo y sus flores son de color amarilla, simples en forma de racimo; los rizomas mostraron forma irregular, vellosidad y muchas raíces de fijación.

En la región Caribe, el ñame es muy conocido con diferentes nombres vulgares, entre los cuales, están 0406-002 (Ñame

Tabla 3. Polimorfismo detectado en las accesiones de *Dioscorea alata* L., con diversas combinaciones de cebadores AFLP.

Combinación de Cebadores	No. de loci †			% de Polimorfismo ¥
	Total	P	M	
E-ACA/M-CAT	53	33	20	62,26
E-AAC/M-CAC	68	53	15	77,94
E-AAG/M-CTC	63	60	4	95,23
Total	184	146	39	78,47§
Promedio	61,33	48,66	13	

† P es Polimórfico y M es Monomórfico.

¥ Determinado en base del número de loci polimórficos fuera del número total de loci amplificadas por una combinación de cebadores, a través de todas las variedades.

§ Polimorfismo promedio.

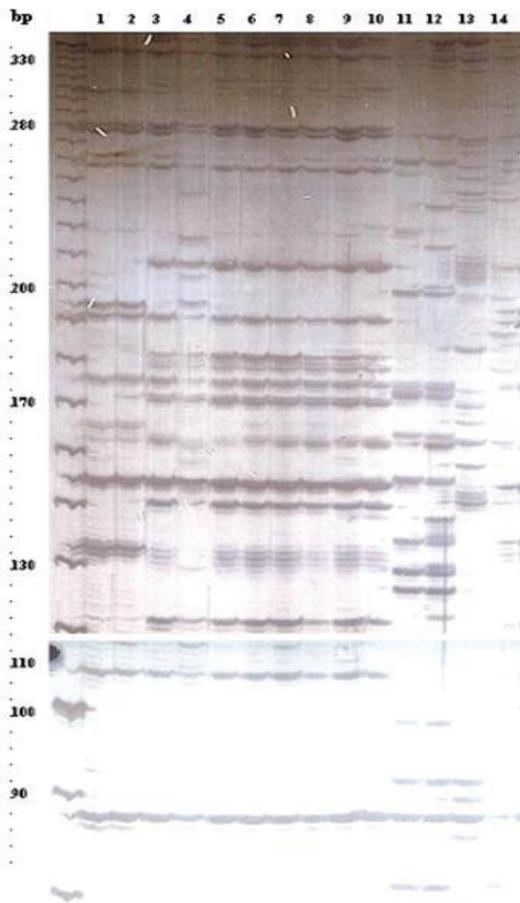


Figura 1. AFLP generado por la combinación de pares de cebadores E-AAG/M-CTC de accesiones de *Dioscorea alata* L. En la banda izquierda, se marca el peso molecular obtenido con marcadores de referencia.

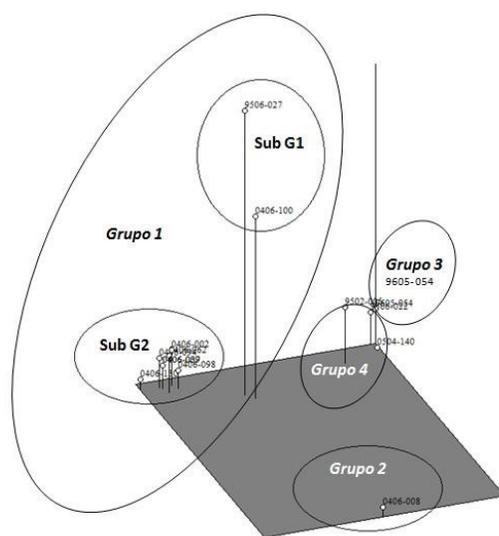


Figura 2. Representación espacial de la estructura genética de 20 accesiones de *Dioscorea* spp. utilizando marcadores AFLP, elaborado mediante un análisis de correspondencia múltiple (ACM).

pepita), 0406-009, 0406-037 y 0406-094 (Mampuján), 0406-062 (Ñame manteco) y el 0406-130 (Te encontré). De acuerdo a los resultados mostrados por el análisis de agrupamiento (UPGMA (Figura 3-A), utilizando la combinación de cebadores E-ACA/M-CAT, muestra que las accesiones 0406-009, 0406-037 es el mismo genotipo, lo cual, es comprobado por tener un coeficiente de similitud, lo que implica que estas dos accesiones son clones, al compartir la misma información genética. Esto se evidencia, debido a las semejanzas morfológicas, como la coloración verde y morado en el tallo, las hojas simples de forma acorazonada y ápice agudo, las flores de color amarillas, simples y compuestas, en forma de racimo, rizomas de gran tamaño con vellosidad. Estas accesiones poseen resistencia a antracnosis (Campo *et al.* 2009).

El grupo 2 conformado por la accesión 0406-008 (Ñame peludo), colectado en el departamento de Córdoba (Colombia), presentó un coeficiente promedio de similitud de 0,82. Tiene como característica principal la forma cuadrada del tallo, su color es verde con pigmentos marrón, presentó alas muy pequeñas, que son pliegues que se encuentran localizadas a lo largo del tallo, su crecimiento es indeterminado y alcanza de cuatro a seis metros de largo; presenta enrollamiento de forma dextral, es decir, en sentido de las manecillas del reloj. Las hojas son de forma larga y ancha (sagitada) y lobulado poco profundo, separado ápice muy agudo. Sus flores son femeninas, los rizomas son ramificados, la pulpa es de color blanca y textura lisa, el rizoma posee vellosidad y raíces de fijación de color marrón oscuro, su forma es irregular, también posee tubérculos aéreos, de forma redonda.

El grupo 3 (Figura 3-A), conformado por la accesión 9605-054 (Ñame seda), colectado en el departamento de Magdalena (Colombia), presenta un coeficiente alto de

similitud de 0,871. Como característica principal de esta accesión presentó ausencia de bulbillos aéreos y ausencia de raíces secundarias en los rizomas, también precocidad y espinas en la base de los tallos jóvenes. El grupo 4 (Figura 3-A), conformado por las accesiones 9502-005, colectado en el departamento de Sucre (Colombia) y la accesión 9506-022 y 0504-140, colectado en el departamento de Córdoba (Colombia), con un coeficiente de similitud de 0,92, se encuentran compartiendo las características de formación de bulbillos aéreos y presencia de raíces secundarias en los rizomas; estas accesiones muestran resistencia al hongo *C. gloeosporioides* (Campo *et al.* 2009). Estas relaciones se ven soportadas por el análisis de conglomerados (Figura 3-B) de los valores de confianza de la matriz de distancia que fue de 99,8%, para la relación entre el primer y el segundo grupo, para el tercer y el grupo cuatro, con un 87,6% de confiabilidad.

No se presentó correspondencia geográfica entre cultivares procedente del departamento de Córdoba, de Sucre, de Bolívar y del Magdalena y las relaciones de similitud de las accesiones, indicando que estos materiales que son introducidos han sido ampliamente distribuidos e intercambiados por productores en todo el Caribe. Estos resultados son consistentes con los reportados por Sonibare *et al.* (2010), encontrando tres grupos genéticos de *D. dumetorum*, en varios países de África Central y Occidental, donde estas accesiones no siguen de manera estricta una correlación entre la variabilidad genética observada y la distribución geográfica de colecta. Esto es atribuible a la dispersión biológica o a las actividades humanas, que conducen a intercambio de germoplasma entre los agricultores, a través de los diferentes lugares donde se toman las muestras (Scarcelli *et al.* 2006); de igual forma, Obidiegwu *et al.* (2009) encontraron resultado similares en *D. alata*, concluyendo que el alto grado del intercambio y

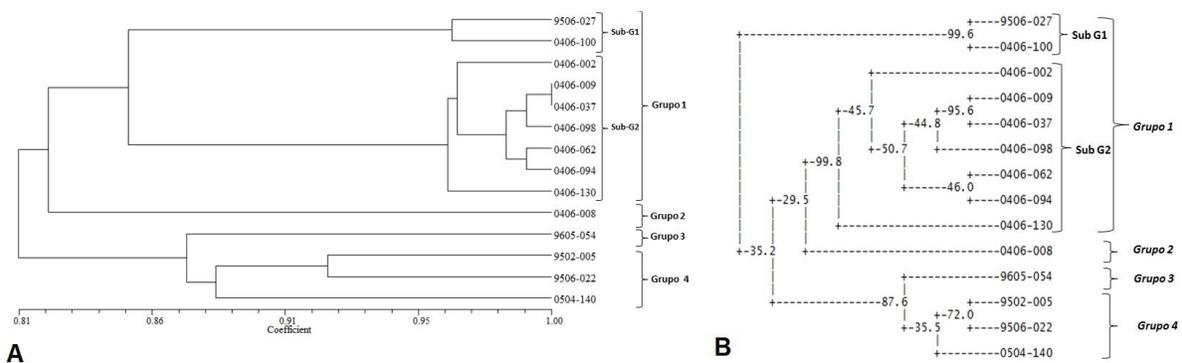


Figura 3. (A)- Dendrograma de índice de similitud de accesiones de *Dioscorea alata* L., mediante el coeficiente de Dice, (B)- Dendrograma de similitud sobre la base de los 184 marcadores AFLP, generados con tres combinaciones de pares de iniciadores.

de transferencia de cultivares, por parte de los agricultores locales, inciden en la no correlación entre la variabilidad genética y la distribución geográfica.

En este estudio, se reveló una importante variación genética dentro de la especie *D. alata* en la región Caribe colombiana, mediante la utilización de la técnica AFLP; esta técnica tiene la suficiente sensibilidad para detectar polimorfismo intraespecífico, en *D. alata* (Petro *et al.* 2011). Estos resultados son coincidentes con los manifestados por Rivera *et al.* (2011), quienes reportaron alta variabilidad genética, mediante un patrón de organización estructural bien definido en *D. alata* y una correspondencia entre la caracterización molecular y la morfológica previa, consistente en la asociación de caracteres botánicos y morfológicos. Los niveles de variabilidad entre grupos taxonómicos en *Dioscorea* spp., también ha sido estudiada por Lebot *et al.* (1998), quienes indican la distinción de cultivares de *D. alata*, distribuidos en Asia, en África y en Melanesia. Malapa *et al.* (2005) revelaron que *D. alata*, es una especie heterogénea, encontrando diferencias en tres grupos principales de genotipos dentro de *D. alata* y con diferentes niveles de ploidía, mediante la utilización de marcadores AFLP. El nivel relativamente alto de la variación genética mostrada por estas accesiones podría ser atribuible a la adaptación a diferentes condiciones ambientales locales (Scarcelli *et al.* 2006).

Los cuatro grupos genéticos comparten características, como forma de crecimiento, presencia o ausencia de alas y espinas en tallos, forma, color de hojas y rizomas, además, se presenta agrupación de algunas accesiones, como los genotipos 0406-002, 0406-009 y 0406-037, que presentaron una característica importante de resistencia a antracnosis; este resultado tiene gran importancia agronómica, ya que dichas accesiones se pueden tener en cuenta para futuros trabajo de fitomejoramiento, que generen cultivares mejorados resistentes al hongo *C. gloeosporioides* (Campo *et al.* 2009). Esta información generada puede ser de gran utilidad para la conservación de la especie y para realizar estrategias de colecta, que permitan ampliar la colección de germoplasma.

**Recomendaciones:** Es importante para futuras investigaciones trabajar con marcadores codominantes o marcadores de polimorfismo funcional EST-SSRs y SNPs, que permitan identificar accesiones promisorias, contrastantes y fértiles, que contribuyan para el desarrollo de estrategias, mediante hibridaciones en futuros programas de fitomejoramiento.

**Agradecimientos:** Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Córdoba, por la financiación de esta investigación, a través del proyecto "Obtención de genotipos de ñame *Dioscorea alata* L., resistentes a la

antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y Sacc, en la Costa Norte colombiana", así como al personal del grupo técnico de producción de Ñame del programa de Ingeniería Agronómica y al personal del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". CIAT. Palmira, Valle del Cauca – Colombia. **Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses, que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ÁLVAREZ, A. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. En: Ñame, producción de semilla por biotecnología. Editorial Unibiblos Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p.33-39.
2. BONIN, A.; EHRICH, D.; MANEL, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*. 16:3737-3758.
3. CAMPO, R.; LUNA, J.M.; JIMÉNEZ, Y. 2009. Selección de genotipos de ñame *Dioscorea* spp., resistentes a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz). *Fitopat. Col.* 33(1):7-10.
4. DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHEKPON, J.; SANGARE, A.; ASIEDU, R.; AHOUSSOU, N. 2000. Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) of the Republic of Benin. *Genet. Resour. Crop Evol.* 47:371-383.
5. HAMON, P.; TOURÉ, B. 1990a. Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. *Euphytica*. 46:101-107.
6. HAMON, P.; TOURÉ, B. 1990b. The classification of cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata* complex) of West Africa. *Euphytica* 47:179-187.
7. LEBOT, V.; TRILLES, B.; NOYER, J.L.; MODESTO, J. 1998. Genetic relationships between *Dioscorea alata* L. cultivars. *Genet. Resour. Crop Evolut.* 45:499-508.
8. MALAPA, R.; ARNAU, G.; NOYER, J.L.; LEBOT, V. 2005. Genetic diversity of the greater yam (*Dioscorea alata* L.) and relatedness to *D. nummularia* Lam. and *D. transversa* Br. as revealed with AFLP markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 52:919-929.

9. MIGNOUNA, H.D.; ELLIS, N.T.H.; KNOX, M.R.; ASIEDU, R.; NG, Q.N. 1998. Analysis of genetic diversity in Guinea yams (*Dioscorea* spp.) using AFLP fingerprinting. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 75:224-229.
10. NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proc. Natl Acad. Sci. of the United States of America*. 76(10):5269-5273.
11. OBIDIEGWU, J.E.; ASIEDU, R.; ENE-OBONG, E.E.; MUONEKE, C.O.; KOLESNIKOVA-ALLEN, M. 2009. Genetic characterization of some water yam (*Dioscorea alata* L.) accessions in West Africa with simple sequence repeats. *J. Food, Agr. & Environm.* 7(3&4):634-638.
12. PETRO, D.; ONYEKA, T.J.; ETIENNE, S.; RÜBENS, S. 2011. An intraspecific genetic map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. *Euphytica*. 179:405-416.
13. RAMSER, J.; WEISING, K.; LÓPEZ-PERALTA, C.; TERHALLE, W.; TERAUCHI, R.; KAHL, G. 1997. Molecular marker based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata*-*D. cayenensis*). *Genome*. 40:903-915.
14. RIVERA-JIMÉNEZ, H.; ÁLVARES, A.; PALACIO, J.; BARRIOS, D.; LOPEZ, D. 2011. Diversidad genética intra e inter-específica de ñame (*Dioscorea* spp.) de la región Caribe colombiana mediante marcadores AFLP. *Acta Agr.* 60(4):328-338.
15. ROHLF, F. 1998. NTSYSpc. Numerical taxonomic and multivariate analysis system, vol 2.0, Exeter Software, Setauket, New York, USA.
16. SCARCELLI, N.; TOSTAIN, S.; MARIAC, C.; AGBANGLA, C.; DA, O.; BERTHAUD, J.; PHAM, J. 2006. Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). *Gen. Res. Crop Evol.* 53:121-130.
17. SONIBARE, M.A.; ASIEDU, R.; ALBACH, D.C. 2010. Genetic diversity of *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) and cpDNA. *Biochem. Syst. Ecol.* 38:320-334.
18. TAMIRU, M.; BECKER, H.; MAASS, B. 2007. Genetic diversity in yam germplasm from Ethiopia and their relatedness to the main cultivated *Dioscorea* species assessed by AFLP markers. *Crop Sci.* 47:1744-1753.
19. VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
20. YAP, I.V.; NELSON, R.J. 1996. WINBOOT: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limit of UPGMA based dendrograms. *IRRI Discussion Paper Ser. 14*. IRRI, Los Baños, Philippines.

Recibido: Agosto 25 de 2011

Aceptado: Junio 10 de 2012

# REQUERIMIENTOS HÍDRICOS DEL PLÁTANO DOMINICO-HARTÓN (*Musa AAB SIMMONDS*) EN LA REGIÓN SANTÁGUEDA (PALESTINA, CALDAS)

## HYDRIC REQUIREMENTS OF PLANTAIN DOMINICO-HARTON (*Musa AAB SIMMONDS*) IN THE SANTAGUEDA REGION (PALESTINA, CALDAS)

Ángela María Castaño<sup>1</sup>, Manuel Aristizábal<sup>2</sup>, Héctor González<sup>3</sup>

<sup>1</sup> I.A. Programa Agronomía. Universidad de Caldas. angelacpineda@hotmail.com; <sup>2</sup> I.A. M.Sc. Profesor catedrático. Maestría Fitopatología. Universidad de Caldas. hector.gonzalez\_o@ucaldas.edu.co; <sup>3</sup> I.A. M.Sc. Profesor Titular. Programa Agronomía. Universidad de Caldas. Calle 65 No. 26-10. Manizales, Caldas. manuel.aristizabal@ucaldas.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 331 - 338, 2012

### RESUMEN

El presente estudio, se desarrolló en la granja Montelindo, de la Universidad de Caldas, con el fin de establecer los requerimientos hídricos del cultivo del plátano, con base en el cálculo de la evapotranspiración de referencia, calculada por el método de Penman-Monteith y la evapotranspiración del cultivo, según el estado fenológico de la planta. Se sembraron plantas de plátano Dominico-Hartón, a 2m entre plantas y 3m, entre surcos y, oportunamente, se efectuaron las prácticas agronómicas necesarias. Al inicio del estudio, se determinaron la capacidad de campo, el punto de marchitez permanente y la lámina de agua aprovechable. Semanalmente, se hicieron registros de los elementos climáticos, el crecimiento de las plantas y la tensión de humedad del suelo, utilizando tensiómetros ubicados a 30,48cm y 45,72cm de profundidad. Se estableció que en la región Santágueda, las plantas de Dominico-Hartón, bajo condiciones adecuadas de cultivo, requieren 1.141mm de agua, durante un ciclo del cultivo; que el consumo de agua aumenta gradualmente a medida que el cultivo avanza en su desarrollo, siendo la floración la época de mayor uso de agua y la más crítica, en cuanto al déficit hídrico. También, se encontró que la altura de la planta, la emisión de hojas y el diámetro del pseudotallo tienen relación directa con la evapotranspiración del cultivo.

Palabras clave: Evapotranspiración, consumo de agua, crecimiento de la planta.

### SUMMARY

The present study was developed at the farm 'Montelindo' of the University of Caldas in order to establish the hydric requirements of the plantain crop, based on the evapotranspiration calculated by Penman-Monteith method and the crop evapotranspiration according to the phenological stage of the plant. Plants of Dominico-Hartón plantain were planted at 2m between plants and 3m between rows and the necessary agronomic practices were applied on time. At the beginning of the study the field capacity, the permanent wilting point and the usable water table were determined. Weekly, registers of climatic elements, plants growth and soil humidity tension with tensiometers located at 40, 48 and 45, 72 inches deep, were made. It was established that at the Santagueda region the Dominico-Hartón plants, under appropriated culture conditions, require 1.141mm of water during a culture cycle; that water consumption increases as the development of the crop advances, being the flowering period the time of highest water consumption and also the most critical one in relation to water deficit. It was also found that plant height, leaves emission and pseudostem diameter have a direct relation with crop evapotranspiration.

Key words: Evapotranspiration, water consumption, plant growth.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de plátano en Colombia es uno de los más importantes, por ser un producto básico en la alimentación y por generar empleo e ingresos para el país. En la zona cafetera central mantiene su posición, después del café,

siendo el Dominico-Hartón la culti-variedad más utilizada, por su adaptación al clima y por su preferencia en los mercados. Es importante identificar las interacciones entre la planta y el ambiente, especialmente, para establecer el potencial productivo de una zona o, simplemente, para optimizar el uso de los recursos, como el agua. Para este fin es necesario conocer las necesidades hídricas del cultivo (Morillo, 1999), que se definen como la cantidad de agua requerida para compensar la pérdida por evapotranspiración (Allen *et al.* 2006), que esta determinada por el clima, las características del cultivo y el manejo agronómico (Jaramillo, 2005).

El plátano, por la morfología de la planta e hidratación de sus tejidos, requiere abundante cantidad de agua disponible en el suelo, para que el crecimiento y el desarrollo ocurran normalmente (Belalcázar, 1991), ya que sus necesidades hídricas se deben a que tiene gran superficie foliar transpirante, siendo más exigente en agua que otras especies (Martínez, 1983). El plátano es sensible a la falta de agua durante todo su ciclo de vida, pero, particularmente, durante la primera parte del período vegetativo, así como durante la floración y la formación del racimo (Doorenbos & Kassam, 1980). No hay suficiente información experimental que muestre si bajo la distribución de las lluvias en la región Santáqueda, el plátano experimenta situaciones de déficit y de exceso de agua para su desarrollo.

Según Turner *et al.* (2007) no se sabe claramente la relación entre el consumo de agua y la productividad del banano; por su parte, Mahouachi (2008) estableció que el fruto ajusta su tasa de crecimiento al suministro de agua aprovechable por la planta; no obstante, Van Vosselen *et al.* (2005), al comparar dos métodos para calcular el consumo de agua por la planta de banano, establecieron que el modelo de simulación Suelo-Agua-Planta-Atmósfera tiende a subestimar la evapotranspiración real, además que requiere gran cantidad de datos; mientras que el método del balance de agua sigue siendo una opción útil para dicho propósito y requiere poca información. Por tales razones, se llevó a cabo el presente estudio, con el objetivo de calcular los requerimientos hídricos del plátano Dominico Hartón, determinando la Evapotranspiración de Referencia (ET<sub>o</sub>), por el método de Penman-Monteith y la Evapotranspiración del Cultivo (ET<sub>c</sub>), según el estado fenológico de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio, se llevó a cabo en la granja Montelindo, de la Universidad de Caldas, ubicada en Palestina (Caldas), a 5° 4' N, 75° 40' W, 1026 msnm, temperatura media de 22,5°C, máxima de 29,7°C y mínima de 17,6 °C, humedad relativa del 76%, precipitación anual de 2100mm, brillo solar de 1996 horas/año y suelos de origen volcánico, *Typic Dystrandept*.

Para este estudio, se sembraron 160 plantas, con distancia de 2,0 m entre plantas y 3 m entre surcos. A partir de las 8 semanas, después de siembra, se comenzó la medición semanal de las variables de crecimiento en 20 plantas: altura de la planta (AP), número de hojas emitidas (NHE), número de hojas funcionales (NHF) y área foliar en m<sup>2</sup> (AF), calculada mediante la fórmula de Martínez (1984):

$$\text{Área foliar (AF)} = \text{Largo} \times \text{ancho} \times 0,8$$

El diámetro del pseudotallo en cm (DP), se comenzó a medir a partir de 15 semanas, después de siembra, cuando la mayoría de las plantas alcanzaron 1m de altura.

Para medir la tensión de humedad en el suelo a las 7 semanas, después de siembra, se instalaron en el lote cuatro estaciones de tensiómetros marca Irrrometer®, cada una con dos tensiómetros, uno de 12" (30,48cm) y otro de 18" (45,72cm), en el área radical activa (a 20cm de la base del pseudotallo) y, semanalmente, se registraron los datos de la tensión de humedad del suelo en centibares.

La humedad en capacidad de campo, se determinó utilizando el método de campo, recomendado por Cenicaña (2004), que consistió en construir una piscina de 1m<sup>2</sup> en el área más representativa del lote de estudio, antes de la siembra. Los bordes de la piscina, se construyeron para conformar un dique de unos 20cm de altura y, luego, se aplicó una lámina de agua de 100 mm o 100Lm<sup>-2</sup> y se cubrió con plástico oscuro, para evitar la evaporación. Después de 48h, se tomaron cuatro muestras de suelo de 200g a 30cm de profundidad, se empacaron herméticamente y se llevaron al laboratorio de suelos de la Universidad de Caldas, donde fueron secadas en un horno a 125°C por 24 h, para obtener el contenido gravimétrico de humedad a capacidad de campo.

La humedad gravimétrica, se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$W = \frac{P_{sh} - P_{ss}}{P_{ss}} \times 100$$

Donde:

W: Humedad gravimétrica (%)

P<sub>sh</sub>: Peso del suelo húmedo (g)

P<sub>ss</sub>: Peso del suelo seco (g)

La humedad en punto de marchitez permanente, se estimó aplicando el método biológico, recomendado por Cenicaña (2004), para lo cual, se utilizaron cuatro recipientes de poliestireno, con capacidad de 500g de suelo. Se recolectaron muestras de suelo del horizonte A y, en cada recipiente, se sembraron tres semillas de girasol enano (*Helianthus sp.*),

que fueron mantenidas con riego constante. Cuando las plantas alcanzaron una altura de 10cm, se dejó una planta por recipiente y se suspendió el suministro de agua, sellando con plástico la parte superior de los recipientes. Se comenzó la observación semanal del vigor de las plantas; a las dos semanas mostraron síntomas de sequía y pérdida de turgencia, alcanzado el punto de marchitez permanente. En ese momento, las muestras de suelo de los recipientes fueron llevadas al laboratorio de biotecnología de la Universidad de Caldas, donde fueron secadas en un horno a 125°C por 24h, para obtener el contenido gravimétrico de humedad, a punto de marchitez permanente.

El contenido de humedad del suelo como lámina de agua en mm, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$L = \frac{W \times Da}{100} \times Pr$$

Donde:

L: Lámina de agua en mm

W: Humedad gravimétrica (%)

Pr: Profundidad radicular (cm)

Da: Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>)

Para calcular la Da en campo, se utilizaron cilindros de volumen conocido, donde se recolectaron muestras de suelo del horizonte A, que se secaron en horno a 105°C por 24h, para relacionar el peso seco del suelo con el volumen total del cilindro, cuya expresión es:

$$Da = \frac{Pss}{Vt}$$

$$Vt = \pi R^2 h$$

Donde:

Da: Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>)

Pss: Peso del suelo seco (g)

Vt: Volumen total, siendo R el radio de la base y h la altura del cilindro.

Lámina de agua aprovechable, se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$LAA = \frac{CC - PMP}{100} \times Da \times Pr \times 10$$

Donde:

LAA: Lámina de agua aprovechable (mm)

CC: Capacidad de campo (% de humedad)

PMP: Punto de marchitez permanente (% de humedad)

Da: Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>)

Pr: Profundidad radicular (cm)

Los datos climáticos diarios de temperaturas media, máxima y mínima (°C), humedad relativa (%), precipitación (mm) y brillo solar (horas), para el período comprendido entre marzo de 2008 y mayo de 2009, fueron obtenidos del Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFÉ), los cuales, habían sido registrados en la estación Santágueda, ubicada en la granja Montelindo.

Los requerimientos hídricos del cultivo, se establecieron mediante el cálculo de la evapotranspiración de referencia (ET<sub>o</sub> en mm), para lo cual, se utilizó el método de Penman-Monteith (Allen *et al.* 2006):

$$\lambda ET = \frac{\Delta R_n + \rho C_p \frac{(e_s - e_r)}{r_a}}{\Delta + \gamma(1 + r_s / r_a)}$$

Donde:

λET: Evapotranspiración de referencia, mm

λ: Calor latente de vaporización de agua (J/kg)

D: Pendiente de la curva de saturación de vapor de presión, (mbar/K)

R<sub>n</sub>: Radiación solar neta, (W/m<sup>2</sup>)

ρ: Densidad del aire, (kg/m<sup>3</sup>)

C<sub>p</sub> = Calor específico del aire a presión constante, (J/kg.K)

e<sub>s</sub> = Presión de vapor a punto de saturación, (mbar)

e<sub>r</sub> = Presión de vapor real, (mbar)

r<sub>a</sub> = Resistencia aerodinámica, (s/m)

γ = Coeficiente psicrométrico, (mbar/K)

r<sub>s</sub> = Resistencia superficial, (s/m)

Para cuantificar la evapotranspiración del cultivo (ET<sub>c</sub> en mm), se emplearon la fórmula y los coeficientes del cultivo (K<sub>c</sub>), determinados por Doorenbos & Pruitt (1977), teniendo en cuenta la etapa de desarrollo del cultivo:

$$ET_c = ET_o \times K_c$$

Donde:

ET<sub>c</sub>: Evapotranspiración del cultivo en mm

ET<sub>o</sub>: Evapotranspiración de referencia en mm

K<sub>c</sub>: Coeficiente del cultivo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La duración total del ciclo del cultivo fue de 60 semanas, la temperatura media de 23°C, la máxima de 28,8°C y la mínima de 18,6°C, encontrándose entre los rangos adecuados para Dominico-Hartón, establecidos por Belalcázar (1991). La humedad relativa fue del 78,8% y el brillo solar acumulado fue de 2.049,3 horas. La precipitación acumulada alcanzó 3.933,1mm, durante el ciclo del cultivo.

La densidad aparente del suelo fue de 0,866g cm<sup>-3</sup>, con la cual, se calculó una humedad gravimétrica de 35,4%, para

la capacidad de campo (CC) y de 17,9%, para el punto de marchitez permanente (PMP). La lámina de agua obtenida fue de 91,97mm, para CC, que se aplicó en el balance hídrico, como capacidad de almacenamiento del suelo y de 46,48mm, para PMP, con una lámina de agua de 46,45mm.

La tensión de humedad del suelo a dos profundidades diferentes fue similar a través del tiempo, manteniendo los niveles de humedad entre suelo saturado y capacidad de campo, excepto en las semanas 25 a 30 del cultivo, en las que hubo un déficit de agua considerable, que coincidió con la etapa de iniciación floral, lo que aumentó la tensión de humedad del suelo, indicando el intervalo de riego. La tensión de humedad, se mantuvo alrededor de 9,3cb, para las dos profundidades evaluadas, que según los rangos de humedad de los tensiómetros corresponde a suelo saturado (Figura 1); a este respecto, Orozco & Pérez (2006) mencionan que las raíces del plátano extraen agua del suelo únicamente a valores bajos de succión, por lo cual, la humedad del suelo se debe mantener cerca de la capacidad de campo, para evitar estrés por agua. Además, el hecho que las raíces no tengan aparentemente un poder de succión importante, sugiere que el suelo deberá estar siempre con un nivel alto de humedad (Santacruz & Santacruz, 1995).

Las tensiones más altas, se presentaron a 23,7cb, para los tensiómetros de 12" y a 24,7cb, para los de 18", ambos valores en la semana 27. A lo largo del ciclo del cultivo, los mayores valores de tensión de humedad se dieron a partir de la semana 39, para los tensiómetros de menor profundidad, con un promedio de 13,5cb, ubicándose en el rango de capacidad de campo, en comparación con valores menores a mayor profundidad, alcanzando 7,9cb y suelo saturado, para el mismo período (Figura 1), indicando mayor tensión

a menor profundidad, debido a que la mayoría de las raíces se desarrollan en los primeros 20 a 40cm de la superficie del suelo, con una distribución espacial de carácter radial horizontal (Belalcázar, 1991). Este comportamiento se debe también al mayor consumo de agua por la planta, a partir de la iniciación floral y el desarrollo de la bellota, dado que cuenta con una extensa área foliar, que ocasiona un aumento en la transpiración y requiere más agua, durante la floración y el llenado de frutos (Doorenbos & Pruitt, 1977).

En las primeras etapas del cultivo, la mayor tensión de humedad se presenta en los tensiómetros a mayor profundidad, con 9,6cb. A partir de la semana 29, cuando el cultivo se encuentra en la etapa de diferenciación floral, la tendencia cambia y la tensión es mayor en los tensiómetros de menor profundidad, con 11,5cb (Figura 1), debido a que la evaporación y la transpiración ocurren simultáneamente y no hay manera sencilla de separarlas. En las primeras etapas del cultivo, el agua se pierde, principalmente, por evaporación directa del suelo, pero con el desarrollo del cultivo y cuando este cubre totalmente el suelo, la transpiración se convierte en el proceso principal. En el momento de la siembra, casi el 100% de la evapotranspiración ocurre en forma de evaporación, mientras que cuando la cobertura vegetal es completa, más del 90% de la ET ocurre como transpiración (Allen *et al.* 2006). En la etapa reproductiva del cultivo, la tensión de humedad del suelo es más alta a menor profundidad, por la presencia de un mayor porcentaje de raíces en esta zona y por la transpiración que es mayor, por presentar una superficie foliar más extensa en esta etapa (Aristizábal, 2008).

La evapotranspiración de referencia (ET<sub>o</sub>) siempre fue mayor que la evapotranspiración del cultivo (ET<sub>c</sub>) en los

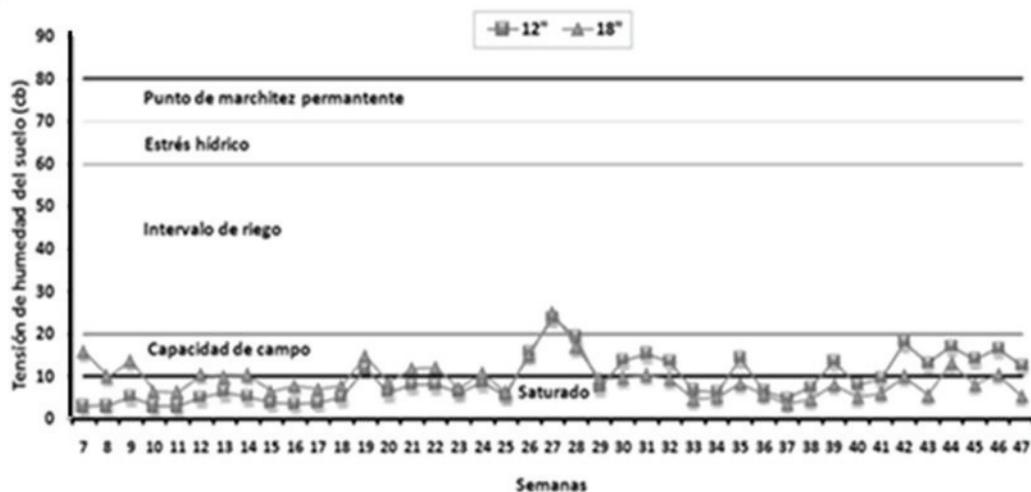


Figura 1. Tensión de humedad del suelo a 12" (30,48cm) y 18" (45,72cm).

dos períodos en que fueron calculadas (Tabla 1). A partir de la primera, se estableció que en la región Santágueda las plantas de plátano Dominico Hartón, bajo condiciones óptimas de cultivo y una densidad de 1.666 plantas ha<sup>-1</sup>, se requieren 1.140,6 mm de agua en un ciclo total de cultivo, que corresponden al 72% de la evapotranspiración real. En estudios realizados por diversos autores, las necesidades hídricas del plátano, para la zona tropical, varían entre 1.200 y 2.314mm/año, con un promedio de 1.756mm/año (Peña, 2005; Doorenbos & Kassam, 1980; Sastry, 1988; Santacruz & Santacruz, 1995). En la práctica, se requieren alrededor de 150mm mensuales de precipitación (1,500m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) para satisfacer las necesidades hídricas del plátano (Cayón, 2004). En este caso, la cantidad de agua requerida por el cultivo es menor que la reportada en la literatura; pero el estudio *in situ* determinó que la región Santágueda presenta las condiciones hídricas adecuadas para el establecimiento exitoso del cultivo del plátano, porque las precipitaciones anuales son suficientes para cubrir los requerimientos hídricos de la culti-variedad Dominico-Hartón, a pesar que, como lo mencionan Doorenbos & Kassam (1980), por su gran superficie foliar y pseudotallos carnosos, los requerimientos de agua son elevados, en comparación con otras especies. Peña (2005) y Santacruz & Santacruz (1995) señalan que las reservas de agua de estas plantas son mínimas y pueden ser gastadas en algunas horas de transpiración normal, lo cual, las obliga a equilibrar constantemente las pérdidas de agua. Por esto, cuando haya distribución anormal o escasez de la precipitación y se presenten valores inferiores a los requeridos en cada etapa del cultivo, es necesario tomar medidas para evitar el estrés hídrico, como la utilización de coberturas que reducen la evaporación y conservan la humedad en el suelo. De acuerdo con Jaramillo (2005), la mejor economía del agua en regiones secas o con períodos de deficiencia de agua acentuados o disminución significativa de las lluvias, como cuando se presenta el fenómeno de El Niño, se logra protegiendo el suelo con cobertura muerta, la cual, se puede obtener cortando las arvenses al inicio del período seco o,

como en el caso del plátano, dejando en el lote los residuos generados por las labores de control fitosanitario, como el deshoje, el despunte y el desguasque.

El consumo de agua por la planta aumenta a medida que crece. En las etapas de plántula (V1) y formación de hijuelos (V2), durante las primeras ocho semanas del cultivo, los requerimientos hídricos son constantes, alrededor de 11,3mm semanales. Durante el alargamiento inicial de entrenudos (V3), se mantiene un consumo de 10,4mm; pero a partir de la semana 18, después de siembra, el consumo de agua aumenta a 13,1mm por semana. Cuando la planta pasa al estado reproductivo el uso consuntivo aumenta gradualmente. En la etapa de iniciación floral (R4), el consumo promedio fue de 20,8mm semanales y en la etapa R5 (desarrollo de la bellota), el promedio fue de 27,3mm, por semana; alcanzando los consumos más altos durante las semanas 34 a 45, con un promedio de 26,5mm semanales, siendo la floración la época más limitante, en cuanto al déficit hídrico. Este comportamiento es similar al reportado por Peña (2005), que considera el período inflorescencia-floración-desarrollo del fruto el más exigente en cuanto al consumo de agua. A partir de la semana 46, el consumo de agua disminuye levemente, con un consumo semanal promedio de 24,3mm; sin embargo, en la etapa de llenado del racimo, la planta requiere 20mm semanales en promedio. Finalmente, si se deja más tiempo el racimo en la planta y se produce allí la maduración, el consumo de agua es de 22,8mm semanales. El requerimiento más bajo de agua, se presentó en la semana nueve, con 8,79mm y el más alto fue en la semana 41, con 29,4mm (Figura 2).

Las etapas que más agua requieren son: iniciación floral (R4), desarrollo de la bellota (R5), floración (R6) e inicio de la formación del racimo (R7). Según Belalcázar (1991) estas etapas tienen de singular importancia, porque de su correcta evolución va a depender el rendimiento del cultivo. En el período de siembra a belloteo el uso consuntivo del cultivo

Tabla 1. Evapotranspiración de referencia por Penman-Monteith (ET<sub>o</sub> en mm) y Evapotranspiración del Cultivo (ET<sub>c</sub> en mm), para plátano Dominico Hartón.

Período	Tiempo (Semanas)	ET <sub>o</sub> Penman Monteith (mm)	ET <sub>c</sub> (mm)
S-B*	39	1051,4	640,5
B-C	21	541,7	500,1
TOTAL	60	1593,1	1140,6

\*S-B: Siembra a Belloteo, B-C: Belloteo a cosecha

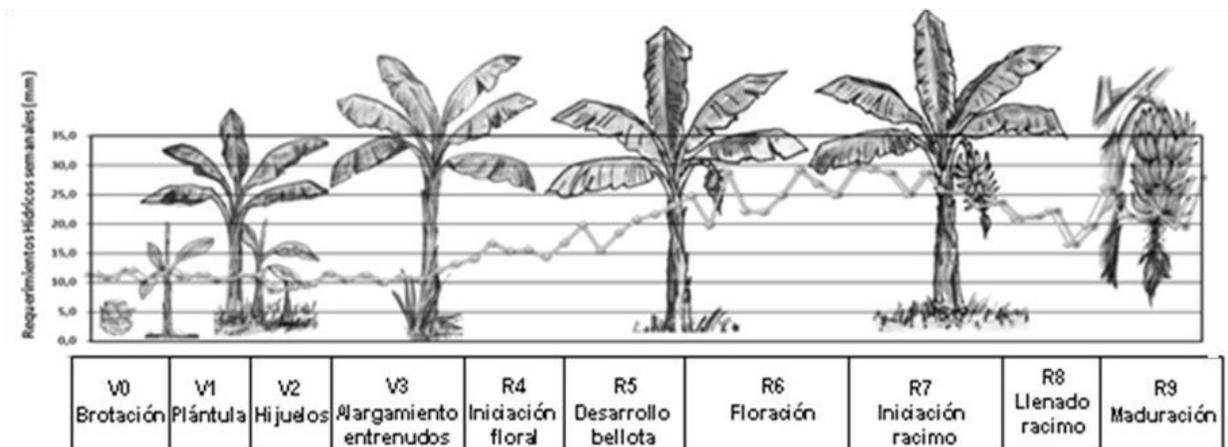


Figura 2. Requerimientos hídricos semanales de acuerdo con la etapa de crecimiento del plátano Dominico Hartón, en la región Santágueda, Palestina, Caldas. Fuente Dibujos: Belalcázar & Rosales (2001).

fue de 640.5mm, disminuyendo de belloteo a cosecha, donde requirió 500,1mm de agua.

El requerimiento hídrico no es constante a través del tiempo, ya que dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta se requieren cantidades diferentes de agua, presentando un aumento progresivo, a medida que las plantas avanzan en su crecimiento, siendo la floración la época de mayor consumo de agua y, por tanto, la más limitante, en cuanto al déficit hídrico (Figura 2). Este comportamiento se debe a que con el transcurrir del tiempo las plantas aumentan su área foliar (Aristizábal, 2008) y el número de hijuelos, cuya formación se inicia, aproximadamente, a los tres meses después de la siembra (Aristizábal & Jaramillo, 2010), lo cual, determina que el sistema de raíces sea más abundante. Nótese que después de la floración, cuando comienza la iniciación del racimo, se presenta una caída en el requerimiento de agua (Figura 2), lo cual, se debe a que para esa época la emisión de hojas ha cesado y esto se traduce en disminución del área foliar (Aristizábal, 2008) y, en consecuencia, en menor transpiración.

Se estableció que existe una correlación positiva y altamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre la evapotranspiración del cultivo, interpretada como el consumo de agua (Turner *et al.* 2007), con todos los parámetros de crecimiento, es decir, a medida que la planta aumenta en su desarrollo, la cantidad de agua que consume también es mayor. Además, existe una correlación positiva y altamente significativa entre las variables de crecimiento, con excepción del área foliar y el número de hojas funcionales, que no mostraron asociación entre ellas, posiblemente, por la influencia de enfermedades, como las Sigatokas negra y amarilla (*Mycosphaerella fijiensis* y *M. musicola*), que afectan de manera directa el área foliar,

ya que al realizar las prácticas culturales necesarias, para su manejo, se reduce el número de hojas funcionales.

Las relaciones directas y altamente significativas y confiables de la altura de la planta (Figura 3A), el diámetro del pseudotallo (Figura 3B) y el número de hojas emitidas (Figura 3C) con la ETC, indican la importancia del suministro del agua, para garantizar un crecimiento normal del cultivo, con mayor efecto en la altura de la planta y en la producción de hojas que en el grosor del pseudotallo. La tasa de emisión foliar está estrechamente relacionada con las condiciones ambientales. De acuerdo con Belalcázar (1991), uno de los factores que más influye sobre la emergencia de las hojas son los períodos largos de sequía, que pueden incrementar el proceso de emisión foliar en 15 días o más.

En el caso del AF y la ETC, el bajo coeficiente de determinación indica que el porcentaje de variabilidad restante se explica porque los procesos de evaporación y de transpiración no son diferenciables, correspondiendo a la combinación del agua perdida por evaporación desde el suelo y la absorbida por las raíces que, posteriormente, se pierde en su totalidad, a través de la superficie de las hojas, porque la mayor parte del agua absorbida es liberada a la atmósfera en forma de vapor y sólo entre 1% y 2% es utilizada para la formación de los tejidos (Aristizábal, 2003). La relación directa entre la altura de la planta y la ETC y el alto coeficiente de determinación para dicha asociación (Figura 3A) indican la influencia que el suministro de agua tiene en el crecimiento de la planta, hasta el punto que por cada mililitro de evapotranspiración, la altura de la planta aumentaría en 12cm.

Los resultados obtenidos y el análisis de los mismos permiten inferir que:

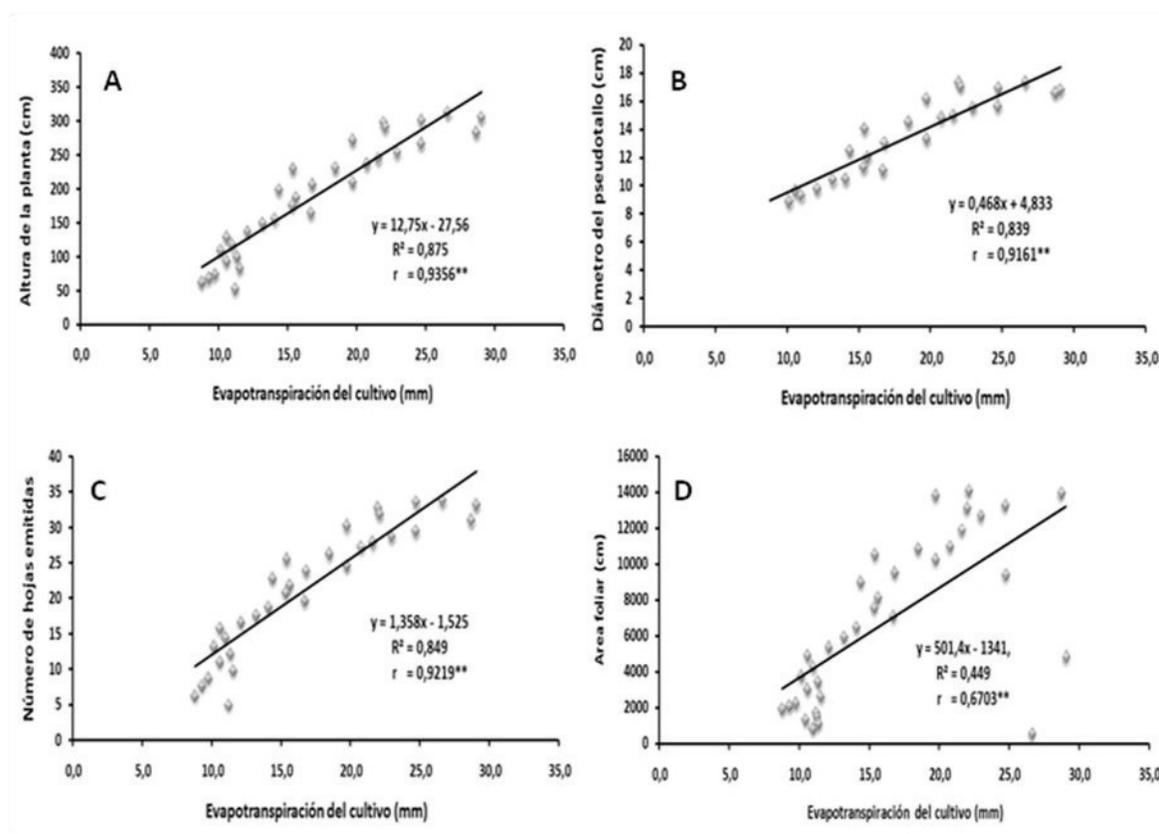


Figura 3. Altura de la planta (A), diámetro del pseudotallo (B), hojas emitidas (C) y área foliar (D) en función de la evapotranspiración del cultivo para plátano Dominic Hartón.

- Las condiciones climáticas en la región Santágueda se encuentran en los rangos adecuados para un óptimo desarrollo del plátano Dominic-Hartón; sin embargo, se pueden presentar épocas de déficit o exceso de agua, indicando que la distribución de la precipitación, en ocasiones, no coincide con las etapas fenológicas del cultivo.
- Los valores de lluvia presentes durante el ciclo del cultivo en la región son suficientes para satisfacer los requerimientos hídricos del plátano Dominic-Hartón y cuando su distribución es normal, se logra mantener los niveles de agua en la cantidad requerida por las plantas.
- En suelos francos, como los de la región Santágueda, la mayoría del tiempo y los niveles de humedad se mantienen cercanos a la Capacidad de Campo y a Saturación, garantizando el abastecimiento constante de agua para el cultivo.
- Los requerimientos hídricos del cultivo no son constantes a través del tiempo, dependiendo de la etapa de desarrollo, las plantas requieren cantidades diferentes de agua, presentando un aumento progresivo a medida que el cultivo avanza en su desarrollo. La floración es la

época de mayor consumo de agua y, por tanto, la más limitante, en cuanto al déficit hídrico.

**Agradecimientos:** Al Programa Plátano de la Universidad de Caldas por el apoyo financiero para la realización del trabajo de campo. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, R.; PEREIRA, L.; RAES, D.; SMITH, M. 2006. Evapotranspiración del cultivo, Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. FAO (Italia). 298p.
- ARISTIZÁBAL, L.M. 2003. Fisiología Vegetal. Universidad de Caldas. Artes Gráficas Tizan (Colombia). 306p.

3. ARISTIZÁBAL, L.M. 2008. Evaluación del crecimiento y desarrollo foliar del plátano Hondureño Enano (*Musa AAB*) en una región cafetera de Colombia. *Agronomía (Colombia)*. 16(2):23-30.
4. ARISTIZÁBAL, L.M.; JARAMILLO, G.C. 2010. Identificación y descripción de las etapas de crecimiento del plátano Dominico Hartón (*Musa AAB*). *Agronomía*. 18(1):29-40.
5. BELALCÁZAR, S. 1991. El Cultivo del Plátano en el trópico. Manual de Asistencia Técnica N° 50. Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Colombia). 376p.
6. BELALCÁZAR, S.; ROSALES, F. 2001 Siembra y explotación del cultivo del plátano. Módulos para la capacitación de productores. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano INIBAP. (Francia). 171p.
7. CAYÓN, S.D.G. 2004. Ecofisiología y productividad del plátano (*Musa AAB Simmonds*). XVI Reunión Internacional de ACORBAT. Documento especial p.172-183.
8. CENICAÑA. 2004. Avances técnicos para la programación y el manejo del riego en caña de azúcar. Serie Técnica N. 33 (Colombia). 2ª Edición. 66p.
9. DOORENBOS, J.; KASSAM, A.H. 1980. Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos. Estudio de Riego y Drenaje N° 33 (Italia). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. 193p.
10. DOORENBOS, J.; PRUITT, W.O. 1977. Las necesidades de agua de los cultivos. Estudio de Riego y Drenaje N° 24 (Italia). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. 179p.
11. JARAMILLO, A. 2005. Clima Andino y Café en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café CENICAFÉ. (Colombia). 192p.
12. MARTÍNEZ, G.A. 1983. Ecología del Cultivo del Plátano. Memorias. Primer Seminario Internacional sobre el Plátano. Publicaciones Universidad de Caldas. (Colombia). p.137-143.
13. MARTÍNEZ, G.A. 1984. Determinación del área mínima foliar en plátano en el trópico húmedo. *Revista ICA*. 19(2):183-187.
14. MAHOUACHI, J. 2008. Growth and mineral nutrient content of developing fruits on banana plant (*Musa acuminata* AAA 'Gran Nain') subjected to water stress and recovery. *J. Hort. Sci. Biotech.* 82:839-844.
15. MORILLO, R. 1999. Necesidades hídricas del cultivo de remolacha en Castilla y León. Disponible desde Internet en: <http://4w.cajaduero.es/agro/public/remolacha/Riego4.htm> (con acceso 28/04/07).
16. OROZCO, J.; PÉREZ, O. 2006. Tensión de humedad del suelo y fertilización nitrogenada en Plátano (*Musa AAA Simmonds*) cv. Gran Enano. *Agrociencia (Cuba)*. 40(2):149-162.
17. PEÑA, E. 2005. Necesidades hídricas del banano y el plátano. 2005. [En línea] Disponible desde Internet en: [http://www.revistas.mes.edu.cu/eduniv/02-Libros-por-ISBN/959-16-0400/0349-Necesidades\\_Hidricas\\_Banano\\_Platano.pdf](http://www.revistas.mes.edu.cu/eduniv/02-Libros-por-ISBN/959-16-0400/0349-Necesidades_Hidricas_Banano_Platano.pdf) (con acceso 04/12/10).
18. SANTACRUZ, G.; SANTACRUZ, E.E. 1995. Necesidades Hídricas del Cultivo del Banano en El Soconusco, Chiapas, México. Disponible desde Internet en: [http://www.plataneros.com.mx/archivos/NECESIDADES\\_HIDRICAS\\_DEL\\_BANANO\\_EN\\_EL\\_SOCONUSCO\\_CHIAPAS.doc](http://www.plataneros.com.mx/archivos/NECESIDADES_HIDRICAS_DEL_BANANO_EN_EL_SOCONUSCO_CHIAPAS.doc) (con acceso 07/12/11).
19. SASTRY, P.S.N. 1988. Agrometeorology of the banana crop. *Agricultural Meteorology Report N° 29*. World Meteorological Organization (Italia). p.14-20.
20. TURNER, D.W.; FORTESCUE, A.J.; THOMAS, S.D. 2007. Environmental physiology of the bananas (*Musa spp.*). *Braz. J. Plant Physiol.* 19(4):463-484.
21. VAN VOSSELEN, A.; VERPLANCKE, H.; VAN RANST, E. 2005. Assessing water consumption of banana: traditional versus modeling approach. *Agr. Water Managem.* 74:201-218.

Recibido: Diciembre 6 de 2011

Aceptado: Julio 10 de 2012

# EFECTO DE LA TEMPERATURA Y RADIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE GLUCÓSIDOS DE ESTEVIOL EN *Stevia rebaudiana* EN EL CARIBE HÚMEDO COLOMBIANO

## TEMPERATURE AND RADIATION EFFECT ON STEVIOL GLYCOSIDES PRODUCTION IN *Stevia rebaudiana* IN THE COLOMBIAN HUMID CARIBBEAN REGION

Alfredo Jarma Orozco<sup>1</sup>, Carlos Cardona Ayala<sup>2</sup>, Claudio Fernández Herrera<sup>3</sup>

<sup>1</sup> I.A. Ph.D., Docente Tiempo Completo, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba (Montería – Colombia). Correo-e: ajarma@correo.unicordoba.edu.co; <sup>2</sup> I.A. M.Sc. Docente Tiempo Completo, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba; <sup>3</sup> I.A. M.Sc. Docente Tiempo Completo, Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad de Córdoba, claudiofernandezherrera@gmail.com

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 339 - 347, 2012

### RESUMEN

Estevia es una planta herbácea semi-perenne, nativa de Paraguay, que ha demostrado su versatilidad de adaptación a diversos ambientes en el mundo. Esta planta, se caracteriza por producir glucósidos de esteviol (diterpenos), que pueden ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa. Estos compuestos son sintetizados en la misma ruta de las giberelinas, por lo que factores como la luz y la temperatura, que afectan la síntesis de la hormona, también deberían tener un efecto importante sobre la síntesis de los glucósidos. La investigación, se realizó en el departamento de Montería, Córdoba, durante tres épocas de siembra, entre 2006 y 2007, con el propósito de determinar el efecto de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) y las temperaturas máximas y mínimas, sobre la concentración de glucósidos, de los genotipos Morita 1 y Morita 2. Se usó un arreglo factorial de 3 (épocas) x 2 (genotipos), con 12 repeticiones, bajo un diseño experimental completo al azar. De manera general, se observó que las respuestas de los genotipos variaron en función de la oferta ambiental de cada época de siembra; los efectos de la RFA y las temperaturas mostraron una correlación positiva ( $p \leq 0,05$ ), con la síntesis de glucósidos para M1, en tanto que para M2, esto solamente fue evidente para la RFA. Aunque se observó un incremento de los glucósidos totales, no sucedió para rebaudiósido A.

Palabras clave: Estevia, rebaudiósido A, glucósidos, RFA, ecofisiología.

### SUMMARY

*Stevia*, a semi-perennial herbaceous plant, native of Paraguay, has demonstrated its versatility to adapt in different environments in the world. This plant is characterized by the synthesis of steviol (diterpene) glycosides that can be, up to 300 times, sweeter than sucrose. These substances are synthesized in the same pathway as gibberellins, so factors such as light and temperature that normally affect hormone synthesis, also may have a significant effect on steviol glycoside synthesis. The research was carried out in Monteria-Cordoba, for three seasons between 2006 and 2007 to determine the effect of photosynthetic active radiation (PAR) and maximum and minimum temperatures, on the concentration of glycosides of Morita 1 and Morita 2 genotypes. A factorial arrangement of 3 (seasons) x 2 (genotypes) was used, with 12 repetitions in a complete randomized experimental design. In general terms, the genotypes responses varied according to planting season, the effects of PAR and the temperatures indicated a positive correlation ( $p \leq 0.05$ ) between them and synthesis of glycosides for Morita 1, while for Morita 2 it was only obvious to the PAR. Although there was an increase in total glycosides, this was not found for rebaudioside A.

Key words: *Stevia*, rebaudioside A, glycoside, PAR, eco-physiology.

### INTRODUCCIÓN

La Estevia, *Stevia rebaudiana* Bert., es una especie originaria de Paraguay, conocida por los amerindios guaraníes, desde

tiempos ancestrales, como ka'a he'e (Alonzo-Torres, 2007). En sus hojas posee moléculas denominadas glucósidos de esteviol (GE), con poder edulcorante de hasta 300 veces más potente que la sacarosa (0,4% en volumen) y cuyo contenido puede variar entre un 4 y 20%, dependiendo del genotipo y de las condiciones ambientales y de cultivo (Geuns, 2003; Brandle & Telmer, 2007; Gardana *et al.* 2010). Tanto las hojas como los extractos, se han utilizado por muchos años en Suramérica, en Asia, en Japón, en China y en diferentes Estados de EEUU. En Brasil, en Korea y en Japón, el edulcorante refinado es oficialmente catalogado como bajo en calorías (Mizutani & Tanaka, 2002; Kim *et al.* 2002); su uso se ha incrementado dramáticamente en la primera década del siglo, debido a la conciencia que ha despertado el efecto de la sacarosa en la salud, en aspectos como caries dental, obesidad y diabetes, entre otros (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009).

La información científica indica que los mayores GE de la hoja son esteviósido (St: 5-10% del peso seco de la hoja), rebaudiósido A (RebA: 2-4%), rebaudiósido C (1-2%) y dulcósido A (0,4-0,7%). De éstos, St (300 veces más potente que la sacarosa) y RebA (250-400 veces) son los que mayormente dominan el mercado de los GE (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009; Hearn & Subedi, 2006). Uno de los criterios importantes para determinar la calidad de la hoja es la relación RebA/St, la cual, generalmente, está alrededor de 0,4 (De Oliveira *et al.* 2007). En la medida en que esta relación sea igual o mayor de 1, se obtiene un producto de mejor calidad (mayor potencial edulcorante y menor sabor amargo), ya que RebA es más dulce y no tiene sabor amargo (Dacome *et al.* 2005; Carakostas *et al.* 2008).

Estevia, se ha cultivado con éxito en una gran variedad de localidades geográficas de todo el mundo (Siddique *et al.* 2010; Brandle *et al.* 2000; Ramesh *et al.* 2006); aunque se encuentran informes de cultivos en condiciones extremas, como en el invierno de San Petersburgo, estevia se adapta mejor a ambientes que están entre los 35 y 45° de latitud, a cada lado del Ecuador (Rank & Midmore, 2002). En Suramérica existen diversos reportes de la producción exitosa en países con diferencias ambientales, como Paraguay, Brasil, Argentina, Colombia, Perú y Ecuador (Jarma, 2008; Landázuri & Tigrero, 2009).

En su hábitat natural, en el nororiente paraguayo (21-22° S), se encuentra de manera silvestre, entre 200 y 700m.s.n.m., temperatura media anual de 22,5°C, con temperaturas que oscilan entre 17 y 26°C y 1600mm/año de precipitación (Soejarto, 2002). Autores, como Ceunen *et al.* (2012), afirman que cuando se establece como cultivo, los requerimientos climáticos de longitud del día y temperatura, pueden variar significativamente entre regiones y cultivares.

Según Brandle (2004), la floración en estevia es foto-dependiente y es mayor al reducirse la duración del día; sin embargo, el autor indica que las respuestas de la floración y del contenido de esteviósidos a la longitud del día, parecen ser variables, ya que algunos genotipos se comportan como plantas obligadas de día corto y otros parecen ser insensibles al fotoperiodo. En términos generales, se consideran plantas de día corto, aquellas que florecen cuando la duración del día es menor de un período crítico que, habitualmente, se establece de 11 horas (Warner, 2007), aunque este valor puede variar al depender de diversos factores, como la edad de la planta, la temperatura y otros (Baloch *et al.* 2009).

Geeta & Midmore (2010) indican que estevia es una planta de día corto al notar un incremento de la floración en días con luz menor de 12 h; por su parte, Brandle & Rosa (1992) reportaron que una alta relación hoja/tallo fue una función del genotipo cuando se sometieron a días largos. Ramesh *et al.* (2006) afirmaron que el crecimiento vegetativo, el área foliar, el peso seco de hojas y el rendimiento de glucósidos variaron de acuerdo a la duración del día y que estos parámetros fueron mayores en días largos al compararlos con días cortos, principalmente, la concentración de esteviósidos, que aumentó en un 50%. Algunos de los pocos trabajos de investigación realizados en el tema han reportado que el crecimiento vegetativo de estevia se reduce cuando las temperaturas están por debajo de 20°C y cuando la longitud del día es menor a 12 horas (Lemus-Mondaca *et al.* 2012; Yermakov & Kochetov, 1996). Los mismos autores reportaron que al aumentar la longitud del día a 16 horas y la intensidad de la misma, se incrementan el crecimiento vegetativo y los niveles de esteviósidos.

La temperatura influye sobre la disponibilidad de nutrientes del suelo, la germinación, el crecimiento de los nuevos brotes, la fotosíntesis, la respiración y muchos otros procesos metabólicos en la planta. Los primeros trabajos en estevia, adelantados por Sumida (1980), indican que el rango óptimo de temperaturas de esta planta es de 15-30°C y puede soportar temperaturas críticas de 0-2°C; aunque Miyazaki *et al.* (1978) demostraron que el límite absoluto era -3°C. El efecto de las temperaturas y la producción de los glucósidos en estevia es una polémica mundial. En 1983, Mizukami *et al.* postularon que la relación entre las temperaturas diurnas y nocturnas era un factor determinante en la producción del esteviósido y determinaron que la variación 25/20°C (día/noche), indujo las mayores tasas de crecimiento y de producción de esta molécula; sin embargo, 15 años más tarde, Nepovim *et al.* (1998), en un trabajo adelantado en la República Checa, donde se determinó el efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido de esteviósidos, reportaron que la temperatura no fue un parámetro determinante para la producción de los glucósidos de esteviol. Posteriormente, Parsons (2003)

concluyó que la temperatura sí tenía un efecto sobre la producción de esteviósidos, de manera directa o a través de la variación día/noche. Reportes de rangos de temperatura, donde estevia expresa su máximo crecimiento, son variables. Barathi (2003) reveló que para un crecimiento favorable, las temperaturas máximas diarias no deben exceder 40°C y en la noche no deben estar por debajo de los 10°C, en tanto que Richard (2004) señaló que el rango de temperaturas donde estevia mejor crece es de -6 a 44°C. Rank & Midmore (2002), en un reporte de la posibilidad de la introducción de estevia en Australia, indicaron que el crecimiento vegetativo se reducía cuando las temperaturas estaban por debajo de 20°C.

En este trabajo, se evaluó la hipótesis que la variación de los factores luz y temperatura, en el Caribe Húmedo colombiano, afectan la calidad de la hoja de dos genotipos de estevia. Para ello, se planteó como objetivo principal, determinar el efecto de la RFA y de las temperaturas máximas y mínimas registradas en tres épocas de siembra, sobre la cantidad de glucósidos totales (GT), la concentración de RebA y la relación RebA/OG en los genotipos de estevia M1 y M2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización y material experimental:** Se condujeron experimentos en tres épocas: abril 2 a junio 13 de 2006, considerada como época de lluvias (E1); febrero 20 a abril 17 de 2007, como época seca (E2), y noviembre 20 a enero 30 de 2007, como época de transición entre lluvia y seca (E3). Los trabajos, se adelantaron en la Universidad de Córdoba (Montería-Colombia), ubicada a una altura de 13 m.s.n.m., 8° 52' N y 76° 48' W. La zona de vida se denomina bosque seco tropical (bs-T), según la clasificación de Holdridge (1967), aunque en el país se denomina Caribe Húmedo colombiano; esta zona registra precipitación promedio anual de 1200

mm, temperatura media del aire de 28°C, humedad relativa de 84% y brillo solar anual de 2108,2 horas (Palencia *et al.* 2006). En cada época, se usó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de 3 (épocas) x 2 (genotipos) y 12 repeticiones; el brillo solar fue convertido a RFA, mediante la metodología de Angström (1924) y las temperaturas se registraron con termómetro de máximas y mínimas, marca B.B.I. Mod. 3100. Estas variables indicaron que, en términos generales, las épocas E2 y E3 presentan los mayores niveles de RFA, Tmax y Tmin (Tabla 1).

**Contenido de glucósidos:** El contenido de glucósidos totales GT y de RebA, se midió en porcentaje de peso seco de la hoja, por el método de cromatografía líquida de alta eficacia, utilizando en la fase móvil una mezcla de acetonitrilo y agua (80:20), con una columna Kromasil 100-5HN<sub>2</sub> (Método isocrático) y un patrón Reb A, de un 90% de pureza. Estos análisis fueron realizados por el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Prodalysa Ltda. (Chile). Sólo se consideró la presencia de RebA en función de los glucósidos totales (GT), por ser el de mayor importancia económica (Liu *et al.* 2010). La diferencia entre GT y RebA, se asumió como contenido de otros glucósidos OG, para efectos de establecer la relación RebA/OG.

En términos generales, durante el desarrollo de la investigación no se presentaron efectos significativos de factores ajenos a la misma; el riego, se aplicó con el criterio de mantener capacidad de campo.

Para analizar los resultados, se hizo un ANAVA, donde se consideró el efecto de los factores individuales época y genotipo y su interacción, los cuales, se descompusieron con tablas de medias de doble entrada, realizando las comparaciones, a través del test protegido de DMS, a un nivel del 5% de probabilidad; posteriormente, se corrieron análisis

Tabla 1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA (MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) y temperaturas máximas y mínimas (°C) en tres épocas de siembra de estevia en el Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Factor	Época lluvia (E1)				Época seca (E2)				Época transición (E3)			
	Abr 06	May 06	Jun 06	- X	Feb 07	Mar 07	Abr 07	- X	Nov 07	Dic 07	Ene 08	- X
RFA	16,6	14,2	14,2	<b>15,0</b>	22,3	21,8	20,6	<b>21,6</b>	16,8	18,6	19,3	<b>18,2</b>
Temp. Máx.	31,8	310,6	31,3	<b>31,6</b>	34,6	33,8	32,7	<b>33,7</b>	31,4	32,4	33,8	<b>32,5</b>
Temp. Mín.	23,8	23,4	24,1	<b>23,8</b>	23,8	24,8	24,6	<b>24,4</b>	23,7	23,4	23,8	<b>23,6</b>

de correlación por genotipo entre las principales variables, dependientes e independientes. Para el ANAVA, el análisis de las interacciones y de las correlaciones, se utilizó el software estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que para todas las variables dependientes se presentó interacción de la época por el genotipo, denotando las respuestas diferenciales que presenta la calidad de la hoja de los materiales genéticos (plasticidad), al variar la oferta de luz y de temperatura. Por su parte, los coeficientes de variación de los GT (13,3%), RebA (5,9%) y relación RebA/OG (18,1%), indicaron una aceptable precisión de los datos experimentales, para condiciones de campo (Pimentel-Gomes, 1985).

El análisis de las interacciones, se realizó desde la óptica del genotipo, para facilitar la comprensión de las mismas (Tabla 2). En M1, los GT aumentaron en alrededor de 4g por cada 100 g de hoja seca, cuando se cultivó en E3, respecto a las otras épocas, pero no sucedió con el contenido de RebA y la relación RebA/OG. Para estas dos variables, fue la E2 quien mostró los mejores valores respecto a E1 y E3 (respectivamente, 8 y 15% más de contenido de RebA y 4 y 6 veces más alta la relación RebA/OG).

Por su parte en M2, los GT se redujeron en más de 2g/100g de hoja seca, en la época de lluvia respecto a la seca y de transición, pero a diferencia de M1, los niveles de RebA no presentaron diferencias significativas entre las épocas de siembra, indicando más estabilidad de este parámetro respecto a M1.

**Glucósidos totales:** Los resultados consignados en la tabla 3 indican que los GT de M1 tienden a variar en el mismo sentido de la RFA y las Tmax y Tmin, o sea, que un incremento en los valores de estas tres variables ambientales estaría asociado también a un incremento de los GT; sin embargo, es importante mencionar que aumentos extremos de este factor podrían causar una disminución en los GT al reducirse la biomasa total por planta (Jarma et al. 2006); esto podría explicar los resultados de los GT en M1 sometida a altos niveles de radiación (E2, 21 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>), respecto a la época de transición (E3, 18 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>), donde se aumentaron los GT.

Para M2, el coeficiente de correlación positivo también indica que los GT y la RFA varían en el mismo sentido, es decir, que valores altos de GT corresponden a valores altos de RFA y viceversa; sin embargo y a diferencia de M1, para M2 al parecer los GT y las temperaturas (máximas y mínimas), no están asociadas significativamente, lo que sugeriría que la luz sería más importante que las temperaturas en la síntesis de glucósidos de esteviol, en este genotipo.

Los aumentos de GT a una oferta intermedia de RFA para M1 en E3 y alta e intermedia para M2 en E2 y E3 (Tabla 2), indican una respuesta positiva de la especie a la luz, aunque de manera diferencial entre genotipos. Este comportamiento podría corroborar lo reportado por Jarma, en 2008, respecto a las tasas de crecimiento y de concentración de edulcorantes que ha registrado a su favor M2, al cultivarse en diversidad de condiciones y de ambientes, principalmente, luz. Resultados similares han sido reportados por Lemus-Mondaca *et al.* (2012), quienes informaron de un aumento en la síntesis de GT, al aumentar la oferta de luz.

Tabla 2. Análisis de la interacción Época x Genotipo de variables de calidad de la hoja de dos genotipos de estevia sembrados en época de lluvias (E1), seca (E2) y de transición (E3), en el Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Gen	GT (g/100 g hoja seca)			RebA (g/100 g GT)			RebA/OG		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
M1	13,1±2,6 b	13,0±1,6 b	17,3±1,7 a	71,2±8,5 b	77,4±2,2 a	67,1±6,2 c	2,5±0,8 b	3,5±0,4 a	2,1±0,6 b
M2	13,9±3,0 b	16,5±1,6 a	17,2±1,1 a	77,5±1,9 a	77,8±2,8 a	77,5±1,0 a	3,4±0,4 a	3,6±0,5 a	2,9±0,1 b
DMS (5%)	1,65			3,61			0,4		

GT=Glucósidos totales; Reb-A=Rebaudiósido A; OG=otros glucósidos; M1=Morita 1; M2=morita2; Gen=Genotipos. Promedios con la misma letra dentro de un mismo genotipo y variable son iguales estadísticamente de acuerdo al test protegido de DMS (5%).

Al considerar que los glucósidos de esteviol son moléculas sintetizadas en la cadena de alargamiento terpénica y con base en lo reportado por Guenther *et al.* (1994), en el sentido que la luz tiene un efecto directo y positivo sobre la síntesis del isopentenil pirofosfato IPP, una molécula de cinco carbonos que es denominada regularmente como el isopreno activo, dada su importancia como precursor en el alargamiento de dicha cadena, es lógico deducir que la luz afecte también positivamente la síntesis de los glucósidos de esteviol (Guevara-García *et al.* 2005), aunque esto se haría de manera diferencial entre genotipos, tal como se reporta en este trabajo. Respecto a la temperatura, aún se desconoce gran parte de cómo la planta traduce estos estímulos en señales particulares; lo cierto es que las altas temperaturas inducen cambios y adaptaciones, a través de un regulador transcripcional (bHLH) denominado, frecuentemente, como factor interactuante del fitocromo 4 (PIF4), el cual, está regulado por el genotipo e integra múltiples estímulos ambientales, durante el desarrollo de la planta (Koini *et al.* 2009).

Probablemente, la actividad del PIF4 en estevia indicaría que este regulador respondería, mayormente, a los estímulos de temperatura en M1 respecto a M2. Lo anterior podría contribuir a la discusión mundial sobre el efecto indiferente (Nepovim *et al.* 1998) o positivo (Parsons, 2003) de las temperaturas en la concentración de glucósidos, ya que este trabajo sugeriría que esta respuesta puede ser diferencial, de acuerdo al genotipo.

Por otra parte, es importante considerar que, aunque el rol fisiológico y la acumulación de altas cantidades de glucósidos no han sido aún bien elucidados, en la ruta de síntesis de los glucósidos de diterpeno, la hidroxilación del ácido entkaurenoico (*ent-KA*) a esteviol, requiere NADPH y oxígeno molecular (Kim *et al.* 1996), reacción que es catalizada por una flavoproteína *ent-KA* 13-hidroxilasa; esto es importante, ya que en las reacciones lumínicas del proceso fotosintético, se provee NAPH y O<sub>2</sub>, por lo que se esperaría mayor oferta de los mismos, cuando las tasas de fotosíntesis son adecuadas en ambientes de apropiada oferta lumínica, como las épocas 2 y 3, de esta investigación. Adicionalmente, la síntesis del IPP es una consecuencia directa de las tasas de fotosíntesis al proveer el primer producto de este proceso, gliceraldehído 3-fosfato (3GAP), que dará origen al acetil coenzima A (ACoA) o se unirá a piruvato, formando el isopreno activo; con base en ello, no sorprende, por tanto, que exista correlación positiva entre la oferta de RFA y la síntesis de GT, tanto en M1 como en M2; caso diferente sucedería con la temperatura que al aumentar, probablemente, induciría tasas diferenciales de fotosíntesis/respiración en los dos genotipos, confirmando las desigualdades de adaptación (Jarma, 2008) y trayendo, igualmente, como consecuencia respuestas diferenciales en la concentración de GT.

Las respuestas a los estímulos de luz y de temperatura proporcionan a las plantas la capacidad de reconocer cambios ambientales y traducirlos en diversos aspectos, como el crecimiento y la síntesis de moléculas, entre muchas otras respuestas. Probablemente, la compleja integración de estas señales, a través de rutas compartidas o de reguladores hormonales transcripcionales dependientes en gran parte del genotipo (Franklin, 2009), sean hipótesis más contundentes, para explicar los resultados diferenciales de M1 y M2, en vez de una respuesta simple y aislada a uno de cada uno de estos dos factores.

Por lo anterior, los hallazgos del presente trabajo, denotan la importancia de considerar la oferta de luz, cuando se decide sembrar estevia en el Caribe Húmedo colombiano, pero además, comprueban que es necesario también reflexionar acerca del efecto de las temperaturas máximas y mínimas que, al aumentar a niveles prudentes, favorecerían la síntesis de GT en M1 y tendrían, a su vez, un efecto directo sobre la inducción de la floración en ambos genotipos, que es, precisamente, la época donde más se concentran los glucósidos en la vacuola (Fukuda *et al.* 2009; Balasubramanian *et al.* 2006; Chatsudthipong & Muanprasat, 2009).

Rebaudiósido A y relación rebaudiósido A/OG: La tabla 3 muestra que, en términos generales, los contenidos de RebA y la relación RebA/OG varían en sentido contrario de la RFA y las temperaturas, de tal manera que valores altos de las tres variables ambientales inducirían valores bajos de RebA y de RebA/OG. Lo anterior sugiere que, el aumento de los GT, discutidos en el acápite anterior y las mermas de RebA, observados en este, se da como consecuencia de un aumento significativo de OG ( $p \leq 0.05$ ), pero no de RebA, cuando se aumentan los niveles de RFA y las temperaturas. Situación particular presentaría M1 que aumentaría la concentración de RebA y St en la misma proporción, al incrementarse los niveles de radiación (Tabla 2).

Los principales glucósidos de esteviol, se sintetizan en la medida que se dan glucosilaciones sucesivas en la molécula de esteviol (Wang, 2009); su orden de síntesis son esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido o rubusósido, esteviósido, rebaudiósido B y rebaudiósido A, este último, vía esteviósido o rebaudiósido B (Jones *et al.* 2003; Lim *et al.* 2003; Meßner *et al.* 2003). Las enzimas que catalizan estas glucosilaciones, se denominan UDP-glucosiltransferasas (UGT), UGT74G1, UGT76G1 y UGT85C2 y los genes involucrados en su síntesis son una pequeña nueva sub-familia. Según Richman *et al.* (2005), la importancia de lo anterior radica en que cada una de estas enzimas cataliza una reacción de glucosilación diferente, de acuerdo al grupo que reciba la molécula del azúcar activo; así, la transferencia de la glucosa a un grupo hidroxilo es catalizada por UGT85C2 en el paso de esteviol

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson  $N=36$  y  $Pr > |r|$  de variables ambientales y de calidad de la hoja de dos genotipos de estevia cultivados en tres ambientes del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

	RFA (MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )		Tmax (°C)		Tmin (°C)		Media ± SD	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
GT (g/100 g hs)	0,62<0,00	0,55 0,00	0,71<0,00	NS	0,57 0,00	NS	0,14±0,0	0,15±0,0
RebA (g/g GT)	NS	-0,46 0,004	-0,50 0,001	-0,60 0,000	-0,58 0,000	-0,51 0,001	0,71±0,0	0,76±0,0
RebA/OG	NS	-0,43 0,008	-0,57 0,000	-0,59 0,000	-0,65 <0,000	-0,51 0,001	2,71±0,8	3,32±0,8
Media ± SD	18,4±2,6		32,8±0,7		23,7±0,4			

GT=Glucósidos totales; hs=hoja seca; RebA=rebaudiósido A; OG=otros glucósidos; RFA=Radiación fotosintéticamente activa; Tmax=Temperatura máxima; Tmin=Temperatura mínima; SD=Desviación estándar. NS=No significativo ( $p>0.05$ ).

a esteviolmonósido; a un grupo carboxilo es catalizada por UGT74G1 en el paso de esteviolbiósido a esteviósido y a otro azúcar es catalizada por UGT76G1, en el paso de esteviósido a rebaudiósido A.

No existen referentes bibliográficos que determinen el efecto de las variables ambientales sobre la síntesis diferencial de los principales glucósidos en *Stevia rebaudiana*; por lo tanto, al considerar que las enzimas involucradas en la formación de estas moléculas no fue evaluada en el presente trabajo, los resultados de esta investigación sugerirían que los estímulos recibidos con altos niveles de RFA en M2 y de temperaturas en ambos genotipos, probablemente, intervinieron diferencialmente en la actividad enzimática de las UGT, favoreciendo la ruta de la síntesis de OG respecto a la de RebA. Lo anterior, se podría sustentar por los reportes de Reyes & Martínez (2001), quienes indicaron que las diferencias en cuanto al tipo de respuesta, demuestran la plasticidad genotípica de los individuos en ambientes heterogéneos, ajustando su morfología y su fisiología y que las bases genéticas de esta plasticidad, pueden ser complejas al interactuar diferentes tipos de genes.

**Agradecimientos:** Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores John Alarcón y Andrés Llanos, del Laboratorio de Control de Calidad, de la empresa Prodalysa Ltda., en Chile y en Colombia, respectivamente, por su colaboración decidida en el análisis de las muestras de contenido de glucósidos totales. **Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados

presentados. **Financiación:** Este estudio fue financiado por la Universidad de Córdoba.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALONZO-TORRES, M. 2007. Uso del Kaa Hee en la horticultura. En: Producción de hortalizas todo el año. Mod. IV. Producción de Kaa Hee. Provincia de Formosa. Argentina 13p.
- ANGSTRÖM, A. 1924. Solar and terrestrial radiation. Q.J. Royal Meteorol. Soc. 50:121-126.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SURESHKUMAR, S.; LEMPE, J.; WEIGEL, D. 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. PLoS Genetics. 2(7):e106:0980-0989.
- BALOCH, J.; KHAN, M.; ZUBAIR, M.; MUNIR, M. 2009. Effects of different photoperiods on flowering time of facultative long day ornamental annuals. Int. J. Agric. Biol. 11:251-256.
- BARATHI, N. 2003. Stevia - The calorie free natural sweetener. Natural Product Radiance. 2:120-122.
- BRANDLE, J.E.; ROSA, N. 1992. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Can. J. Plant Sci. 72:1263-1266.

7. BRANDLE, J.E.; TELMER, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochem.* 68:1855-1863.
8. BRANDLE, J. 2004. FAQ - Stevia, Nature's Natural Low Calorie Sweetener. Disponible desde Internet en: Agriculture and Agri-Food Canada. [http://res2.agr.ca/London/faq/stevia\\_e.htm](http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm) (con acceso 17/11/06).
9. BRANDLE, J.E.; STARRATT, A.N.; GIJZEN, M. 2000. *Stevia rebaudiana*: its biological, chemical and agricultural properties. Disponible desde Internet en: [http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia\\_rev.html](http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia_rev.html) (con acceso 02/06/2000).
10. CARAKOSTAS, M.C., CURRY, L.L.; BOILEAU, A.C.; BRUSICK, D.J. 2008. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Tox.* 46:S1-S10.
11. CEUNEN, S.; WERBROUCKB, S.; GEUNS, J. 2012. Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. *J. Plant Physiol.* 169:749-752.
12. CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol. Therapeut.* 121:41-54.
13. DACOME, A.; DA SILVA, C.; DA COSTA, C.; FONTANA, J.; ADELMANN, J.; DA COSTA, S. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem.* 40:3587-3594.
14. DE OLIVEIRA, B.H.; PACKER, J.F.; CHIMELLI, M.; DE JESÚS, D.A. 2007. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *J. Biotechn.* 131:92-99.
15. FRANKLIN, K.A. 2009. Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Curr. Opin Plant Biol.* 12:63-68.
16. FUKUDA, M.; MATSUO, S.; KIKUCHI, K.; MITSUHASHI, W.; TOYOMASU, T.; HONDA, I. 2009. The endogenous level of GA1 is upregulated by high temperature during stem elongation in lettuce through LsGA3ox1 expression. *J. Plant Physiol.* 166:2077-2084.
17. GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; SIMONETTI, P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* 1217:1463-1470.
18. GEETA, G.; MIDMORE, D. 2010. Influence of soil water, pH and photoperiod on the growth of stevia (*Stevia rebaudiana*). Disponible desde Internet en: [http://www.cqu.edu.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0012/50403/2010\\_CPWS\\_Annual\\_Report\\_FINAL.pdf](http://www.cqu.edu.au/_data/assets/pdf_file/0012/50403/2010_CPWS_Annual_Report_FINAL.pdf) (con acceso 10/07/2012).
19. GEUNS, J.M. 2003. Stevioside. *Phytochem.* 64: 913-921.
20. GUENTHER, A.; ZIMMERMAN, P.; WILDERMUTH, M. 1994. Natural volatile organic compound emission rate estimates for U.S. woodland landscapes. *Atmosph. Environm.* 28(6):1197-1210.
21. GUEVARA-GARCÍA, A.; SAN ROMÁN, C.; ARROYO, A.; CORTES, M.; DE LA LUZ GUTIÉRREZ-NAVA, M.; LEÓN, P. 2005. Characterization of the arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell.* 17(2):628-643.
22. HEARN, L.K.; SUBEDI, P.P. 2006. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* 22:165-168.
23. HOLDRIDGE, L.R. 1967. Life Zone Ecology. Tropical Science Center. San José, Costa Rica. Traducción del inglés por Humberto Jiménez Saa: Ecología Basada en Zonas de Vida, 1ª. ed. 1982. San José, Costa Rica. IICA. 149p.
24. JARMA, A.; RENGIFO, T.; ARAMENDIZ, H. 2006. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe Colombiano. II. Efecto de la radiación incidente sobre los índices de crecimiento. *Agr. Col.* 24(1):38-47.
25. JARMA, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Col. Sc. Hort.* 2(1):109-120.
26. JONES, P.; MESSNER, B.; NAKAJIMA, J.I.; SCHÄFFNER, A.R.; SAITO, K. 2003. UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavanol glycoside

- biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 45: 43910-43918.
27. KIM, K.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. 1996. Hydroxylation of ent-Kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni – Purification and partial characterization of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 332(2):223-230.
  28. KIM, J.; CHOI, Y.H.; CHOI, Y. 2002. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. En: Kinghorn, A.D. (Ed.). *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY. p.196-202.
  29. KOINI, M.A.; ALVEY, L.; ALLEN, T.; TILLEY, C.A.; HARBERD, N.P.; WHITELAM, G.C.; FRANKLIN, K.A. 2009. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. Curr. Biol. 19:408-413.
  30. LANDÁZURI, P.A.; TIGRERO, J.O. 2009. Generalidades. En: Landázuri, P.A.; Tigrero, J.O. (Eds.). *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Bol. Téc. Ed. Especial. ESPE. Sangolquí, Ecuador. 38p.
  31. LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURABRAVO, L.; AH-HEN, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem. 132:1121-1132.
  32. LIM, E.K.; HIGGINS, G.S.; LI, Y.; BOWLES, D.J. 2003. Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained in planta. Biochem. J. 373:987-992.
  33. LIU, J.; JIN-WEI, L.; JIAN, T. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. Food Bioprod Process. 88(2-3):215-221.
  34. MEßNER, B.; THULKE, O.; SCHÄFFNER, A.R. 2003. Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. Planta. 217:138-146.
  35. MIYAZAKI, Y.; WATANABE, H.; WATANABE, T. 1978. The cultivation of *Stevia rebaudiana*. III. Yield and stevioside content of 2 year old plants. Eisei shikensho hokoku. 96:86-89.
  36. MIZUTANI, K.; TANAKA, O. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, p.178-195.
  37. MIZUKAMI, H.; SHIBA, K.; OHASHI, H. 1983. Effect of temperature on growth and Stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. Shoyakugaku Zasshi. 37:175-179.
  38. NEPOVIM, A.; DRAHOSOVA, H.; VALICEK, P.; VANEK, T. 1998. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. Pharmaceut. Pharmacol. Lett. 8:19-21.
  39. PALENCIA, G.; MERCADO, T.; COMBATT, E. 2006. Estudio Agro-meteorológico del Departamento de Córdoba. Gráficas del Caribe Ed. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba. Montería - Córdoba. 126p.
  40. PARSONS, P. 2003. Stevia-too good to be approved. Organic NZ. 62:26.
  41. PIMENTEL-GOMES, F. 1985. Curso de estatística experimental. 8ª ed. Nobel. Sao Paulo – Brasil. 450p.
  42. RANK, A.; MIDMORE, D. 2002. A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners. Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), Kingston, Australia. 26p.
  43. RAMESH, K.; SINGH, V.; MEGEJI, N.W. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: A comprehensive review. En: *Advances in Agronomy*. Academic Press. San Diego, California – USA Vol. 89. 360p.
  44. REYES, J.M.; MARTÍNEZ, D. 2001. La plasticidad de las plantas. Elementos: Cie. Cult. 8(41):39-43.
  45. RICHARD, D. 2004. “*Stevia rebaudiana*: Nature’s Sweet Secret,” Blue Heron Press. Bloomingdale, IL USA. p.1-80.
  46. RICHMAN, A.; SWANSON, A.; HUMPHREY, T.; CHAPMAN, R.; MCGARVEY, B.; POCS, R.; BRANDLE, J. 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. Plant J. 41:56-67.

47. SIDDIQUE, A.B.; AMZAD HOSSAIN, M.; MIZANUR RAHMAN, S.M. 2010. Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian J. Trad. Med.* 5(2):56–61.
48. SOEJARTO, D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, p.18-39.
49. SUMIDA, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resources in Japan. *Kenkyu hokoku. J. Central Agr. Exp. Sta. Nogyo Shikenjo.* 31:1-71.
50. WANG, X. 2009. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Letters.* 583:3303-3309.
51. WARNER, R. 2007. Grouping crops can save you money. Disponible desde Internet en: <http://www.flor.hrt.msu.edu/assets/PdfAttachments/Groupingcropscansaveyoumoney.pdf> (con acceso 10/07/12).
52. YERMAKOV, Y.I.; KOCHETOV, A.A. 1996. Specificities of the growth and development of stevia. *Russ. Agr. Sci.* 1:9-11.

Recibido: Julio 3 de 2012

Aceptado: Septiembre 29 de 2012

# GROWTH IN PARTIALLY DEFOLIATED STRAWBERRY PLANTS CULTIVATED IN THE TROPICAL HIGHLANDS

## CRECIMIENTO EN PLANTAS DE FRESA PARCIALMENTE DEFOLIADAS CULTIVADAS EN LOS ALTIPLANOS TROPICALES

Fánor Casierra-Posada <sup>1\*</sup>, Israel D. Torres <sup>2</sup>, Donald H. Riascos-Ortíz <sup>3</sup>

<sup>1</sup>I.A. Ph.D. Pedagogical and Technological University of Colombia UPTC, Faculty of Agricultural Sciences. Plant Ecophysiology Research Group. Avenida Central del Norte, Tunja / Colombia. \*Corresponding author: fanor.casierra@uptc.edu.co, <sup>2</sup>I.A., UPTC; <sup>3</sup>I.A., M.Sc. UPTC.

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15 (2): 349 - 355, 2012

### SUMMARY

Plants may undergo partial defoliation due to natural or accidental factors. The present study presents the results of an experiment to determine the effects of partial defoliation on the growth of strawberry plants (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Chandler') in Tunja, Colombia. Three defoliation levels were applied to plants after transplanting: 38% defoliation, 67% defoliation, and a control without defoliation. Water uptake, dry matter distribution among different plant organs, leaf area, and total dry weight were measured. Using this information it was possible to calculate leaf area ratio (LAR), leaf weight ratio (LWR), absolute and relative growth rates, and water use efficiency. All variables evaluated showed reduced values as a result of defoliation, which indicates that strawberry plants are sensitive to defoliation levels above 38% and show severely compromised growth as a result.

Key words: *Fragaria × ananassa*, dry matter, leaf area, growth analysis

### RESUMEN

Debido a factores naturales o accidentales, las plantas pueden experimentar defoliación parcial. Se presentan los resultados de un experimento orientado a determinar el efecto de la defoliación parcial sobre el crecimiento de plantas de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Chandler'), realizado en Tunja, Colombia. Se aplicaron tres niveles de defoliación, de 0 (control), 38 y 67%, desde el inicio de la brotación de hojas luego del trasplante. Se determinó la toma de agua, la distribución de materia seca en los diferentes órganos, el área foliar y el peso seco total. Con esta información, se

calculó la relación de área foliar, la relación de peso foliar, las tasas de crecimiento absoluto y relativo, así como también la eficiencia en el uso del agua. Todas las variables evaluadas mostraron valores reducidos como consecuencia de la defoliación, lo que indica que las plantas de fresa son sensibles a niveles de defoliación por encima de 38%, con lo cual el crecimiento se ve seriamente comprometido.

Palabras clave: *Fragaria × ananassa*, materia seca, área foliar, análisis del crecimiento

### INTRODUCTION

Cultivated plants are exposed to natural factors such as hail, wind, insect attacks, and disease, as well as human accidents like the incorrect application of herbicides or damage caused by machinery, all of which can cause different types of defoliation (Muro *et al.* 2000). Defoliation causes a reduction in growth, in productivity, and in the quality of the harvested product (Albregts *et al.* 1992). The degree of reduction in quality and growth depends on the nature of the defoliation and the development phase of the crop at defoliation (Muro *et al.* 2000).

Defoliation in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) showed to have negative effects on root growth, on biomass of inflorescences, and on leaf nitrogen content. In fact, while dry matter in roots was reduced as a result of defoliation, leaf production was not affected. Shifting biomass distribution from roots to leaf production is thus seen as a mechanism for compensating reduced leaf area (Pietikäinen *et al.* 2009). Kiwi, *Actinidia deliciosa*, is affected by defoliation presenting lower fruit weight, starch concentration in branches and

trunk bark, and total soluble carbohydrates in branches (Cruz-Castillo *et al.* 2010).

In strawberry plants, defoliation not only affects growth but also fruit quality. In the Flamenco cultivar, defoliation did not affect production quantity of marketable fruits, though there was a modification in the production peak (Whitehouse *et al.* 2009). But this was the exception; the majority of cultivars evaluated by these authors reduced total production as a consequence of defoliation. In the Camarosa cultivar the highest production and growth were achieved in intact strawberry plants as compared to defoliated plants (Mohamed, 2002). Plant size at the beginning and middle of the season and fruit size are also all affected when strawberry plantlets are subjected to severe defoliation in the moment of transplanting (Albregts *et al.* 1992).

Strawberry is an important crop in Colombia, grown mainly in the cooler highland regions. Over the past 20 years, both area planted and total production of strawberry in Colombia have experienced massive increases, achieving levels of some 1300 ha and 40000 tons in 2010. The most important departments in terms of strawberry production are Cundinamarca, Antioquia, and Norte de Santander (Agronet, 2012).

While Whitehouse *et al.* (2009) suggest that more studies are needed to evaluate whether defoliation might be a useful agronomic tool in order to avoid high temperatures that reduce flowering in many varieties, Richards (1993) mentioned that it is necessary to learn more about how physiological functions are altered in defoliated plants in order to understand their reaction and recovery after such a disturbance.

The present study thus aimed to evaluate growth in partially-defoliated strawberry plants of the 'Chandler' cultivar grown in the tropical high plains.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in greenhouse conditions at the Pedagogical and Technological University of Colombia in Tunja, located at 5° 33' 56,66" N and 73° 21' 23,68" W coordinates, at an altitude of 2691 meters above sea level. Inside the greenhouse average temperature was 16.2°C, with 71.8% relative humidity and a photosynthetic photon flow density of 521.7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Light intensity in the greenhouse was low due to a number of factors. Tunja tends to have overcast skies due to its highland equatorial climate. This was even more the case in the year when the experiment was carried out, as El Niño/La Niña oscillations made for even more rain than usual. Finally, the greenhouse at the UPTC University underwent an ill-advised overhaul some years ago

in which the glass was painted white to limit heat buildup. For all of these reasons, the present experiment occurred under relatively low light conditions.

The planting material used were plantlets from 'Chandler' variety strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) that had been exposed to temperatures of  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  during two weeks prior to planting. This treatment was intended to overcome bud dormancy and thus coordinate sprouting. At the time of transplanting 20 plantlets were set aside to assess leaf area and dry weight as a baseline for final growth measurements.

Plantlets were placed in four-liter glass containers filled with a nutrient solution with the following composition in  $\text{mg L}^{-1}$ : nitrate nitrogen 40.3; ammonium nitrogen 4.0; phosphorus 20.4; potassium 50.6; calcium 28.8; magnesium 11.4; sulfur 1.0; iron 1.12; manganese 0.112; copper 0.012; zinc 0.0264; boron 0.106; molybdenum  $1.2\text{E}^{-3}$ , and cobalt  $3.6\text{E}^{-4}$ . To avoid hypoxic root conditions, air was constantly bubbled into the nutrient solution.

Upon the appearance of each leaf, one or two of its leaflets were removed, thus achieving defoliation of 38% or 67% respectively. Control plants grew intact, with no leaflets removed. This procedure was carried out once every two weeks on recently-emerged leaves.

The experiment lasted seven months, at the end of which dry weight of the different plant organs (dried in an 80°C oven) was measured. Leaf area was determined with a Li-cor 3000A analyzer (LI-COR Biosciences, USA). With this information it was possible to calculate the leaf area ratio (LAR), leaf weight ratio (LWR), specific leaf area, root/shoot ratio, harvest index (harvestable dry matter), absolute growth rate, and relative growth rate, based on the procedures outlined by Hunt (1990). Net assimilation rate was calculated based on the methodology reported by Vernon & Allison (1963). Every week the amount of water missing from the containers was measured, and taken as the water consumed by the plant. Water use efficiency (WUE) was calculated as the amount of dry matter produced per liter of evapotranspired water (Briggs & Shantz, 1914).

The experiment had a totally-randomized one-factor design in which plants underwent 38% and 67% defoliation (one or two leaflets removed per leaf, respectively). The results of these treatments were compared to control plants that were not subjected to defoliation. Each treatment consisted in 20 plants, and analyses were performed individually for each plant. In this way each plant was taken as a repetition ( $N=20$ ). The data obtained was subjected to a classical variance analysis ( $p < 0.05$ ) and Tukey's range test using the program PASW (Predictive Analytics Software) version 18.0.0 (30-07-2009; IBM Corporation, Somers – USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

Intact, non-defoliated plants developed a leaf area of 1033.94cm<sup>2</sup> on average, while plants subjected to defoliation treatments presented leaf area values 636.86 and 332.82cm<sup>2</sup>, giving defoliation levels of 38% and 67% as opposed to the 33% and 67% that might be expected from the removal of a third or two thirds of leaflets. The leaf area values obtained under different treatments represent reference values to better understand the other parameters evaluated in this study.

Reekie (Reekie, J.Y., Wageningen, Holanda: personal communication) found that early removal of leaves at transplanting reduced the leaf area and plant size necessary for strawberry plants to begin flower formation, and thus cultivars 'Sweet Charlie' and 'Camarosa' experienced delayed entry in production. By the same token, early removal of 75% of leaf area was excessive and reduced plant vigor. The same trend applied to the results of the present study, since treatments with 38% and 67% defoliation reduced fruit number per plant by 12.0% and 28.4%, respectively, which suggests a depressive effect of defoliation on flower induction.

The root/shoot ratio and specific leaf area showed no significant difference between treatments. In leaf area ratio highly significant differences were found ( $p < 0.01$ ) between control plants and those subjected to 67% defoliation, but not between control plants and 38% defoliated plants (Table 1). In this parameter, removal of 67% of leaf area led to a reduction of 18.6% in the value of leaf area ratio as compared to control plants. Leaf weight ratio also acted similarly to the rest of the variables analyzed, since it diminished with increasing defoliation intensity, with statistically significant differences. The removal of 38% and 67% of leaf area induced a reduction of 13.1% and 30.6% in the value of leaf weight ratio as compared to control plants (Table 1).

Water consumption showed statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) and decreased with defoliation intensity. Average values encountered for water uptake were reduced 31.2% and 51.3% compared to control plants in plants undergoing 38% and 67% defoliation, respectively.

The reduction in water consumption in defoliated plants was the result of lower area for transpiration. On this topic, Hicklenton & Reekie (2002) and Reekie (Reekie, J.Y.: personal communication) found that in partially defoliated strawberry plants, water loss was considerably lower than in non-defoliated plants, while stomatal conductance was greater in plants with intact foliage. On the other hand, in the present study it was observed that there was no difference in LAR value between control plants and 38% defoliated plants. This is possibly due to the compensation mechanism through which the assimilate export from source organs is increased and preferentially allocated to growing sink organs in the aerial part of the plants, which reestablishes photosynthesis in leaves after defoliation (Richards, 1993). This mechanism initiates mere hours after defoliation. Furthermore, when actively growing tissues are removed, available assimilates can accumulate in other sink tissues.

No statistically significant difference was found for net assimilation rate values. Absolute growth values and relative growth values showed similar tendencies, and their average value was reduced as defoliation intensified, with statistically significant differences ( $p < 0.01$ ). Absolute growth rate was reduced 35.5% and 61.9% as compared to control plants in plants suffering 38% and 67% defoliation, respectively. In the same way, relative growth rate was reduced by 17.7% and 38.5%, respectively.

The differences in relative growth rate can be the consequence of specific demands imposed on plants under different crop conditions. When plants are subjected to conditions that cause partial defoliation, there is an instantaneous reduction

Table 1. Growth indices, water uptake, and leaf area found in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* cv. 'Chandler') subjected to partial defoliation ( $N=20$ ).

Defoliation (%)	Leaf area ratio (m <sup>2</sup> )	Leaf weight ratio (g g <sup>-1</sup> )	Absolute growth rate (g d <sup>-1</sup> )	Relative growth rate (g g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Water uptake (L)	Leaf area (cm <sup>2</sup> )
Control	2.1E <sup>-3</sup> a	0.18 a	0.21 a	7.5 E <sup>-3</sup> a	11.09 a	1033.94 a
38	2.1 E <sup>-3</sup> a	0.16 b	0.14 b	6.1 E <sup>-3</sup> b	7.63 b	636.86 b
67	1.7 E <sup>-3</sup> b	0.12 c	0.08 c	4.6 E <sup>-3</sup> c	5.39 c	332.82 c

The information corresponds to average values. Averages accompanied by the same letter showed no statistically significant difference according to the Tukey range test ( $p < 0.01$ ).

in photosynthesis (Richards, 1993). Furthermore, with reduced carbon gain, the translocation of carbon from source tissues is slowed, as is charging activity in the phloem. This explains the reduction in absolute and relative growth rates found in the present study, seeing as these growth variables are calculated based on the dry mass accumulated over time, which is drastically diminished as a result of defoliation. In addition, Richards (1993) reported that the immediate effects of defoliation depend mainly on its intensity, and are related principally to the degree of photosynthesis reduction and carbon uptake in the entire plant.

In relation to the distribution of dry matter in different plant organs, highly significant differences were found ( $p < 0.01$ ) in all organs, except for the dry matter assigned to roots and flowers. While the proportion of dry matter assigned to leaves and petioles decreased with more intense defoliation, dry matter accumulation in crown and fruits increased (Figure 1).

Through various studies undertaken on C3 and C4 plants tolerant to defoliation, it has been shown that root elongation stops in the span of 24 hours after removal of over 40% of leaf area, and also that the ratio between photosynthesis and transpiration is drastically reduced. Root respiration under these conditions is rapidly reduced, but the magnitude of this reduction is lower in roots than in aerial parts of the plant. On the other hand, nutrient absorption is also rapidly reduced after defoliation. The speed with which root respiration and nutrient uptake are reduced depends on the magnitude of the defoliation (Richards, 1993). Despite these findings, in the present study dry matter accumulation in strawberry roots did not show significant differences. This corresponds to the findings of Richards (1993), who suggests that carbon

assignment to the roots can continue after defoliation, since roots are strong sinks in some plants.

It must be kept in mind that growth and productivity in strawberry plants depends in large part not only on dry matter formation but also on its distribution in different plant organs (Reekie, J.Y.: personal communication). Defoliation of strawberry plants in the present study represented a challenge to the functions of growth and fruit production under conditions of reduced leaf area and the low illumination found in the greenhouse for the aforementioned reasons ( $521.7 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Hence defoliated plants had to modify their pattern of dry matter assignment. Plants naturally adjust their development to what the environment offers, in order to assure survival and production (Bazzaz & Grace, 1997). In response to the availability of resources, the plant can assign more dry matter to the roots when light is limiting, or to leaves and petioles when water or nutrients are limiting. Hence a plant will be successful if it develops a morphology that allows it to maximize metabolism and physiological functions (Reekie, J.Y.: personal communication).

In everbearing cultivars of strawberry such as ‘Chandler’, production is determined by the number of crowns per plant and by the duration of the production period (Wilson & Dixon, 1988), for which reason in the present study it was found that plants exposed to defoliation assigned more dry matter to fruits and crowns. Nevertheless, this reassignment of dry matter to fruits and crowns in defoliated plants was not sufficient to attain a substantial increase in the weight of fruit produced. Compared to control plants, total fruit production was 24.4% and 48.7% lower in plants subjected to 38% and 67% leaf area reduction, respectively, because defoliation drastically reduced fruit size. Darnell & Hancock

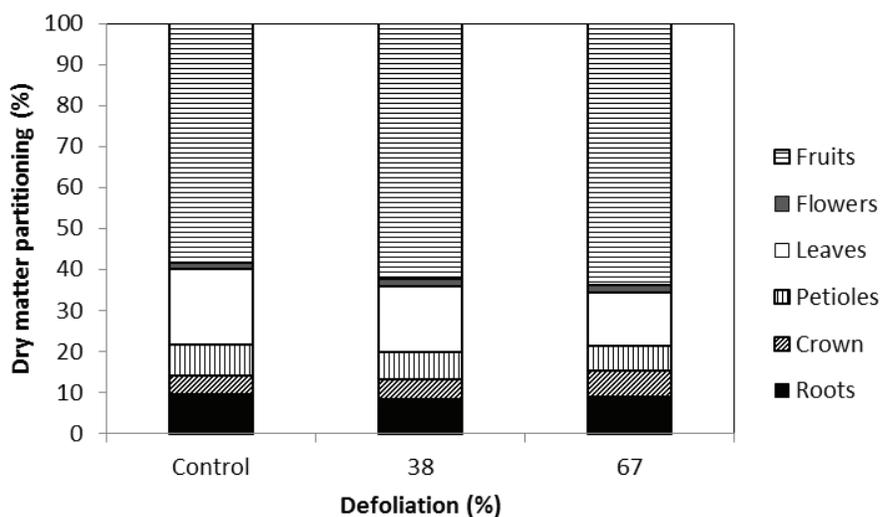


Figure 1. Dry matter distribution in partially-defoliated strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. ‘Chandler’ (N=20)

(1996) reported that the optimal dry matter distribution in strawberries, as well as a high rate of CO<sub>2</sub> assimilation, are determining factors for high fruit production. These conditions were not fulfilled in the present study, since both total dry matter per plant and total fruit production were negatively affected by defoliation. This suggests alterations in the rates of photosynthesis and respiration that limited both growth and fruit production.

The increase in dry matter allocation to fruits as leaf area decreased can be seen as a consequence of the competition between vegetative and reproductive organs, since it has been reported that in the strawberry cultivar 'Tribute' leaf formation is limited by fruiting (Schaffer *et al.* 1986). In cultivar 'Elsanta', Pérez de Camacaro *et al.* (2002) found that the greatest vegetative growth occurred after fruiting. Thus under the vigor-limiting conditions created by defoliation, fruits should represent a stronger sink than leaves, attracting more photosynthates in this way. Some authors have demonstrated the relationship between leaf area and fruit production, and that this relationship influences flavor, as higher leaf area leads to greater total soluble solids (Carlen *et al.* 2007). However, this trend is not the same in all cultivars or in all locations (Crespo *et al.* 2010).

Dry weight per plant was drastically reduced as a consequence of defoliation. Treatments of 38% and 67% defoliation reduced this value by 34.1 and 58.6%, respectively, in relation to control plants, with highly significant differences ( $p < 0.01$ ) (Figure 2).

Reduction in total dry matter production was due to the loss of vigor of strawberry plants as a result of defoliation. In fact, defoliation negatively affected growth and yield factors, and as a result total dry weight production per plant was seriously compromised. To the contrary, Anten & Ackerly (2001) showed that in partially-defoliated palm plants there was an increase in light interception by the fronds and an increase in the unit leaf rate, which allowed an increase in photosynthetic rate. The increase in unit leaf rate is considered to be a compensatory mechanism to make up for growth losses caused by defoliation (Anten *et al.* 2003). According to these authors, the physiological changes caused by defoliation, which increase unit leaf rate and photosynthesis, are important for improving growth and dry matter production. On the other hand, Kerkhoff *et al.* (1988) found an increase in net photosynthesis in strawberry plants after partial defoliation, due to a compensation mechanism in the remaining plant tissue. Nevertheless, Morrison & Reekie (1995) specify that defoliation does not always lead to increases in photosynthesis rate.

There was no statistically-significant difference found between control plants and those undergoing 38% defoliation in terms of water use efficiency (WUE), but there was a difference between these two treatments and the 67% defoliated plants ( $p < 0.01$ ), with a decrease of 14.8% in the latter group as compared to the control plants (Figure 3).

Reduction in leaf area diminished both water uptake and dry matter production in the plants of the present study,

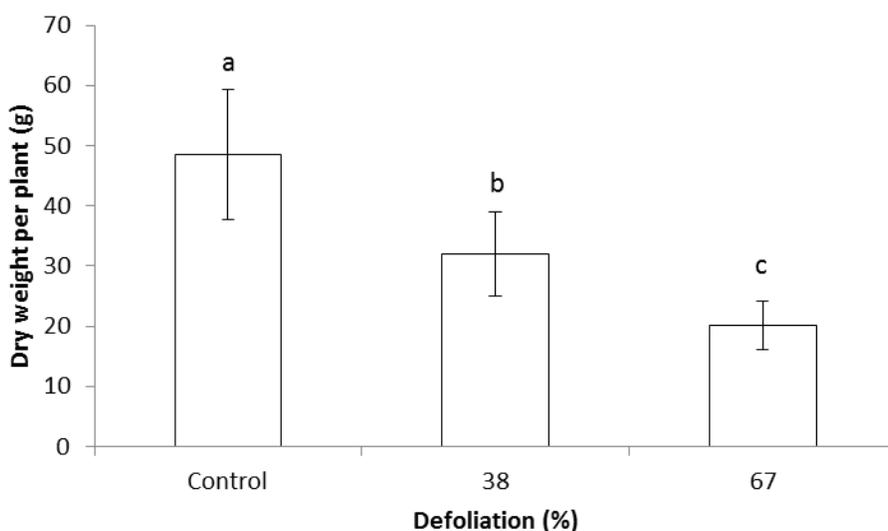


Figure 2. Dry weight per plant in partially-defoliated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Chandler' (N=20). Averages accompanied by the same letter showed no statistically significant difference according to the Tukey range test ( $p < 0.01$ ).

which follows the affirmations of Khan *et al.* (2002) that photosynthetic efficiency in water use decreased in partially-defoliated mustard plants. Furthermore, partial defoliation triggers the emergence of new leaves to make up for the loss in leaf area. These new leaves have a different saturation point compared with the older ones, which have lower stomatal conductance due to lower CO<sub>2</sub> provision to chloroplasts. This lowers net photosynthesis, which ultimately causes a reduction in biomass production. These findings corroborate those of Hicklenton & Reekie (2002), who found that in partially-defoliated strawberry plants, both water loss and stomatal conductance were reduced in comparison to intact plants. Thus the alteration in stomatal conductance, water loss, and photosynthesis rate as a result of defoliation negatively affected WUE of strawberry in the present study.

Defoliation at the levels evaluated caused a decrease in growth in 'Chandler' variety strawberry plants directly proportional to the intensity of defoliation. Nevertheless, in partially-defoliated plants there was a modification in the pattern of dry matter allocation as defoliation intensified, with less dry matter assigned to petioles and leaves, and more dry matter destined for crowns and fruits. This suggests a mechanism developed by strawberry plants exposed to partial defoliation to compensate the loss of leaf area and thus guarantee survival.

**Acknowledgments:** The team gratefully acknowledges the generous support of the Research Directorate (Dirección de Investigaciones – DIN) of the Pedagogical and Technological

University of Colombia (IPTC) for providing us with the funding and opportunity to conduct this research project. A very special thanks goes out to the members of the Research Group in Plant Ecophysiology (Grupo Ecofisiología Vegetal) of the Faculty of Agricultural Sciences of the IPTC. **Conflict of interest:** The manuscript was prepared and reviewed with the participation of all authors, who declare the absence of interest conflicts that jeopardizes the validity of the results presented.

## BIBLIOGRAPHY

1. AGRONET, 2012. Producción nacional por producto: Fresa. Report. Consulted online August 29, 2012 at: <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticas/ReportesEstad%C3%ADsticos.aspx>
2. ALBREGTS, E.E.; HOWARD, C.M.; CHANDLER C.K. 1992. Defoliation of strawberry transplants for fruit production in Florida. HortSci. 27(8):889-891.
3. ANTEN, N.P.R.; ACKERLY, D.D. 2001. Canopy-level photosynthetic compensation after defoliation in a tropical understory palm. Funct. Ecol. 15:252-262.
4. ANTEN, N.P.R.; MARTÍNEZ-RAMOS, M.; ACKERLY, D.D. 2003. Defoliation and growth in an understory palm: quantifying the contributions of compensatory responses. Ecol. 84:2905-2918.

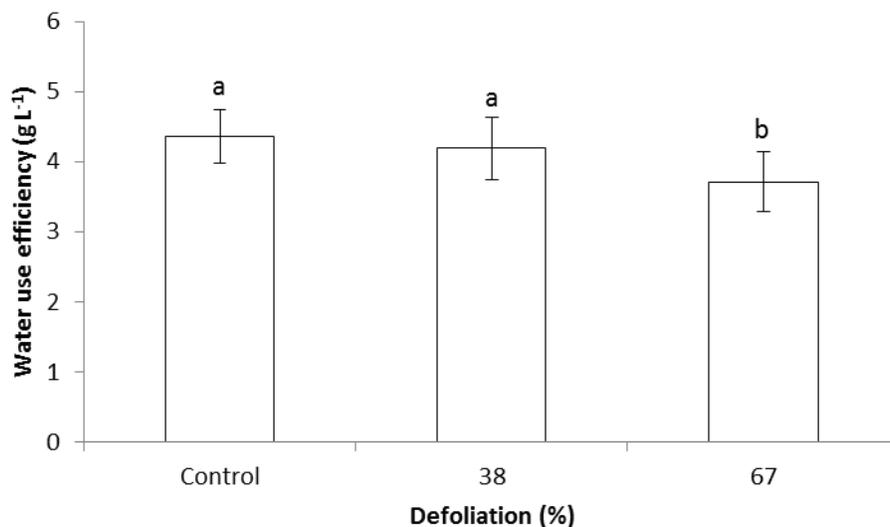


Figure 3. Water use efficiency in partially-defoliated strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. 'Chandler' (N=20). Averages accompanied by the same letter showed no statistically significant difference according to the Tukey range test ( $p < 0.01$ ).

5. BAZZAZ, F.A.; GRACE, J. 1997. Plant Resource Allocation. Academic Press, San Diego, CA. 303p. strawberry cultivars grown under high tunnel. Acta Hort. 567:483-485.
6. BRIGGS, L.J.; SHANTZ, H.L. 1914. Relative water requirements of plants. Research. 3:1-63.
7. CARLEN, C.; POTEI A.M.; ANÇAY, A. 2007. Influence of leaf/fruit ratio of strawberry plants on the sensory quality of their fruits. Acta Hort. 761:121-126.
8. CRESPO. P.; BORDONABA, J.G.; TERRY, L.A.; CARLEN, C. 2010. Characterization of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. Food Chem. 122:16-24.
9. CRUZ-CASTILLO, J.G.; WOOLLEY, D.J.; FAMIANI, F. 2010. Effects of defoliation on fruit growth, carbohydrate reserves and subsequent flowering of 'Hayward' kiwifruit vines. Sci. Hort. 125:579-583.
10. DARNELL, R.L.; HANCOCK, J.F. 1996. Balancing vegetative and reproductive growth in strawberry. Proc. IV North American Strawberry Conference. p.144-150.
11. HICKLENTON, P.R.; REEKIE, J.Y.C. 2002. The nursery connection: exploring the links between transplant growth and development, establishment, and productivity. In: Hokanson, S.; Jamieson, A. (eds). Strawberry research to 2001. Alexandria: ASHS. p.136-146.
12. HUNT, R. 1990. Basic growth analysis. UbWin IMAN. Londres. 112p.
13. KHAN, N.A.; KHAN, M.; ANSARI, H.R.; SAMIULLAH. 2002. Auxin and defoliation effects on photosynthesis and ethylene evolution in mustard. Sci. Hort. 96:43-51
14. KERKHOFF, K.L.; WILLIAMS, J.M.; BARDEN, J.A. 1988. Net photosynthetic rates and growth of strawberry after partial defoliation. HortSci. 23:1086-1088.
15. MOHAMED, F.H. 2002. Effect of transplant defoliation and mulch color on the performance of three
16. MORRISON, K.D.; REEKIE, E.G. 1995. Pattern of defoliation and its effect on photosynthetic capacity in *Oenothera biennis*. J. Ecol. 83:759-767.
17. MURO, J.; IRIGOYEN, I.; LAMSFUS, C.; MILITINO, A.F. 2000. Effect of defoliation on garlic yield. Sci. Hort. 86:161-167.
18. PIETIKÄINEN, A.; MIKOLA, J.; VESTBERG, M.; SETÄLÄ, H. 2009. Defoliation effects on *Plantago lanceolata* resource allocation and soil decomposers in relation to AM symbiosis and fertilization. Soil Biol. Biochem. 41:2328-2335.
19. PÉREZ DE CAMACARO, M.E.; CAMACARO, G.J.; HADLEY, P.; BATTEY, N.H.; CAREW, J.G. 2002. Pattern of growth and development of the strawberry cultivars Elsanta, Bolero and Everest. J. Am. Soc. Hort. Sci. 127:901-907.
20. RICHARDS, J.H. 1993. Physiology of plants recovering from defoliation. Proc. XVII international grassland congress. Palmerston North, N.Z. p. 85-94.
21. SCHAFFER, B.; BARDEN, J.A.; WILLIAMS, J.M. 1986. Net photosynthesis, dark respiration, stomatal conductance, specific leaf weight, and chlorophyll content of strawberry plants as influenced by fruiting. J. Am. Soc. Hort. Sci. 111:82-86.
22. VERNON, A.J.; ALLISON, J.C.S. 1963. A method of calculating net assimilation rate. Nature. 200:814.
23. WILSON, F.; DIXON, G.R. 1988. Strawberry growth and yield related to plant density using matted row husbandry. J. Hort. Sci. 63:221-227.
24. WHITEHOUSE, A.B.; JOHNSON, A.W.; SIMPSON, D.W. 2009. Manipulation of the production pattern of everbearing cultivars by defoliation treatments. Acta Hort. 842:773-776

Received: 28 February 2012

Accepted: 3 September 2012

# RESPUESTA DEL CULTIVO DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.) A LA APLICACIÓN DE NÍQUEL

## PEA CROP (*Pisum sativum* L.) RESPONSE TO THE NICKEL APPLICATION

Miguel Ángel López Murcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Docente investigador. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. milopez@udca.edu.co.

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 357 - 362, 2012

### RESUMEN

El níquel (Ni), se considera el último de los micronutrientes esenciales para las plantas superiores, debido a su participación en la enzima ureasa; sin embargo, a la fecha son pocas las investigaciones orientadas a conocer su influencia en el crecimiento y en la producción de los cultivos. Con el fin de determinar la respuesta de la arveja a la aplicación de Ni, se realizó el montaje de un experimento en la Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas U.D.C.A, donde se evaluaron, como tratamientos, cuatro dosis de Ni: 0,0; 2,0; 4,0 y 6,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni. La investigación, se adelantó en el marco de un diseño en bloques completos al azar. Las plantas fueron sembradas en materas con arena lavada de río, como sustrato. Los resultados demuestran que la aplicación de 2,0 mg L<sup>-1</sup> Ni promueve una mayor producción de masa seca total, así como un mayor número de vainas por planta y un mayor número de granos por vaina; no obstante, estos resultados no son estadísticamente significativos. Las concentraciones foliares de Ni variaron cercana a 0,0, en el testigo y 13,73 mg kg<sup>-1</sup>, en el tratamiento 6,0 mg L<sup>-1</sup> Ni. Las concentraciones cercanas a 5,0 mg kg<sup>-1</sup> estuvieron asociadas al mayor crecimiento en las plantas de arveja.

Palabras clave: Crecimiento, producción, dosis, concentración, foliar.

### SUMMARY

Nickel (Ni) is considered the last of the essential micronutrient for higher plants because of its participation in the urease enzyme. However, to date there is little research regarding its influence on growth and crop production. With the aim to determine the response of pea plants to the application of Ni, a test was performed in the installation at the University of Applied and Environmental Sciences U.D.C.A, were four treatments were analyzed, being the doses of Ni: 0.0, 2.0;

4.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> Ni. The research was conducted in a randomized complete block design. The plants were seeded in pots containing washed river sand as a substrate. The results showed that the application of 2.0 mg L<sup>-1</sup> promoted increased production of total dry mass, represented by the number of pods per plant and the number of grains per pod. However, these results were not statistically significant. The foliar concentrations of Ni ranged from close to 0.0 in the control and 13.73 mg kg<sup>-1</sup> in the treatment 6.0 mg L<sup>-1</sup>, concentrations near 5.0 mg kg<sup>-1</sup> were associated with higher growth in pea plants.

Key words: Growth, production, dose, concentration, leaf.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de arveja en Colombia ha sido, por varios años, el regulador de la economía de pequeños y de medianos productores de zonas andinas, con áreas de producción, concentradas en los departamentos de Cundinamarca, de Boyacá, de Nariño y del Tolima (Buitrago *et al.* 2006). Fenalce (2010) reporta un área cosechada para 2008 igual a 26.826 hectáreas, con una producción calculada de 80.000t de vaina, para consumo fresco y 1.200t de arveja seca, para semilla.

El conocimiento acerca del papel del níquel (Ni) en la nutrición, en la fisiología y en el metabolismo de la mayoría de especies cultivadas en la actualidad es limitado (Bai *et al.* 2006) y la influencia de este elemento en el crecimiento, en el rendimiento y en la concentración foliar del cultivo de arveja, hasta la fecha, es poco conocida.

La evidencia de esencialidad del Ni para las plantas superiores no es un tema reciente, mas aún, se remonta a la década de los 70, del siglo XX, cuando ya un grupo de investigadores planteaban la posible función del níquel en el metabolismo

del nitrógeno, a través de su participación en la estructura de la enzima ureasa (Dixon *et al.* 1975).

El níquel, como elemento, está químicamente relacionado con el hierro y con el cobalto. Su estado de oxidación en los sistemas biológicos es  $Ni^{2+}$ , aunque también puede existir como  $Ni^+$  y  $Ni^{3+}$  (Marschner, 1995). El níquel es constituyente funcional de siete enzimas, seis, de las cuales, se presentan en bacterias y en animales, mientras que sólo una, ureasa (urea amidohidrolasa, EC 3.5.1.5), se manifiesta en plantas (Brown, 2006). La participación constitutiva del Ni en la estructura de la ureasa fue documentada, por primera vez, por Dixon *et al.* (1975), luego de su aislamiento y descripción a partir de *Canavalia ensiformis* L.

La ureasa es una metaloenzima ubicua (presente en todas partes) (Malavolta & Moraes, 2007), conformada por seis subunidades esféricas idénticas, cada una de ellas con dos átomos de níquel (Dixon *et al.* 1980; Hirai *et al.* 1993). Aunque se considera que el níquel no es requerido para la síntesis de la ureasa, este elemento es un componente metálico esencial en la estructura y en la función catalítica de esta enzima (Hirai *et al.* 1993; Marschner, 1995).

La deficiencia de níquel en leguminosas y en otras dicotiledóneas ocasiona una disminución en la actividad de la enzima ureasa, condición que provoca la acumulación de niveles tóxicos de urea y se manifiesta como una necrosis en la punta de las hojas (Eskew *et al.* 1983; Walker *et al.* 1985; Malavolta & Moraes, 2007). En soya, niveles bajos de Ni en el suelo pueden disminuir la nodulación y el rendimiento en semilla, fenómeno que se explica por la participación del Ni en la enzima hidrogenasa de las bacterias nitrificantes (Brown, 2006).

En Colombia, Almanza *et al.* (2009) evaluaron la respuesta de *Cucurbita ficifolia* a la aplicación de dosis crecientes de Ni. Los resultados indican que todas las dosis evaluadas (1,0, 2,5 y 5,0 mg  $L^{-1}$  Ni) ocasionan algún nivel de toxicidad; sin embargo, la dosis de 5,0 mg  $L^{-1}$  de Ni provocó la abscisión total de las flores. Los autores reportan una relación directamente proporcional entre la dosis de Ni aplicada y la cantidad de ureasa presente en las semillas.

El nivel crítico foliar de Ni varía según la especie, pero, en general, para especies no acumuladoras, se considera un rango adecuado entre 1 y 10 mg  $kg^{-1}$ , con base a materia seca (Marschner, 1995) y en valores superiores a 25 mg  $kg^{-1}$ , provocan toxicidad en especies no acumuladoras (Malavolta & Moraes, 2007), evidente a través de distorsiones en el crecimiento del sistema radical y en los brotes foliares (Brown, 2006). Especies hiperacumuladoras pueden llegar a presentar concentraciones de Ni del orden del 1 al 5%, en base a materia seca (Brown, 2006).

El objetivo de esta investigación fue conocer la influencia de la aplicación de níquel en el crecimiento, componentes del rendimiento y concentración foliar de nutrientes en plantas de arveja (*Pisum sativum* L.).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación, se desarrolló en las instalaciones de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, ubicada a 4°47'57" N y 74°02'40", a 2560 msnm, temperatura promedio de 14,5°C y 860mm de precipitación media anual con régimen bimodal, durante un ciclo del cultivo de arveja.

Se sembraron semillas certificadas de arveja variedad Santa Isabel, en materas plásticas, con capacidad de seis litros; se utilizó como sustrato arena de río lavada. Las plantas crecieron en condiciones de campo abierto y con manejo agronómico tradicional para manejo de plagas, de enfermedades y de prácticas culturales, de acuerdo a Buitrago *et al.* (2006). Para el manejo de la fertilización y la nutrición del cultivo, se empleó, en todos los tratamientos, la solución completa de Hoagland (Epstein, 2005), con una frecuencia de aplicación de tres veces por semana, a una dosis de 150cc/matera, en cada aplicación.

La investigación, se enmarcó en un diseño experimental de bloques completos al azar, con cuatro tratamientos y tres réplicas o bloques por tratamiento, para un total de 12 unidades experimentales, conformada, cada una, por 18 plantas de arveja. A los 30 días de emergencia, se sortearon los tratamientos y se aplicó a cada planta, de acuerdo al tratamiento, 0,0; 2,0; 4,0 y 6,0mg de Ni  $L^{-1}$  de solución, a una dosis de 200cc/planta. Como fuente de níquel, se usó  $NiSO_4 \cdot 7H_2O$  grado comercial del 27,4% de Ni. En este estudio, las dosis de níquel se aplicaron una sola vez durante el ciclo y constituyeron los tratamientos.

Un muestreo destructivo, inmediatamente antes de la aplicación de los tratamientos, fue adelantado, con el fin de determinar variables iniciales de peso seco de raíz, tallo, hojas, total y área foliar. Se ensayó sobre una planta por unidad experimental y los datos obtenidos, a partir del muestreo se analizaron estadísticamente, con el propósito de descartar diferencias iniciales entre tratamientos.

Posterior a la aplicación de la solución con níquel, se realizaron muestreos de una planta por unidad experimental, con el objetivo de determinar en laboratorio masa seca por órganos y total y, de esta manera, monitorear el efecto del níquel en el crecimiento de la arveja; la frecuencia de dichos muestreos fue quincenal. Los valores de masa seca obtenidos a partir de estos muestreos, se emplearon para determinar, posteriormente, los índices y las curvas de crecimiento, de acuerdo a cada tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se presenta la dinámica de ganancia y de acumulación de masa seca por plantas de arveja, sometidas a diferentes dosis de Níquel (Ni). Esta figura muestra el crecimiento de tipo sigmoideal o logístico presente en todos los tratamientos; sin embargo, sobresale el tratamiento 2,0 mg L<sup>-1</sup>, ya que promueve, en mayor proporción, la acumulación de masa seca, efecto que se empieza a evidenciar de manera marcada, a los 80 días, después de emergencia (DDE).

En contraste, el tratamiento 6,0mg L<sup>-1</sup> presenta una efecto desestimulante en la producción de masa seca, respuesta que, en principio, se puede atribuir a una dosis excesiva de Ni, la cual, puede ocasionar síntomas leves de fitotoxicidad al interior de la planta y, por consiguiente, una disminución en la producción de masa seca (Epstein, 2005), respecto al testigo 0,0mg L<sup>-1</sup>.

El aumento en la masa seca, como respuesta de la aplicación de Ni, es un comportamiento ya antes reportado en otras especies, como Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) (Eman *et al.* 2007), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (Gad *et al.* 2007) y plántulas de Umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) (Caires *et al.* 2007).

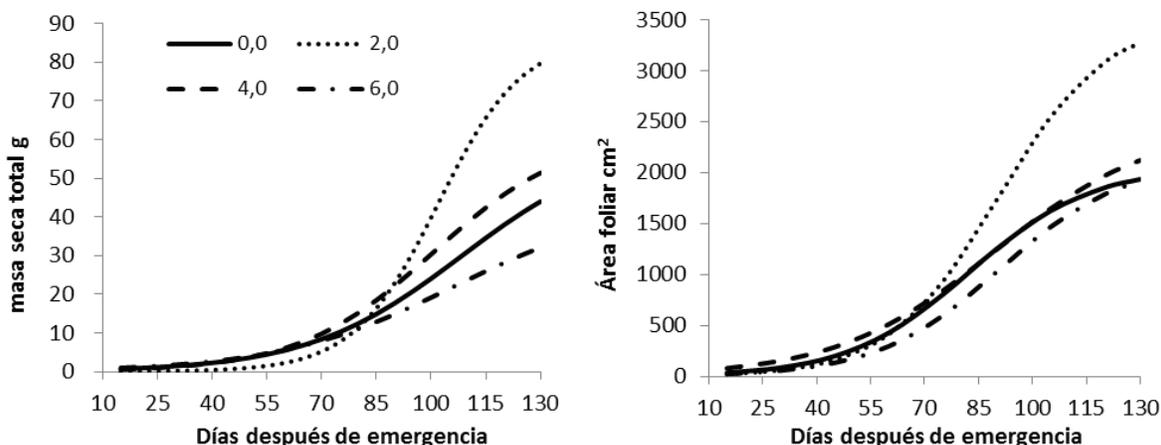


Figura 1. Dinámica de producción de masa seca y área foliar en plantas de arveja tratadas con diferentes dosis de níquel.

esta dosis de Ni, para producir nueva biomasa, a partir de una biomasa inicial, en un intervalo de tiempo. Así, estas elevadas TRC son las que permiten explicar los mayores niveles de producción de masa seca, por parte de las plantas del tratamiento 2,0mg L<sup>-1</sup>.

Una mayor producción de masa seca en un mismo lapso de tiempo, como consecuencia de la adición de Ni, puede resultar en un mayor rendimiento por unidad de área, debido a que, posteriormente, una proporción de esta materia seca

La figura 1 también presenta la dinámica de crecimiento del área foliar de plantas de arveja tratadas con diferentes dosis de Ni. Para este caso y al igual que para la masa seca, la aplicación de 2,0mg L<sup>-1</sup> promueve un incremento importante en el área foliar de las plantas de arveja, con valores que superan en más de 800cm<sup>2</sup> el área foliar de los demás tratamientos, incluyendo el testigo.

La estimulación en la producción de área foliar ejercida por la aplicación de 2,0mg L<sup>-1</sup>, se podría relacionar de manera preliminar con un efecto positivo ejercido por el Ni sobre el metabolismo del nitrógeno y, en específico, sobre la metabolización de la urea (Marschner, 1995; Azcon-Bieto & Talón, 2000; Epstein, 2005), fenómeno que favorecería la metabolización y la conversión del N-ureico a N-orgánico o aminoácidos.

En la figura 2, se detalla el efecto de la aplicación de dosis crecientes de Ni en los índices de crecimiento: tasa de crecimiento relativo (TRC), tasa absoluta de crecimiento (TAC), tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de crecimiento del cultivo (TCC) de plantas de arveja. Sobresale las elevadas TRC obtenidas en el tratamiento 2,0mg L<sup>-1</sup> durante los primeros 70-75 DDE, comportamiento que indica una elevada habilidad por parte de las plantas tratadas con

debe ser distribuida hacia las vainas u órganos de interés agronómico.

Con respecto a los demás tratamientos, se observa un comportamiento similar entre el testigo 0,0mg L<sup>-1</sup> y para la dosis máxima evaluada 6,0mg L<sup>-1</sup>. Así, la adición de Ni a dosis de 6,0mg L<sup>-1</sup> no favorece la nueva producción de biomasa en plantas de arveja con respecto a plantas con ausencia de este elemento.

A partir de la figura 2, se establece que para todos los tratamientos, la época en la que ganan mayor masa seca por unidad de tiempo se encuentra entre los 95 y 105 DDE, resultados que permiten inferir que este tiempo es particularmente crítica para el manejo del cultivo, si se considera que cualquier condicion adversa que afecte la fisiología o el estado general de la planta ocurrida en este lapso va a disminuir de manera fuerte la produccion de masa seca de la planta y, por ende, su rendimiento potencial.

La tasa de asimilación neta TAN es una medida de la eficiencia fotosintética promedio de las plantas y mide la habilidad del vegetal para producir masa seca por cada unidad de área foliar, que capta luz en un determinada unidad de tiempo (Hunt, 1978). En la figura 2, se observa el efecto de adición de diferentes dosis de Ni sobre la TAN de plantas de arveja. Al respecto, se aprecia que los tratamientos 0,0 y 6,0mg L<sup>-1</sup> presentan un comportamiento descendente a lo largo del tiempo, con altos niveles de producción de biomasa por unidad de área foliar al inicio del cultivo, que van descendiendo, progresivamente, a medida que avanza el tiempo. Este descenso, según la literatura, se atribuye a la generación de autosombreamiento entre plantas (Hunt, 1978).

Por último, la figura 2 muestra la respuesta de la tasa de crecimiento del cultivo TCC en arveja a la adición de diferentes dosis de Ni.

Al igual que en las otros índices de crecimiento, la aplicación de Ni en dosis de 2,0mg L<sup>-1</sup> estimula la producción de masa seca, por una comunidad de plantas de arveja. Sobresale los elevados valores de TCC, reportados por todos los tratamientos entre los 95-105 DDE, época que, como ya se había mencionado, es crucial en la definición de la máxima producción y acumulación de biomasa por planta.

En contraste, la adición de 6,0mg L<sup>-1</sup> ejerce un efecto desestimulante en la producción de biomasa por la comunidad de plantas de arveja en un lapso de tiempo definido. De esta manera y según los resultados aquí presentados, dosis superiores a 2,0mg L<sup>-1</sup> no suponen una ventaja comparativa respecto a la no adición de Ni, en el cultivo de arveja (Figura 1).

En la tabla 1, se presenta el efecto de la aplicación de Ni en los componentes del rendimiento del cultivo: número de vainas por planta (NVP), peso fresco de la vaina (PFV), número de granos por vaina (NGV) y peso fresco de cien

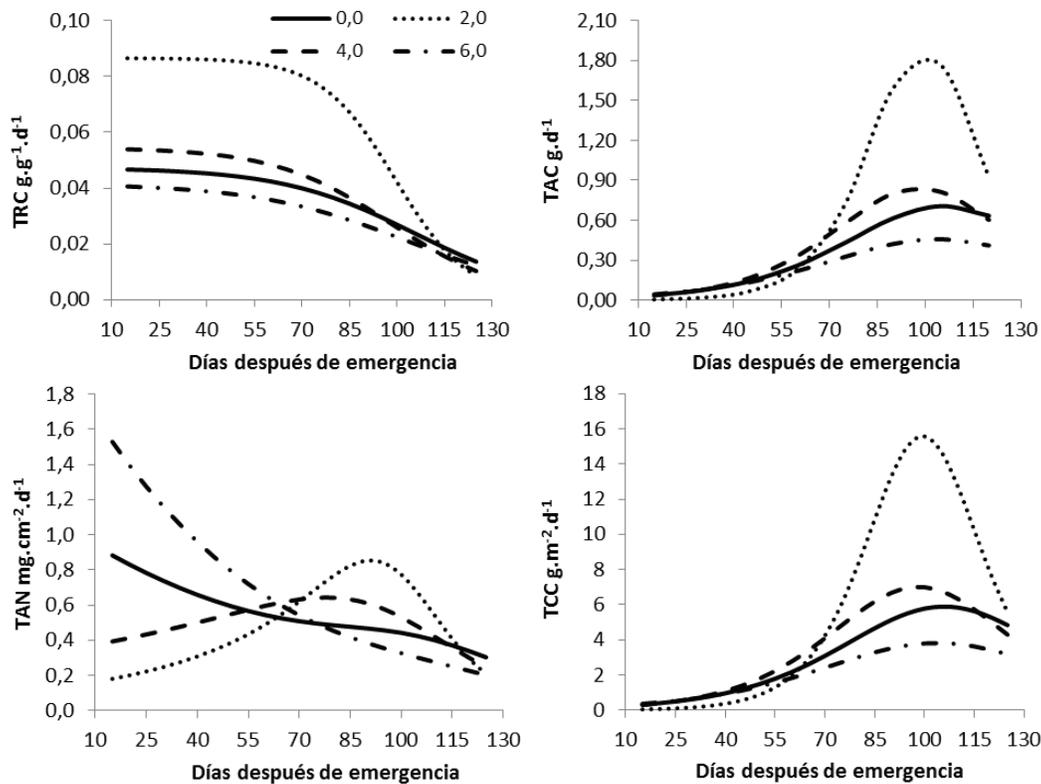


Figura 2. Respuesta de los índices de crecimiento tasa relativa de crecimiento, tasa absoluta de crecimiento, tasa de asimilacion neta y tasa de crecimiento del cultivo de plantas de arveja a la aplicación de diferentes dosis de níquel.

granos (PCG). Sobresale la respuesta positiva ejercida por la aplicación de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni en el número de vainas por planta y el número de granos por vaina, con incrementos porcentuales respecto al testigo sin aplicación de 52,2 y 13,4, respectivamente; sin embargo, estos incrementos no son estadísticamente significativos (Tabla 1).

El número de vainas por planta es una variable correlacionada de manera positiva con el rendimiento y además una de las características deseables en los procesos de mejora genética (Pacheco *et al.* 2010). Según González & Ligarreto (2006), el rendimiento en arveja voluble depende de la compensación de sus componentes, siendo el número de vainas el de mayor incidencia.

Con respecto a las variables peso fresco de la vaina (PFV) y peso fresco de cien granos (PCG), no se presentan diferencias estadísticas significativas (Tabla 1). No obstante, el PCG del tratamiento 2,0mg L<sup>-1</sup> de Ni es el menor de todos los tratamientos evaluados, comportamiento que seguramente es el resultado de un proceso de autorregulación de los componentes del rendimiento del cultivo y, por tanto, una consecuencia visible del incremento de otros componentes, como el NVP y el NGV.

En la tabla 2, se presentan las concentraciones foliares con base a masa seca de cada tratamiento. Los resultados indican que el mayor crecimiento y producción de vainas en las plantas de arveja evaluadas en esta investigación, se encuentra asociado a concentraciones foliares iguales a 4,41mg kg<sup>-1</sup>, valor coherente con los niveles planteados como adecuados para la mayoría de especies vegetales, según Marschner (1995).

De acuerdo a los resultados de la tabla 2, también se plantea que concentraciones de Ni iguales a 8,70mg kg<sup>-1</sup> no reportan una ventaja comparativa respecto a la no adición de Ni en las variables de crecimiento y de producción evaluadas. Entre tanto, la aplicación de 6,0mg L<sup>-1</sup> de Ni se asocia con concentraciones foliares del elemento iguales a 13,73mg kg<sup>-1</sup>, niveles que, de acuerdo a los resultados de esta investigación, se asocian con depresión en el crecimiento y en la producción de la arveja y, probablemente, con inicios de toxicidad.

A partir de los resultados de la investigación, se puede concluir que la aplicación de Ni en dosis de 2,0mg L<sup>-1</sup> promueve un incremento en la producción de masa seca y número de vainas por planta en arveja. Estos aumentos

Tabla 1. Efecto de la aplicación de níquel en los componentes del rendimiento del cultivo de arveja (nvp: número de vainas por planta; pfv: peso fresco de la vaina; ngv: número de granos por vaina; pcg: peso fresco de cien granos; de: desviación estándar).

Dosis de Ni mg L <sup>-1</sup>	NVP	DE	PFV (g)	DE	NGV	DE	PCG (g)	DE
0,0	29,67	12,89	5,29	0,49	5,16	0,60	36,05	5,61
2,0	45,17	27,33	5,79	1,11	5,85	0,45	34,59	5,65
4,0	30,67	18,18	5,52	0,55	5,19	0,57	37,61	4,02
6,0	21,17	11,41	5,26	0,94	4,96	1,43	38,76	8,80
p>F*	0,236		0,665		0,282		0,617	

\* valor de probabilidad obtenida a partir del análisis de varianza.

Tabla 2. Contenidos de nutrientes en hojas de plantas de arveja tratadas con diferentes dosis de níquel.

Dosis de Ni mg L <sup>-1</sup>	N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Cu	Fe	Zn	Mn	B	Ni*
	----- % -----						----- mg kg <sup>-1</sup> -----						
0,0	2,59	0,18	1,10	0,93	0,21	0,02	0,21	4,50	91,50	55,50	22,30	22,60	0,0007
2,0	2,64	0,20	1,15	1,12	0,25	0,01	0,24	5,00	64,00	61,50	36,10	32,10	4,41
4,0	2,07	0,17	0,95	1,67	0,21	0,01	0,20	3,70	76,50	70,90	44,40	31,10	8,70
6,0	2,52	0,19	0,82	0,86	0,22	0,01	0,19	4,70	82,70	56,60	25,60	18,50	13,73

\*Extraído a partir de digestión seca y cuantificado por absorción atómica.

aunque son biológicamente importantes con respecto al testigo sin aplicación, no son estadísticamente significativos.

**Agradecimiento:** A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, por la financiación de la investigación.

**Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado por el autor, quien declara que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALMANZA, P.J.; ROJAS, H.A.; BORDA, G DEL C.; GALINDO, A.R.; GALINDO, D.R. 2009. Aplicación foliar de níquel en *Cucurbita ficifolia* Bouché para producción de ureasa (EC 3.5.1.5) cristalina. Agr. Col. 27(1):33-40.
- AZCON-BIETO, J.; TALÓN, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. Barcelona. p.83-97.
- BAI, C.; REILLY, C.; WOOD, B.W. 2006. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organicaAcids of young pecan foliage. Plant Physiol. 140:433-443.
- BROWN, P.H. 2006. Nickel. In: Barker, A.V; Pilbeam, D.J. (eds.). Handbook of Plant Nutrition. CRC Press: Taylor & Francis Group, Boca Raton. p.329-350.
- BUITRAGO, J.Y.; DUARTE, C.J.; SARMIENTO, A. 2006. El cultivo de la arveja en Colombia. Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas-FENALCE y Fondo Nacional Cerealista. Ed. Produmedios. Bogotá. Colombia. 83p.
- CAIRES, O.S.; DE OLIVEIRA, E.V.; DE CARVALHO, J.G.; FONSECA, C.R. 2007. Adição de níquel na solução nutritiva para o cultivo de mudas de umbuzeiro. Rev. Bras. Cienc. Solo. 31:485-490.
- DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, R. 1975. Jack bean urease. A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. J. Am. Chem. Soc. 97:4131-4133.
- DIXON, N.E.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, R.. 1980. Jack-Bean urease III. The involvement of active site Ni ion in inhibition by b mercaptoethanol and phosphoramidate, and fluoride. Can. J. Biochem. 58:481-488.
- EMAN, A.; GAD, N.; BADRAN, N. 2007. Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of *Hibiscus sabdariffa* L. Australian J. Basic Appl. Sci. 1(2):73-78.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. 2005. Mineral nutrition of plant: principles and perspectives. Ed. Sinauer Associates, inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 380p.
- ESKEW, D.L.; WELCH, R.M.; CARY, E.E. 1983. Nickel an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. Science. 222:621-623.
- FENALCE. 2010. El cultivo de la arveja, historia e importancia. El Cerealista. 93:32-35.
- GAD, N.; EL-SHERIF, M.H.; EL-GEREENDLY, N.H.M. 2007. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. Australian J. Basic Appl. Sci 1(3):286-293.
- GONZÁLEZ, F.; LIGARRETO, G.A. 2006. Rendimiento de ocho genotipos promisorios de arveja arbustiva (*Pisum sativum* L.) bajo sistema de agricultura protegida. Fitotecn. Col. 6(2):5 2-61.
- HIRAI, M.; KAWAI-HIRAI, R.; HIRAI, T.; UEKI, T. 1993. Structural change of jack bean urease induced by addition of surfactants studied with synchrotron-radiation small-angle X-ray scattering. Eur. J. Biochem. 215:55-61.
- HUNT, R. 1978. Plant growth analysis. Edward Arnold Publishers. London. p.8-38.
- MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F. 2007. Nickel - from toxic to essential nutrient. Better Crops With Plant Food. 91(3):26-27.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press. 889p.
- PACHECO, C.A.; VERGARA, M.C.; LIGARRETO, G.A. 2010. Clasificación de 42 líneas mejoradas de Arveja (*Pisum sativum* L.) por caracteres morfológicos y comportamiento agronómico. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 63(2):5543-5553.
- WALKER, CD.; GRAHAM, RD.; MADISON, JT; CARY, E.E.; WELCH, RM. 1985. Effects of nickel deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiol 79:474-479.

Recibido: Marzo 15 de 2012

Aceptado: Agosto 27 de 2012

# EFECTO DE INDUCTORES DE RESISTENCIA SOBRE LAS SIGATOKAS NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* MORELET) Y AMARILLA (*Mycosphaerella musicola* LEACH) EN PLÁTANO

## EFFECT OF QUEMICAL INDUCERS OF DISEASE RESISTANCE TO BLACK (*Mycosphaerella fijiensis* MORELET) AND YELLOW SIGATOKAS (*Mycosphaerella musicola* LEACH) IN PLANTAIN

Carolina Ramírez<sup>1</sup>, Jairo Castaño<sup>2</sup>, Bernardo Villegas<sup>3</sup>, Manuel Aristizábal<sup>4</sup>

<sup>1</sup> I.A., klarl2000@gmail.com; <sup>2</sup> I.A., Ph.D. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Calle 65 N°26-10, Manizales, Caldas, Colombia, Autor para correspondencia: jairo.castano\_z@ucaldas.edu.co; <sup>3</sup> I.A. M.Sc. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, bernardo.villegas@ucaldas.edu.co; <sup>4</sup> I.A. M.Sc. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, manuel.aristizabal@ucaldas.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(12): 363 - 371, 2012

### RESUMEN

Se evaluó el efecto individual de los inductores de resistencia acibenzolar-s-metil y fosfito de potasio y en mezcla con propiconazole sobre la severidad de las Sigatokas negra y amarilla y el crecimiento y producción del plátano Dominic Harton (*Musa AAB*). Además, se determinó el impacto económico de los tratamientos. El estudio, se llevó a cabo en la granja Montelindo de la Universidad de Caldas, con precipitación anual de 2100mm, humedad relativa promedio del 76%, temperatura promedio de 23,5°C y altitud de 1010m. Los tratamientos generaron una situación fitosanitaria similar al manejo convencional. En términos de rendimiento, los tratamientos en los que se usó el inductor acibenzolar-s-metil en sus dos dosis (40 y 80mL ha<sup>-1</sup>) y en mezcla con el fungicida propiconazole (40 y 200mL ha<sup>-1</sup>, respectivamente), tuvieron diferencias de 6,0, 3,0 y 5,4t ha<sup>-1</sup>, respectivamente, con respecto al testigo no tratado; los tratamientos con fosfito de potasio y el fungicida solamente, no presentaron diferencia en cuanto a rendimiento, en comparación con el testigo.

Palabras clave: Severidad, rendimiento, acibenzolar-s-metil, fosfito de potasio.

### SUMMARY

The individual effect of resistance inducers acibenzolar-s-methyl and potassium phosphite and the mixture with propi-

conazole on the severity of black and yellow Sigatokas as well as on growth and production of Dominic Harton plantain (*Musa AAB*) was evaluated. Also the economic impact of the treatments was determined. The study was carried out at the 'Montelindo' farm (property of the Universidad de Caldas) with an annual rainfall of 2100mm, relative humidity of 76%, average temperature of 23.5°C and altitude of 1010m. Treatments caused a phytosanitary situation, similar to the conventional management; in terms of yield, those treatments with the two doses of acibenzolar-s-methyl (40 y 80mL ha<sup>-1</sup>) and in mixture with the fungicide propiconazole 40 y 200mL ha<sup>-1</sup>, showed differences of 6.0, 3.0 and 5.4t ha<sup>-1</sup> respectively, with respect to the untreated control; treatments with potassium phosphite and the fungicide alone did not show statistical difference with the control.

Key words: Severity, yield, acibenzolar-s-methyl, potassium phosphite.

### INTRODUCCIÓN

En 2010, Colombia participó con el 7,9% de la producción mundial de plátano y ocupó el tercer lugar entre los países con mayor producción, después de Uganda y de Ghana (FAOSTAT, 2012). El país presenta una ventaja comparativa en el rendimiento del cultivo, en el ámbito mundial, con 8,5t ha<sup>-1</sup>. Los departamentos de Antioquia, de Quindío, de Arauca, de Caldas, de Meta, del Valle, de Risaralda, del Tolima, de Nariño y del Cauca, en su orden, son los mayores pro-

ductores y representan el 72% de la producción y el 65% del área sembrada, que para el 2010 fue de 368.392ha (Agro-net, 2012).

Aunque varias especies de *Mycosphaerella* pueden estar involucradas en el complejo de Sigatokas del plátano (Arzanlou *et al.* 2008), las más destructivas, en la esfera nacional y mundial, son la Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, y la Sigatoka amarilla, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach; estos hongos atacan las hojas y provocan pérdidas de más del 50% en el rendimiento, ya que al no ser tratadas a tiempo el área foliar, fotosintéticamente activa, se reduce de manera considerable (Craenen & Ortiz, 2003).

En las plantaciones comerciales destinadas a la producción de banano y de plátano para exportación, se requieren entre 35 - 50 aspersiones anuales de fungicidas, para el control de las Sigatokas negra y amarilla (Chica *et al.* 2004). Debido a la acción nociva de los agroquímicos sobre el ambiente y la población rural, ha sido necesario desarrollar sistemas de producción con tecnologías limpias, es decir, con mínima aplicación de agroquímicos. Esto, a su vez, constituye un reto para los investigadores en búsqueda de esquemas más completos para el manejo integrado de estas enfermedades, que incluyan, por ejemplo, el empleo de inductores de resistencia (Patiño, 2002), que no muestran actividad micotóxica, pero, en unos casos, pueden tener acción de protección local inducida y, en otros, acción sistémica. Pueden ser de amplio espectro, puesto que pueden proteger las plantas contra enfermedades causadas por diversos patógenos, como hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y nematodos (Riveros, 2001).

La inducción de resistencia, a través de la aplicación de sustancias químicas sintéticas, puede ser una alternativa de control de enfermedades en diferentes cultivos, en los cuales, desencadenan señales que activan varias respuestas de defensa de las plantas (Kessmann *et al.* 1994; Sticher *et al.* 1997; Vallad & Goodman, 2004). Al respecto, compuestos conocidos como "fosfitos", derivados del ácido fosforoso y combinados con otros elementos, como calcio, manganeso, magnesio, potasio o zinc y utilizados normalmente como fertilizantes foliares, han demostrado que promueven el crecimiento y estimulan las plantas, al activar mecanismos de defensa contra enfermedades, como las sigatokas negra y amarilla, en plátano Dominic Hartón (Mogollón & Castaño, 2011) y el tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans*, en cultivos de papa (Johnson *et al.* 2004).

Los inductores químicos disponibles comercialmente más estudiados hasta ahora son el benzothiadiazol y el ácido 2,6-dicloroisonicotínico. La inducción sistémica de resistencia con estas dos moléculas ha sido registrada en varias in-

teracciones planta-patógeno, que presentaron reducciones entre el 32 y 99% en el área bajo la curva de progreso de la enfermedad, como por ejemplo, el uso de benzothiadiazol contra *Peronosclerospora sorghii*, causante del mildew velloso del maíz; *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, causante de la peca bacterial del tomat; Tomato spotted wilt tospovirus, causante del bronceamiento del tomate INA, para el control de *Uromyces appendiculatus*, causante de la roya del frijol y *Sclerotinia sclerotiorum*, causante del moho blanco de la soya (Vallad & Goodman, 2004).

Estudios citológicos demuestran que el efecto de protección ejercido por benzothiadiazol, se puede explicar por la reducción de la colonización fungosa de los tejidos, asociada con la acumulación masiva de gránulos de almidón en la pared celular, que actúan como barreras estructurales (Görlach *et al.* 1996). Este reforzamiento mediado por la deposición temprana de calosa y fenoles, probablemente, conduce a cambios, tanto en la rigidez como en la vulnerabilidad de las células y tejidos (Patiño, 2008). Görlach *et al.* (1996) determinaron que la tasa de penetración de *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* en tejido tratado con benzothiadiazol disminuyó en un 30%, debido, posiblemente, a la formación de papilas efectivas en el tejido tratado, que retardan la penetración del hongo.

El acibenzolar-s-metil (ASM), formulado especialmente para ser aplicado en emulsión de aceite-agua, es aplicado como complemento de fungicidas para el control de *M. fijiensis* y *M. musicola* a intervalos de 40 días. El ASM es absorbido por raíces, por hojas y por tallos y distribuido rápidamente por el xilema y el floema (Thomson, 2011). Según estudios realizados en plátano Dominic Hartón, el ASM aplicado a los cormos en inmersión (dosis de 0,005mL L<sup>-1</sup>), antes de siembra, indujo resistencia a las Sigatokas hasta los dos meses de edad de las plántulas (Márquez & Castaño, 2007). Patiño (2002) registró un aumento entre 30,4 y 22,2% en el control de *M. fijiensis* en banano aplicado, en dosis de 40 y 15g ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

El fungicida más utilizado en el mundo para el manejo de las Sigatokas es el propiconazole, que previene y controla los patógenos, ya que detiene su desarrollo e interfiere la síntesis del ergosterol en la membrana celular del patógeno. Este fungicida actúa en el momento de la penetración del hongo y, principalmente, en la formación de haustorios secundarios dentro de los tejidos de la planta (Thomson, 2011); sin embargo, su acción no ha sido comparada con la producida por los inductores.

El fosfito de potasio ha sido utilizado para el control, principalmente, de Oomycetes (Garbelotto *et al.* 2007) y, en menor grado, de nematodos (Salgado *et al.* 2007). Además de ejercer una acción directa sobre el patógeno interviene en

el metabolismo de la planta, mediante cambios hormonales y químicos, que incrementan el llenado de frutos y el rendimiento en cultivos de aguacate y de cítricos (Lovatt, 1999). Para el manejo de las Sigatocas negra y amarilla, se evaluó el fosfito de potasio en plántulas de plátano Dominic Hartón y se observó la reducción del grado de evolución de los síntomas y del índice de severidad, con resultados similares al fungicida propiconazole; sin embargo, el inductor y el fungicida actuaron sobre sistemas diferentes, el primero sobre el sistema de defensa de las plántulas y, el segundo, directamente en el patógeno (Mogollón & Castaño, 2011).

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de los inductores de resistencia ASM y fosfito de potasio (FP), sólo o en mezcla con propiconazole, para el manejo de las Sigatocas negra y amarilla en plátano Dominic Hartón (*Musa AAB Simmonds*); además de cuantificar el efecto sobre la producción del cultivo y el impacto económico de los tratamientos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio, se llevó a cabo en la granja 'Montelindo' de la Universidad de Caldas, ubicada en la vereda Santágueda, municipio de Palestina (Caldas), a 5° 05' N y 75° 40' W y una altitud de 1.010m, con precipitación anual de 2.100 mm, humedad relativa promedio de 76% y temperatura promedio de 23,5°C, suelos de textura franco arenosa, ligeramente ácidos, de origen volcánico de la clase *Typic Dstrandep* (Cardona *et al.* 2007).

Se sembraron cormos de plátano provenientes de la misma granja (500g de peso promedio), de la cultivariedad Dominic Hartón, a 3m entre surcos y 2m entre plantas, previamente tratados, mediante inmersión en carbofuran, como tratamiento preventivo para nematodos y picudos, en dosis de 10mL L<sup>-1</sup> de agua, durante una hora. Los surcos fueron separados cada uno por una barrera de plantas de la misma cultivariedad sembradas a 1m, para contrarrestar el efecto de deriva durante las aplicaciones de los tratamientos, que se realizaron con una aspersora de espalda marca Agrolaura® de 20L de capacidad, con boquilla de cono a bajo volumen.

Al cultivo se le hizo el adecuado y oportuno manejo agronómico, recomendado por Aranzazu *et al.* (2002) y, el cual, consistió en las siguientes prácticas: Manejo de arvenses: después de sembrados los cormos se integraron métodos químicos y mecánicos, mediante el uso de guadaña y de glifosato en dosis de 1,5L ha<sup>-1</sup> a los 3, 6 y 9 meses después de la siembra. Fertilización: se realizaron cinco aplicaciones de fertilizantes, teniendo en cuenta los requerimientos de nutrientes del cultivo de plátano (Martínez, 1997), de la siguiente manera: la primera, al momento de la siembra, con urea (25g sitio<sup>-1</sup>) y boro (10g sitio<sup>-1</sup>); con urea (50g planta<sup>-1</sup>),

fósforo (50g planta<sup>-1</sup>), cloruro de potasio (60g planta<sup>-1</sup>) y elementos menores (30g planta<sup>-1</sup>); la tercera, con urea (50g planta<sup>-1</sup>), cloruro de potasio (100g planta<sup>-1</sup>) y elementos menores (30g planta<sup>-1</sup>); para la cuarta, urea (50g planta<sup>-1</sup>), fósforo (50g planta<sup>-1</sup>), cloruro de potasio (100g planta<sup>-1</sup>) y elementos menores (30g planta<sup>-1</sup>) y, finalmente, una quinta, dirigida al hijo mayor, con urea (50g planta<sup>-1</sup>), cloruro de potasio (40g planta<sup>-1</sup>) y elementos menores (30g planta<sup>-1</sup>), las cuales, se realizaron a los 3, 6, 9 12 meses después de la siembra. Deshojos: se realizaron con machete o media luna, según la altura de las plantas, cada 15 días, en los meses lluviosos y mensualmente en los meses secos. Desguasque: consistió en retirar las calcetas viejas y se realizó trimestralmente. Desbellote y desmane: ambas prácticas se realizaron después de la emergencia de la bellota, aproximadamente, a los once meses de la siembra del cultivo; el desmane, se efectuó para dejar cinco manos por racimo.

Se usó un diseño de bloques completos al azar, con ocho tratamientos, cuatro repeticiones y ocho plantas por repetición. Los tratamientos fueron: 1) Acibenzolar-s-metil (40mL ha<sup>-1</sup>, mitad de dosis comercial); 2) Acibenzolar-s-metil (80mL ha<sup>-1</sup>, dosis comercial); 3) Fosfito de potasio (300mL ha<sup>-1</sup>); 4) Fosfito de potasio (500mL ha<sup>-1</sup>, dosis comercial); 5) Propiconazole (400mL ha<sup>-1</sup>, dosis comercial); 6) Acibenzolar-s-metil + Propiconazole (40 y 200mL ha<sup>-1</sup>, respectivamente); 7) Fosfito de potasio + Propiconazole (300 y 200mL ha<sup>-1</sup>, respectivamente) y, 8) Testigo (sin aplicación de productos y con deshoje fitosanitario).

Siguiendo las recomendaciones de Syngenta (Thomson, 2011), los inductores de resistencia se aplicaron cada seis semanas en ambas dosis, a partir de los tres meses después de la siembra, cuando las plántulas tenían las primeras hojas verdaderas bien desarrolladas, para un total de siete aplicaciones, durante el ciclo del cultivo. La aplicación de propiconazole sólo y en mezcla con ASM o FP, se realizó de acuerdo con el sistema de preaviso biológico (Aranzazu *et al.* 2002), consistente en la evaluación semanal del estado de desarrollo de las Sigatocas en el envés y extremo de la hoja No. 4, en diez plantas seleccionadas, desde su estado juvenil (aproximadamente, a los tres meses después de la siembra), las cuales, se reemplazaron al momento de la emisión de la bellota.

En la hoja No. 4, se determinó el estado más avanzado de la enfermedad y el grado del síntoma dominante y se calificó con menos (-), cuando se observaron hasta 50 lesiones por hoja y con más (+), cuando superaron las 50 lesiones (Orjeda, 1998). Al sumar los valores calificados en las 10 plantas se obtuvo el nivel de infección de la hoja de la respectiva semana; se hizo la aplicación del fungicida, cuando el nivel de infección de la hoja No. 4 (NIH4) aumentó en 200 unidades o más, con respecto a la lectura de la semana anterior (Gómez & Castaño, 2001).

Las variables evaluadas fueron:

**Índice de severidad (IS):** se hicieron registros semanales del área afectada de las hojas por las Sigatokas, con base en los diagramas de Stover (1971), modificados por Gauhl (1989), ya que en la zona de estudio se tiene establecida la predominancia de la sigatoka negra sobre la amarilla (Torrado & Castaño, 2008).

Con estos datos, se determinó el índice de severidad semanal en tres plantas por tratamiento y por repetición, con base en la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{\sum nb}{(N-1)T} \times 100$$

En la cual:

IS = Índice de severidad

n = Número de hojas en cada grado

b = Grado

N = Número de grados empleados en la escala (7)

T = Número total de hojas evaluadas.

**Tasa de desarrollo de la enfermedad (r):** se cuantificó mediante la siguiente fórmula:

$$r = \frac{1}{t_1 - t_0} \left( \log_e \frac{X_1}{1 - X_1} - \log_e \frac{X_0}{1 - X_0} \right)$$

Donde:

r = Tasa de desarrollo

$t_1$  = Tiempo final

$t_0$  = Tiempo inicial

$X_1$  = Índice de severidad final

$X_0$  = Índice de severidad inicial (Castaño, 2002)

**Cuantificaciones de crecimiento:** semanalmente, se hicieron registros de la altura y diámetro de las plantas; para tal fin, se tomaron cinco plantas al azar por repetición y se les midió su altura desde la base de la planta hasta el punto donde se forma el ángulo entre la hoja cigarro y la primera hoja expandida. El diámetro, se midió a 1m de altura desde la base de la planta, con la ayuda de un calibrador (Aristizábal & Herrera, 2003).

**Rendimiento ( $t \text{ ha}^{-1}$ ):** se obtuvo el peso promedio de los racimos extrapolado a  $1.660 \text{ plantas ha}^{-1}$  para determinar la relación beneficio-costo, a través de la siguiente fórmula:

$$B/C = IB/CP \text{ (Aristizábal, 2007)}$$

Donde:

B/C: relación beneficio-costo

IB: ingreso bruto

CP: costo de producción

Para este análisis, se cuantificaron los costos derivados del manejo de las sigatokas, así como los costos de las prácticas agronómicas realizadas.

Las variables relacionadas con el crecimiento y la producción de las plantas en los distintos tratamientos y repeticiones fueron sometidas a análisis de varianza; para la separación de promedios de tratamientos, cuando fue necesario, se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey al 95% de probabilidad. El índice de severidad fue calculado en el período vegetativo, en floración y en producción y los valores obtenidos, se sometieron a análisis de varianza y de prueba de comparación de Tukey. El nivel de infección en la hoja 4 (NIH4), se calculó semanalmente y los valores obtenidos se graficaron en el sistema de coordenadas en comparación con la precipitación acumulada semanalmente y registrada en una estación climática Tipo A, ubicada en un área adyacente al lote experimental. Para todos los análisis estadísticos, se empleó el programa SAS (Statistical Analysis System).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Índice de severidad (IS) de las Sigatokas:** según el análisis de varianza, solamente el testigo mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás tratamientos para el IS (Tabla 1), observándose que el IS más bajo para el período vegetativo se presentó en el tratamiento con FP en dosis de  $300 \text{ mL ha}^{-1}$ . Con la aplicación de FP, en ambas dosis, se observó una reducción significativa en el IS de la Sigatokas en comparación con el testigo (Tabla 1), lo que se puede deber a la acción del fósforo en forma de ion fosfito combinado con el potasio, que estimula el crecimiento de la planta al actuar sobre el sistema hormonal y promover los mecanismos de defensa naturales cuando la planta recibe señales a condiciones adversas (Thomson, 2011).

En floración, el mejor tratamiento fue con FP en dosis de  $500 \text{ mL ha}^{-1}$ , mientras que para el período reproductivo fue con ASM en dosis de  $40 \text{ mL ha}^{-1}$  (Tabla 1), esto demuestra una influencia positiva de ambos productos sobre el proceso de inducción de resistencia sistémica a las Sigatokas negra y amarilla en plátano Dominico Hartón; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Márquez & Castaño (2007) y Mogollón & Castaño (2011), quienes evaluaron, en estado de plántula de esta cultivariedad, el efecto de inductores de resistencia sobre ambas Sigatokas, destacándose ASM y FP.

**Tasa de desarrollo (r) de las Sigatokas:** los tratamientos con ASM + propiconazole, propiconazole sólo y FP en dosis de  $300 \text{ mL ha}^{-1}$  tuvieron las tasas de desarrollo más bajas, con valores de 0,0032; 0,0056 y 0,0094, respectivamente (Figura 1), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Mogollón & Castaño (2011), que registran la tasa de desa-

Tabla 1. Efecto de los inductores de resistencia sobre el índice de severidad de las Sigatokas negra y amarilla en diferentes etapas de desarrollo.

Tratamientos	Dosis (mL ha <sup>-1</sup> )	IS PV <sup>1</sup>	IS PF <sup>2</sup>	IS PR <sup>3</sup>
ASM	40	36a*	22a	28a
ASM	80	35a	20a	30a
FP	300	32a	29a	31a
FP	500	42a	17a	29a
Propiconazole	400	37a	19a	30a
ASM + propiconazole	40 + 200	34a	25a	30a
FP+ propiconazole	300 + 200	43a	18a	31a
Testigo (deshoje)	-	46b	34b	48b

<sup>1</sup> IS PV: índice de severidad, período vegetativo

<sup>2</sup> IS PF: índice de severidad, período de floración

<sup>3</sup> IS PR: índice de severidad, período reproductivo

\* Promedios acompañados de letras diferentes denotan diferencias estadísticas significativas, según el rango de comparación múltiple de Tukey al 5% de probabilidad.

rollo más baja con FP en dosis de 27mL L<sup>-1</sup> sin diferencia con propiconazole.

Por otro lado, en un estudio realizado por Márquez & Castaño (2007), la tasa de desarrollo más baja se obtuvo con ASM en dosis de 0,03mL L<sup>-1</sup>, el cual, presentó diferencias significativas con propiconazole. Esto indica que el resultado de la aplicación de los inductores sólo o en mezcla con el fungicida fue similar al del manejo tradicional. Estos resultados también coinciden con lo recomendado para la aplicación de ASM en mezcla con un fungicida (Thomson, 2011).

Con base en el NIH4 y la precipitación acumulada durante el período de evaluación, fue necesario realizar seis aplicaciones de propiconazole sólo y en mezcla con ASM y FP (Figura 2), igual a lo reportado para la misma zona de estudio y cultivariedad, por Aristizábal *et al.* (2006). Se puede observar en la figura 2, que las aplicaciones se hicieron después de presentarse las máximas precipitaciones, con el fin de reducir el nivel de infección de las Sigatokas en la hoja N° 4, que bajó entre 200 y 350 unidades. Resultados similares fueron reportados por Ramírez & Rodríguez (1996) y Pérez (1998), quienes indican que la mayor severidad de las Sigatokas está relacionada con las más altas precipitaciones, las cuales, en la vereda de Santágueda, corresponden a los meses de marzo a mayo y septiembre a noviembre.

Además de la ventaja socioeconómica y ambiental de utilizar el nivel de infección en la hoja cuatro (NIH4) para el manejo de las Sigatokas, se disminuyen los riesgos de una posible resistencia desarrollada por sus agentes causantes, en par-

ticular a productos de acción sistémica, ya que se reducen en un tercio las aplicaciones de fungicidas (Cardona *et al.* 2007).

VARIABLES DE CRECIMIENTO: no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos respecto a las variables altura de planta y diámetro del pseudotallo (datos no mostrados). Según Aristizábal *et al.* (2006), los tratamientos aplicados contra las Sigatokas no tienen efecto en el crecimiento de la planta, puesto que únicamente es afectado cuando no se realiza un plan de fertilización balanceado.

Los períodos a belloteo y a cosecha variaron de 39 a 41 y de 50 a 53 semanas después de siembra, respectivamente (datos no mostrados), inferiores a los reportados por Aristizábal & Herrera (2003), en la misma región. En frutos de naranja afectados por *Penicillium digitatum*, se estableció que, una vez finalizado el tratamiento con inductores de resistencia, se produce un aumento en la síntesis de etileno en los frutos; en el mismo sentido, Fan *et al.* (1997) afirman que el aumento en los niveles de etileno en la planta se produce en respuesta a situaciones de estrés, como el daño mecánico, por ejemplo, pero también al ataque de organismos patógenos, de otra parte; se sabe que el etileno induce fenómenos de senescencia que pueden acortar las fenofases de un cultivo y, en consecuencia, reducir el ciclo de vida de la planta (Yang *et al.* 2008).

ANÁLISIS ECONÓMICO: en términos de rendimiento, con una población de 1.666 plantas ha<sup>-1</sup>, los mejores tratamientos fueron ASM en ambas dosis y en mezcla con propiconazole

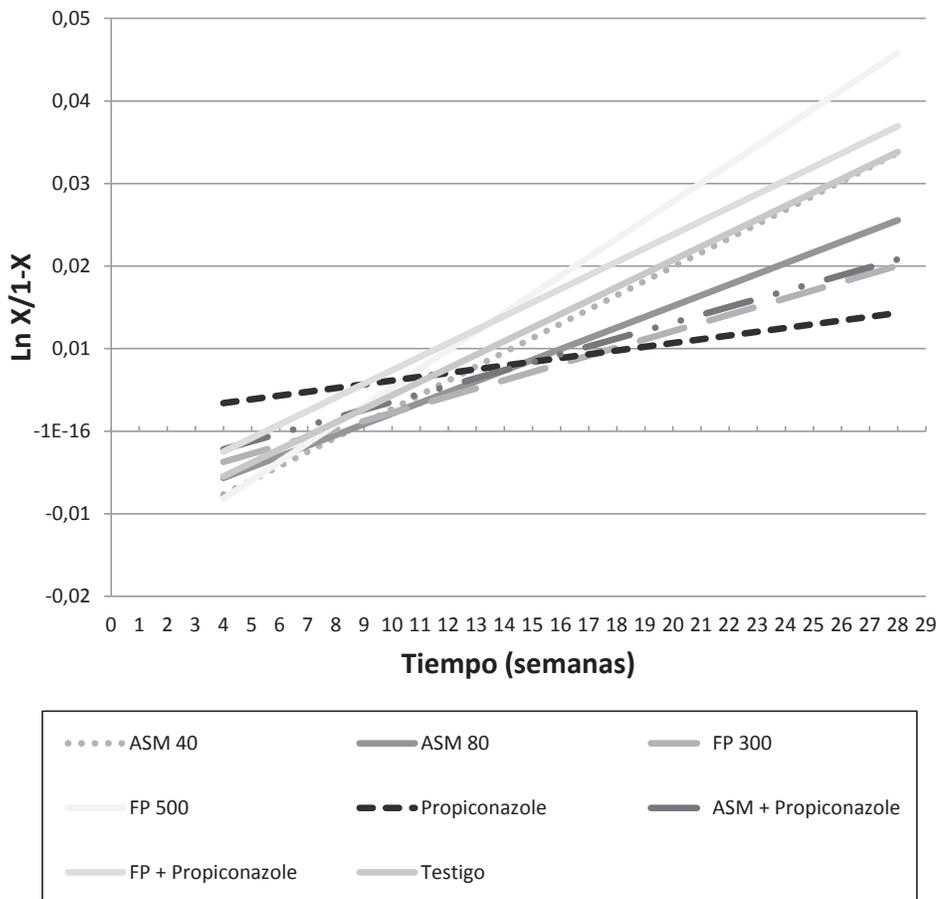


Figura 1. Tasas de desarrollo de las Sigatokas negra y amarilla, a través del tiempo, en plátano Dominico Hartón, de acuerdo con los tratamientos.

y FP, los cuales, aumentaron el rendimiento en 6,0, 3,3, 5,4 y 3,0ton ha<sup>-1</sup>, con respecto al testigo, respectivamente (Tabla 2).

El empleo de inductores de resistencia produjo beneficios económicos en el manejo de las Sigatokas negra y amarilla. El tratamiento con mejor relación B/C fue ASM en dosis de 80mL ha<sup>-1</sup>, seguido de los tratamientos con ASM en dosis de 40mL ha<sup>-1</sup> y la mezcla FP + propiconazole. Se evidencia la ventaja de los inductores de resistencia respecto a propiconazole, aunque los costos de producción fueron similares; los ingresos netos para ASM en ambas dosis fueron superiores a los de propiconazole, en 1,2 y 1,5 veces y a los del testigo en 1,3 y 1,7 veces, respectivamente. Además, la relación beneficio-costo, en ambas dosis, fue de 1,2 y 1,5 por encima del testigo, respectivamente (Tabla 2).

La viabilidad de la utilización de las alternativas de manejo de las Sigatokas negra y amarilla con inductores de resistencia, como modelo de adopción de tecnología, se puede deducir de la relación B/C (Tabla 2), que también es una alternati-

va económica y ambientalmente favorable para el manejo de estas enfermedades, debido a que se disminuye el número de aplicaciones de fungicidas por ciclo de cultivo. En conclusión, los tratamientos con inductores de resistencia sólo o en mezcla con propiconazole para el manejo de los agentes causantes de las Sigatokas negra y amarilla, aunque hayan sido estadísticamente similares al manejo convencional, plantea una solución al problema de la resistencia a los fungicidas, el cual, incrementa el número de aplicaciones por ciclo de cultivo.

Las variables analizadas mostraron un comportamiento comparable, a través del tiempo entre inductores de resistencia y de fungicidas, que permite deducir una influencia positiva del ASM sobre el proceso de resistencia sistémica inducida en el cultivo de plátano.

El conjunto de beneficios incluye, no solamente la reducción en los costos de manejo de las Sigatokas, por el uso de los inductores de resistencia, sino también la reducción de la frecuencia de aplicación de fungicidas por ciclo de cultivo.

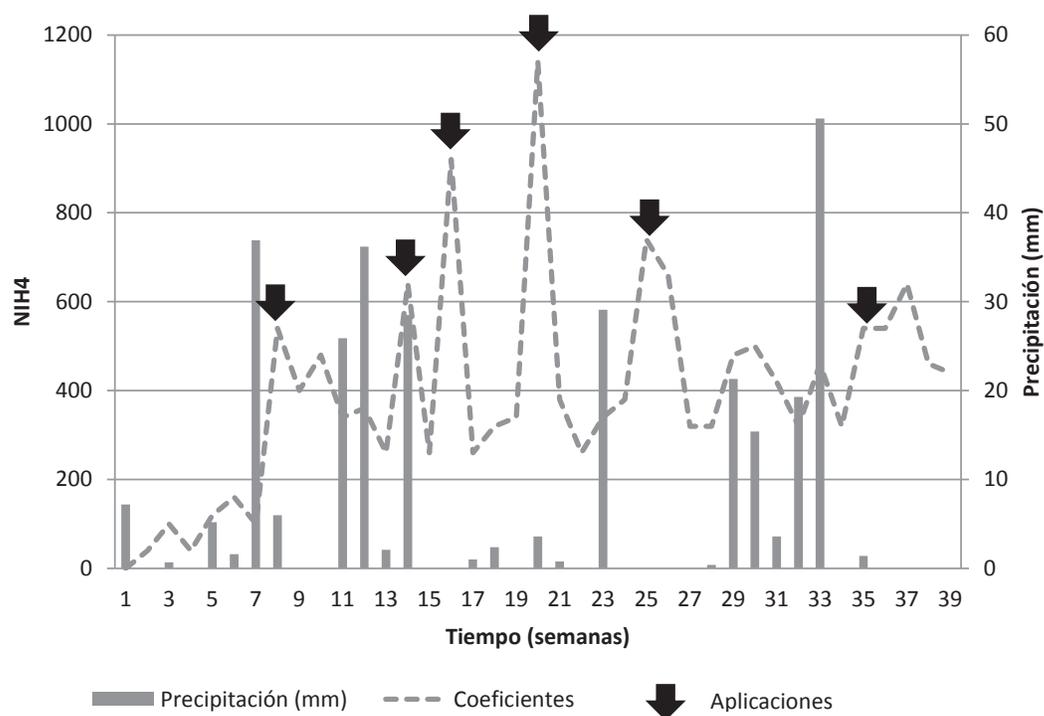


Figura 2. Comportamiento de las Sigatokas negra y amarilla en plátano Dominic Hartón, según el NIH 4 y la precipitación acumulada semanalmente.

Tabla 2. Análisis económico de la aplicación de inductores de resistencia para el manejo de las Sigatokas negra y amarilla en plátano Dominic Hartón.

Tratamientos	Dosis (mL ha <sup>-1</sup> )	Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> )	Costo de producción (kg)	Ingreso bruto <sup>1</sup>	Ingreso neto	Relación B/C*
ASM	40	21	5'654.400	37'500.000	31'845.600	6,6
ASM	80	18,3	6'779.400	46'800.000	40'020.600	6,9
FP	300	15	3'538.150	21'000.000	17'461.850	5,9
FP	500	18	4'546.900	22'800.000	18'253.100	5,0
Propiconazole	400	17,3	5'704.000	33'150.000	27'446.000	5,8
ASM + propiconazole	40 + 200	20,4	6'954.000	32'400.000	25'446.000	4,6
FP+ propiconazole	300 + 200	17,1	4'721.500	31'200.000	26'478.500	6,6
Testigo (deshoje)	-	15	4'329.400	28'050.000	23'720.600	5,4

<sup>1</sup>El precio de venta fue de \$1.500 kg<sup>-1</sup> en el punto de venta de la Universidad de Caldas.

\*B/C: relación beneficio-costo

**Agradecimientos:** A la empresa Magro, por el suministro de los inductores de resistencia y a la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas, por el apoyo financiero. **Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Financiación:** Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AGRONET, 2012. Reportes estadísticos, producción nacional por producto. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Disponible desde internet en: <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%c3%adsticos/ReportesEstad%c3%adsticos.aspx> (con acceso 02/28/2012).
2. ARANZAZU, F.; VALENCIA, J.; ARCILA, M.I.; CASTRILLÓN, C.; BOLAÑOS, M.M.; CASTELLANOS, P.A.; PÉREZ, J.C.; RODRÍGUEZ, J.L. 2002. El Cultivo de plátano. En: Manual Técnico. Manizales: CORPOICA. p.80-82.
3. ARISTIZÁBAL, L.M. 2007. Impacto económico de la práctica del desmane en el híbrido de plátano FHIA-20. Boletín Fitotecnia.127. Universidad de Caldas. Manizales. 2p.
4. ARISTIZÁBAL, L.M.; HERRERA, J.W. 2003. Características agronómicas de híbridos y cultivariedades de plátano en la región de Santágueda. Boletín Fitotecnia. 082.2p.
5. ARISTIZÁBAL, L.M.; OROZCO, P.M.L.; OSTOS, A.M.A. 2006. Efectos del sistema de manejo de las Sigatocas y la frecuencia de fertilización sobre el crecimiento y producción del plátano Dominico Hartón (*Musa AAB*). Rev. Cie. Agr. 23(1-2):74-93.
6. ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J.Z.; FULLERTON, R.A.; ABELN, E.C.A.; CARLIE, J.; ZAPATER, M.F.; BUDDENHAGEN, I.W.; VILJOEN, A.; CROUS, P.W. 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*. 20:19–37.
7. CASTAÑO, J. 2002. Principios básicos de fitoepidemiología. Universidad de Caldas, Manizales. 398p.
8. CARDONA, S.; LONDOÑO, S.; CASTAÑO, J.; ARISTI-ZABAL, M. 2007. Evaluación de métodos de manejo de las Sigatocas amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach) y negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) del plátano (*Musa AAB*). *Fitopat. Col.* 31(1):23-28.
9. CRAENEN, K.; ORTIZ, R. 2003. Genetic improvement for a sustainable management of resistance. In: Jacome, L.; Lepoivre, P.; Marin, D.; Ortiz, R.; Romero, R.; Escalant, J.V. (eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma. p.181-198.
10. CHICA, R.; HERRERA, M.; JIMÉNEZ, I.; LIZCANO, S.; MONTOYA, J.A.; PATIÑO, L.F.; RODRÍGUEZ, P.A.; RUIZ, L.H. 2004. Impacto y manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano de exportación en Colombia. En: XVI Reunión Internacional ACORBAT, Oaxaca, México. Memorias. Oaxaca: Acorbat. p.53-62.
11. FAN, L.; ZHENG, S.; WANG, X. 1997. Antisense suppression of phospholipase D $\alpha$  retards abscisic acid and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell*. 9:2183-2196.
12. FAOSTAT, 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Disponible desde internet en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (con acceso el 02/28/2012).
13. GARBELOTTO, M.; SCHMIDT, D.J.; HARNIK, T.Y. 2007. Phosphite injections and bark application of Phosphite + Pentrabark™ control sudden oak death in coast live oak. *Arbor. & Urb. For.* 33(5):309-317.
14. GAUHL, F. 1989. Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica, UPEB. Panamá. 126 p.
15. GÓMEZ, L.A.; CASTAÑO, J. 2001. Manejo integrado de las Sigatocas negra y amarilla en la cultivariedad de plátano África. *InfoMusa*. 10(2):3-7.
16. GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*. 8:629-643.

17. JOHNSON, D.A.; INGLIS, D.A.; MILLER, J.S. 2004. Control of potato tuber rots caused by oomycetes with foliar applications of phosphorous acid. *Plant Dis.* 88:1153-1159.
18. KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMAN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Ann. Rev. Phytopath.* 32:439-459.
19. LOVATT, C.J. 1999. Timing citrus and avocado foliar nutrient applications to increase fruit set and size. *Hort. Tech.* 9:607-612.
20. MÁRQUEZ, L.J.; CASTAÑO, J. 2007. Inducción de resistencia a Sigatokas en plántulas de plátano Dominicano Hartón. *Agronomía* 15(2):49-57.
21. MARTÍNEZ, G.A. 1997. Mineral nutrient deficiency in plantain. Hohenheim Tropical. Agricultural Series. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany. 112p.
22. MOGOLLÓN, A.M.; CASTAÑO, J. 2011. Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano Dominicano Hartón (*Musa balbisiana* AAB) contra *Mycosphaerella* spp. *Rev. Acad. Col. Cienc.* 35(137):463-471.
23. ORJEDA, G. 1998. Evaluación de la resistencia de los bananos a las enfermedades de Sigatoka y Marchitamiento por *Fusarium*. En: Guías técnicas INIBAP 3. Inst. Int. Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Red Int. para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia. 63p.
24. PATIÑO, L.F. 2002. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka negra en banano. En: Memorias XV Reunión Internacional ACORBAT (Cartagena de Indias, Colombia). Medellín: Augura. p.135-142.
25. PATIÑO, L.F. 2008. Resistencia inducida mediante sustancias químicas a enfermedades causadas por hongos en plantas. *Fitopat. Col.* 32(1):25-30.
26. PÉREZ, L. 1998. Control de Sigatoka negra en Cuba: Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. *InfoMusa.* 7(1):26-28.
27. RAMÍREZ, S.G.; RODRÍGUEZ, C.J. 1996. Manual de producción de plátano para Tabasco y Norte de Chiapas. INIFAP CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Tabasco, México. Folleto Técnico No. 13. 80p.
28. RIVEROS, A.S. 2001. Moléculas activadoras de la resistencia inducida, incorporadas en programas de Agricultura Sostenible. *Rev. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* 61:4-11.
29. SALGADO, S.M.; RESENDE, M.L.; CAMPOS, V.P. 2007. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Ciênc. Agrotec.* 31(4):1007-1013.
30. STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopath.* 35:235-270.
31. STOVER, R.H. 1971. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach). *Trop. Agr. (Trinidad).* 48(3):185-196.
32. THOMSON PLM. 2011. Diccionario de especialidades agroquímicas. Colombia. Edición N°21.
33. TORRADO, M.; CASTAÑO, J. 2008. Incidencia y severidad de las sigatokas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach et Mulder) del plátano según los estados fenológicos. *Agr. Col.* 26(3):435-442.
34. VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44:1920-1934.
35. YANG, T.F.; CONZALEZ-CARRANZA, Z.H.; MAUNDERS, M.J.; ROBERTS, A.J. 2008. Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Ann. Bot.* 101(2):301-310.

Recibido: Mayo 17 de 2012

Aceptado: Septiembre 28 de 2012

# ESTIMACIÓN DEL ÁREA FOLIAR DEL ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum*) POR MEDIO DE UN MÉTODO NO DESTRUCTIVO

## A NON DESTRUCTIVE METHOD FOR ESTIMATING THE LEAF AREA OF BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum*)

Marco Cabezas-Gutiérrez<sup>1</sup>, Fernando Peña-Baracaldo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I.A., M.Sc., c. Ph.D. Docente investigador Facultad Ing. Agronómica U.D.C.A (hasta julio de 2011); <sup>2</sup> I.A., M.Sc. Docente investigador Facultad Ing. Agronómica U.D.C.A, Calle 222 No. 55-37. Bogotá, D.C. fepeña@udca.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(12): 373 - 379, 2012

### RESUMEN

Se llevó a cabo una investigación para estimar un modelo de medición no destructiva de área foliar en plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum*), en condiciones de trópico alto, mediante análisis secuencial de regresión, a partir de mediciones lineales de ancho de lámina foliar (Ah), longitud foliar (Lh) y el producto de la longitud por el ancho (LxA). Se utilizaron plantas de las variedades Sharp Blue y Biloxi para desarrollar los modelos en las localidades de Sibaté y de Firavitoba. El proceso de calibración fue desarrollo con las plantas sembradas en Sibaté, con 180 observaciones y, la validación de modelos, se efectuó en un huerto de Firavitoba. Se obtuvieron seis modelos, tres lineales y tres de forma polinómica de segundo orden, para cada material genético. Las formas seleccionadas fueron:  $AF = 0,638(LxA)$ ,  $R^2 0,94$  y  $AF = 0,0075(LxA)^2 + 0,3321(LxA) + 2,2104$ ,  $R^2 0,94$ . Estos modelos fueron validados por nuevas muestras de hojas obtenidas de diferentes partes del dosel vegetal (bajo, medio y superior), solamente en plantas de la variedad Sharp Blue. Los modelos de la variedad Biloxi presentaron  $R^2$  muy bajos y alto CME. Los modelos, producidos en este estudio, se pueden utilizar de forma confiable para calcular el área individual de la hoja de distintos niveles foliares del dosel vegetal para la variedad de arándano Sharp Blue y, de esta forma, determinar el área foliar por planta sin necesidad de realizar muestreo destructivo. Esto no se puede aplicar para el cultivar Biloxi.

Palabras clave. Trópico alto, regresión, modelo lineal, frutas, Ericaceae.

### SUMMARY

A research was carried out in order to estimate a leaf area model for blue berry (*Vaccinium corymbosum*) in high altitude tropical conditions, using linear measurements such as lamina length (L), width (W) and the length-width product (LxW) by stepwise regression analysis. Leaves from Sharp Blue and Biloxi cultivars were used to develop the model in the localities of Sibaté and Firavitoba. The calibration step was developed with plants coming from Sibaté, with 180 observations and the models validation was effectuated at Firavitoba. Six models were obtained, three linear and three polynomial of second order, for each genetic material. The selection model forms were,  $LA = 0.638(LW)$ ,  $R^2 0.94$ , and  $LA = 0.0075(LW)^2 + 0.3321(LW) + 2.2104$ ,  $R^2 0.94$ . These models were validated by measuring new leaf samples taken from different plant levels (low, medium and superior) of, only, the cultivar Sharp Blue. The models of Biloxi presented very low  $R^2$  and high CME. The models produced in this study can be used reliably for estimating the individual leaf area coming from different levels of the vegetal canopy of the blueberry cv Sharp Blue, and also, estimate the total plant leaf area, without destructive method. They are not recommendable for the Biloxi cultivar.

Key words: High tropic, linear regression, linear model, fruits, Ericaceae.

### INTRODUCCIÓN

El arándano o mirtillo (*Vaccinium corymbosum*) es una planta originaria de Norte América, que forma parte del grupo de las frutas denominadas comercialmente, como berries (Van der Kloet & Mcrae, 2009). Es un arbusto de follaje ca-

duco de la familia de las Ericáceas, que posee numerosas especies, de las cuales, las más cultivadas son el tipo alto, Southern Highbush, (especie que primero se adaptó agrónomicamente, con alrededor de 50 variedades) y ojo de conejo o Rabbiteye (Sonnentag *et al.* 2008).

La planta, se considera un frutal caducifolio, que requiere acumular determinadas cantidades de horas frío para salir del estado de reposo fisiológico obligado, debido a las condiciones invernales de los lugares de origen (Pavlovski, 2010; Mingeau *et al.* 2001). Esta condición limita el cultivo y la adaptación agronómica de la mayoría de variedades cultivados en latitudes cercanos al trópico; sin embargo, en la zona tropical alta, por encima de 2300msnm, la temperatura mínima promedio del aire puede ser suficiente para que, variedades con bajo requerimiento de frío, puedan ser plantadas. La fruta de los arándanos es una baya esférica de color azul a negro, sabor agrídulce, muy jugoso y aromático. Esta fruta tiene una importancia comercial significativa, con una demanda alta, producto de la divulgación de su utilización, como fuente de longevidad y como parte del tratamiento de enfermedades coronarias y degenerativas, debido a sus altos contenidos de antocianinas y polifenoles (Scalzo *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009).

La demanda permanente de la fruta hizo que se establecieran nuevas zonas en la parte septentrional de América, especialmente, en Chile y en Argentina. En estos países, la producción de fruta está condicionada por la temperatura baja, lo cual, solamente permite una cosecha al año, normalmente, en noviembre y en enero (Lobos *et al.* 2009). El resto del año, la oferta de fruta es muy baja y la demanda crece permanentemente, hecho que provoca un desbalance comercial de gran impacto (Litwinczuk *et al.* 2005).

Actualmente, en Colombia se llevan a cabo algunos esfuerzos para adaptar materiales de arándano con bajos requerimientos de frío, inferiores a 350 Horas Frío, con posibilidades de producir fruta en épocas de contra estación con las zonas productoras del sur y del norte del continente americano (Paylis, 2004).

La adaptación de las plantas cultivadas obedece a una interacción genotipo por ambiente, donde la oferta ambiental determina, en gran medida, las posibilidades de uso y de explotación del recurso genético. Para realizar estudios de adaptación, se requieren estrategias metodológicas, que garanticen el logro de objetivos precisos y realizables. Uno de ellos es la caracterización del dosel de las plantas. El índice de área foliar, entendido como la razón entre el área de todas las hojas y el área del suelo ocupado por la planta, es uno de los indicadores más importantes en el crecimiento vegetal y en la producción de cosechas (Beerling & Fray, 1990; Gutezeit, 2000). Para calcularlo, normalmente, se requieren

mediciones destructivas o, de lo contrario, la utilización de equipos costosos que no siempre están disponibles en condiciones de campo (Bozhinova, 2006; Ajayi, 1990).

La determinación del área foliar por métodos indirectos es una herramienta de alta utilidad para evitar el muestreo destructivo, así como también sustituir el uso de equipos costosos y de alta sensibilidad. Los resultados de dicho método son muy acertados y de alta precisión, demostrándose su utilidad en varios cultivos, como pimentón (De Swart *et al.* 2004), kiwi (Mendoza de Gyves *et al.* 2007), haba (Peksen, 2007), cerezas (Cittadini & Peri, 2006), calabacín (Rouphael *et al.* 2005), forestales (Cabezas-Gutiérrez *et al.* 2009), fresa (Demirsoy *et al.* 2005), banana (Zucoloto *et al.* 2008) y guayaba (Singh, 2007), entre otros. La gran mayoría de modelos obtenidos con el método son de tipo lineal, donde solamente se requieren mediciones elementales de largo de la lámina foliar, ancho promedio de la misma o una combinación de los dos atributos morfológicos (Kawamura & Takeda, 2002).

El presente documento tiene como propósito mostrar una metodología para estimar el área foliar de dos materiales de *Vaccinium corymbosum* en condiciones de trópico alto, con el fin de contribuir con los estudios de caracterización ecofisiológica de la especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron plantas de arándano (*V. corymbosum*) de dos años de edad, provenientes de la Empresa Genberries S.A., de Chile. Se escogieron dos variedades, Sharp Blue y Biloxi, que pertenecían a experimentos de adaptación de dichos materiales, en dos localidades de clima frío en Colombia: una, Sibaté, en Cundinamarca y la otra, Firavitoba, en Boyacá. El lote sembrado en Sibaté estaba localizado a 2780 msnm, con temperatura promedio de 12,5°C, con variaciones térmicas entre 6 y 19°C, respectivamente, para temperaturas mínima y máxima. El experimento de Firavitoba, se encontraba a 2480msnm, con temperatura media de 14,5°C, con variaciones térmicas de 7 y 22°C. La precipitación de Sibaté es de 960mm anuales y se presentan en promedio  $1100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFT). En Firavitoba, se reportan en promedio 750mm de precipitación media anual y  $1540\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de DFFT. Los datos meteorológicos, se midieron en cada localidad, mediante un termohidrómetro, marca HOBO 2134, para la temperatura del aire y una barra cuántica, marca LICOR 192, para la densidad de flujo de fotones. Los promedios de precipitación, se tomaron de los datos históricos del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM (2011).

Las plantas estaban sembradas en camas levantadas a una distancia de 3m entre sí y con una distancia de siembra de

1m entre plantas, lo cual, arroja como resultado una población equivalente a 3333 plantas por hectárea. Todas las camas estaban provistas de un sistema de riego por goteo. Las plantas, durante el desarrollo del ensayo, fueron fertilizadas con una solución completa, que contenía 200 mg·L<sup>-1</sup> de N, 30 de P, 150 de K, 100 de Ca, 15 de S y 30 de Mg, vía sistema de fertirrigación. Se aplicaron boro y hierro en forma foliar, con frecuencia mensual, en concentraciones de 0,1g·L<sup>-1</sup> de solubor y 1g·L<sup>-1</sup> de quelato de hierro, como fuentes de los micronutrientes. Las plantas, se mantuvieron libres de competencia por especies nocivas; se realizaron controles preventivos para enfermedades foliares, de acuerdo a los protocolos de la empresa hibridadora.

El trabajo, se dividió en dos partes: una, para establecer y calibrar los modelos y, la otra, para validarlos. En la localidad de Sibaté, se realizó la primera parte, mientras que la validación de los modelos, se efectuó con las plantas de la localidad de Firavitoba.

**Calibración.** La calibración y la construcción de los modelos, se llevó a cabo con la medición en el sitio experimental de 180 hojas por cada variedad, Sharp Blue y Biloxi, durante dos momentos del cultivo: uno, en estado de crecimiento foliar y, otra medición, en estado de floración. Se retiraron las hojas de diferentes tamaños y distintas posiciones dentro del dosel y con un analizador portátil, tipo CID 202 Portátil Leaf Área Meter, con 0,1mm<sup>2</sup> de resolución, se midió el área foliar; el largo y el ancho, se calcularon con una regla graduada en mm. Con los datos de largo de la lámina foliar (Lh), ancho máximo de la lámina foliar (Ah) y el producto del largo por el ancho (LhxAh), se procedió a realizar los respectivos análisis de regresión lineal y polinomial, para las variables en referencia, respecto al área individual de la hoja, (Samuels & Witmer, 2003). Los datos fueron procesados mediante el uso del programa EXCEL de Microsoft Office 2007®.

A partir de los resultados encontrados, se escogieron los modelos que presentaron los mayores coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) y los menores cuadrados medios del error (CME), en concordancia con el procedimiento usado por Cittadini & Peri (2006) y Mendoza de Gyves *et al.* (2007). La variedad Biloxi mostró bajos coeficientes de determinación, menores a 0,6, por tal razón, no se realizó la validación; mientras que Sharp Blue presentó R<sup>2</sup> más alto (mayor a 0,8) en varios de los modelos probados, aspecto que permitió realizar la validación en la otra localidad.

**Validación.** Una vez seleccionados los modelos de la previa calibración, se procedió a realizar la medición en la localidad número dos (Firavitoba). Allí, se seleccionaron 100 hojas de diferentes tamaños y de ramas que presentaban estados fenológicos entre desarrollo vegetativo y floración. Se separaron las hojas de las plantas y, en el sitio experimental, se

ejecutó la medición con el mismo instrumento utilizado en la calibración. El área foliar individual obtenida y el área foliar estimada, a partir de las ecuaciones de cada modelo, fueron sometidas a un análisis de regresión lineal, para establecer la relación entre los datos obtenidos con cada modelo. La pendiente y el intercepto de cada modelo fueron probados mediante un análisis de varianza de una vía, para ver el nivel de significancia entre ellos, con base en la metodología empleada por Nautival *et al.* (1990) y (Peksen, 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Calibración de los modelos.** De forma general, se encontró que el área foliar individual para la variedad Sharp Blue, varió entre 4,6cm<sup>2</sup> y 24,8cm<sup>2</sup>, con promedio de 12,4cm<sup>2</sup>, en Firavitoba y 11cm<sup>2</sup>, en Sibaté. El largo de la lámina foliar varió entre 2,3 y 6,8cm, mientras el ancho lo hizo entre 1,4 y 5,2cm. La variedad Biloxi tuvo, en promedio, menor área foliar individual, 7,6cm<sup>2</sup> y presentó mayores variaciones entre largo y ancho de la lámina. De hecho, al realizar el análisis de datos, se halló que ninguno de los modelos aplicados en el presente trabajo presentó coeficientes confiables para replicar el modelo y realizar su validación en la variedad Biloxi.

En la tabla 1, se pueden observar las características de cada uno de los modelos establecidos para la estimación del área individual de las hojas del arándano, variedad Sharp Blue. Las ecuaciones presentadas, que corresponden a la variable área foliar individual, respecto al largo de la lámina foliar (L), ancho de la lámina foliar (A) y el producto AXL. Al realizar el ajuste estadístico, se observa que en todos los tres casos existe un coeficiente de determinación más alto, cuando se aplica el modelo de tipo polinómico, que al ser aplicado el modelo lineal.

Las ecuaciones demuestran que al utilizar un solo atributo, como base de la modelación, los coeficientes de determinación son bajos, menores a 0,8, lo que ofrece poca confiabilidad para ser usado el modelo. También, se observa que al incrementar, ya sea el largo o el ancho de la lámina foliar, existe más bien una tendencia a estabilizarse el valor del área individual de la hoja. La forma entre ovoide y lanceolada de la hoja del arándano no facilita la obtención de una ecuación lineal para el ancho o el largo de la lámina foliar. Por tal razón, es requisito fundamental multiplicar ambos atributos para obtener un dato más confiable. Tanto el modelo 3 como el 6, integran las dos variables y, en ambos casos, el coeficiente de determinación es superior a 0,9, una condición ideal a la hora de seleccionar los modelos adecuados para la estimación, como lo mencionan Bange *et al.* (2000), Bozhinova (2006), Gutiérrez & Lavin (2000), en sus respectivos trabajos. Bajo estos argumentos, se seleccionaron los modelos 3 y 6 para realizar la validación en otra oferta ambiental.

Tabla 1. Tipos de modelo utilizados para determinar el área foliar del arándano variedad Sharp Blue, en condiciones de trópico alto

VARIEDAD SHARP BLUE				
MODELO	TIPO	ECUACIÓN	R <sup>2</sup>	CME (cm <sup>2</sup> )
1	AF: a+bL*	y = 4,3622x - 10,865	0,7384	5,23
2	AF: a+bA	y = 5,0393x - 6,6806	0,7963	4,654
3	AF: a+b(AL)	y = 0,6385x - 0,5164	0,9351	1,278
4	AF: a+b <sub>0</sub> (L)+b <sub>1</sub> (L) <sup>2</sup>	y = 1,3412x <sup>2</sup> - 9,3924x + 23,317	0,8027	4,087
5	AF: a+b <sub>0</sub> (A)+b <sub>1</sub> (A) <sup>2</sup>	y = 1,2427x <sup>2</sup> - 3,8918x + 8,5635	0,823	3,676
6	AF: a+b <sub>0</sub> (AL)+b <sub>1</sub> (AL) <sup>2</sup>	y = 0,0075x <sup>2</sup> + 0,3321x + 2,2104	0,9406	1,253

\*L= largo; A= ancho; CME = Cuadrado medio del error experimental.

Para el caso de la variedad Biloxi, ninguno de los modelos probados representa significancia, como tampoco exactitud para ser tenidos en cuenta en la determinación indirecta del área foliar (Tabla 2). Esta variedad presenta una alta variación en la forma de las hojas, algunas redondas, otras ovadas, otras lanceoladas y otras elípticas, lo cual, no permite hacer un ajuste matemático ideal para ser validado. Por tal razón, la variedad no se tuvo en cuenta para la validación de los modelos y, más bien, se propone medir el área foliar con métodos tradicionales hasta estimar un promedio lo suficientemente confiable para ser replicado en otras condiciones.

**Validación:** Una vez seleccionados los modelos, se calculó el área individual de las hojas, con base en los datos de longitud por ancho foliar, comparando este resultado con el dato obtenido por medición directa. El modelo lineal AF: a+b(AL), presentado en la figura 1, mostró un coeficiente de determinación de 0,93, considerado apropiado, respecto a lo encontrado en especies frutales por otros autores, como Serdar & Demirsoy (2006), en castaño, Singh (2007), en

guayabo y Cittadini & Peri (2006) en cerezo. Para el modelo de tipo polinómico, el R<sup>2</sup> fue de 0,94, ligeramente superior, pero no significativamente, respecto al modelo lineal, figura 2.

Si bien es cierto que en otras especies, como Kiwi (Mendoza de Gyves *et al.* 2007), calabacín (Rouphael *et al.* 2005), fresas (Demirsoy *et al.* 2005), algodón (Akram-Ghaderi & Soltani, 2007) y brócoli (Gutezeit, 2000), los coeficientes de determinación son superiores, muy cercanos a uno; esas especies presentan alta homogeneidad en las muestras, pues, por lo general, las observaciones equivalen a materiales con alta homogeneidad en las formas de las hojas. Para el caso de arándano, las formas de la hoja varían entre plantas y entre estratos foliares, que puede ser la causa del presente resultado.

En términos generales, tanto el modelo lineal que involucra el producto del largo por el ancho de la hoja como el modelo polinómico de segundo orden, con los mismos componentes, pueden ser usados con alto nivel de confiabilidad para

Tabla 2. Tipos de modelo utilizados para determinar el área foliar del arándano variedad Biloxi.

VARIEDAD BILOXI				
MODELO	TIPO	ECUACIÓN	R <sup>2</sup>	CME(cm <sup>2</sup> )
1	AF: a+bL*	y = 1,8619x - 1,8072	0,5306	3,589
2	AF: a+bA	y = 3,269x - 2,1824	0,5702	4,980
3	AF: a+b(AL)	y = 0,5434x + 0,4238	0,7424	3,345
4	AF: a+b <sub>0</sub> (L)+b <sub>1</sub> (L) <sup>2</sup>	y = 0,2694x <sup>2</sup> - 0,2155x + 2,0979	0,5373	5,587
5	AF: a+b <sub>0</sub> (A)+b <sub>1</sub> (A) <sup>2</sup>	y = -4E-06x <sup>2</sup> + 3,269x - 2,1824	0,5702	3,480
6	AF: a+b <sub>0</sub> (AL)+b <sub>1</sub> (AL) <sup>2</sup>	y = 0,003x <sup>2</sup> + 0,4852x + 0,6842	0,7426	2,348

\*L= largo; A= ancho. CME = cuadrado medio del error experimental

estimar el área foliar individual en plantas de arándano de la variedad Sharp Blue, para evitar el muestreo destructivo en estudios fisiológicos y agronómicos en trópico alto. Para la variedad Biloxi, no se recomienda el uso de esta metodología de estimación, pero se sugiere realizar un nuevo trabajo que involucre ecuaciones diferentes a las probadas en este documento.

**Agradecimiento:** A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, por la financiación. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

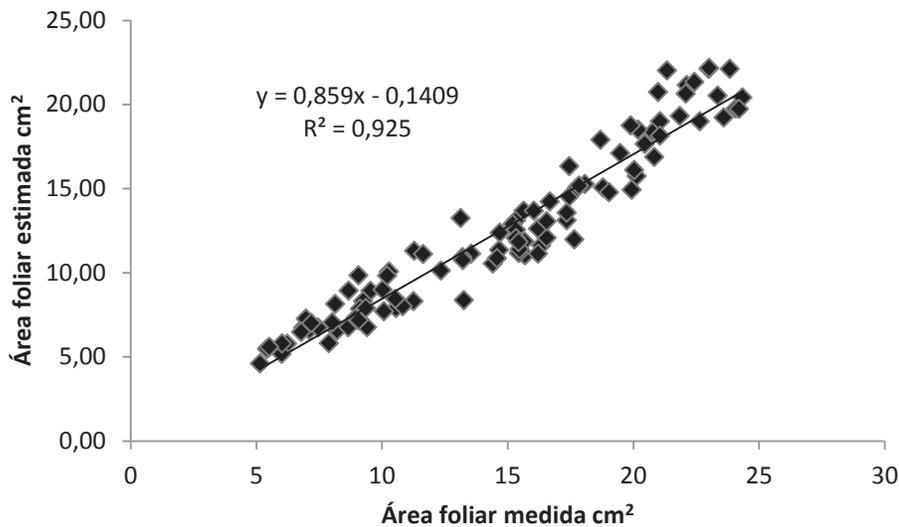


Figura 1. Relación entre el área foliar individual de hojas medida y el área foliar estimada en arándano variedad Sharp Blue, bajo condiciones de trópico alto. La estimación de área foliar, se realizó con el modelo lineal de tipo AF:  $a + b(AL)$ .

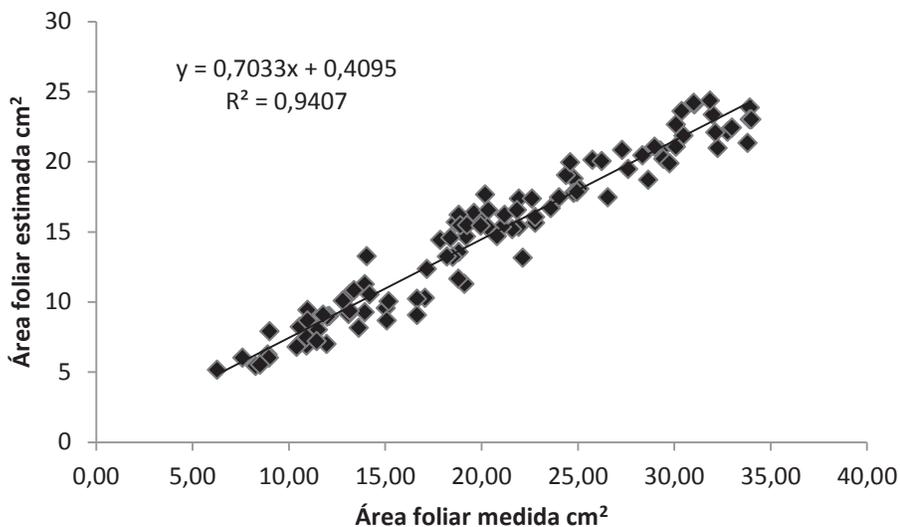


Figura 2. Relación entre el área foliar individual de hojas medida y el área foliar estimada en arándano variedad Sharp Blue, bajo condiciones de trópico alto. La estimación de área foliar, se realizó con el modelo lineal de tipo  $AF = a + b_0(AL) + b_1(AL)^2$ .

## BIBLIOGRAFÍA

1. AJAYI, N.O. 1990. Rapid determination of leaf area in ovate vegetable leaves by linear measurements. *J. Hort. Sc.* 65(1):1-15.
2. AKRAM-GHADERI, M.; SOLTANI, F.A. 2007. Leaf area relationships to plant vegetative characteristics in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) grown in a temperate subhumid environment. *Int. J. Plant. Prod.* 1(1):63-71.
3. BANGE, M.P.; HAMMER, G.L.; MILROY, S.P.; RICKERT, K. 2000. Improving estimates of individual leaf area of Sunflower. *Agron. J.* 92:761-765.
4. BEERLING, D.J.; FRAY, J.C. 1990. A comparison of the accurate variability and speed of five different methods for estimating leaf area. *Ann. Bot.* 65:483-488.
5. BOZHINOVA, R.P. 2006. Coefficients for determination of the leaf area in three burley. *J. Central Eur. Agric.* 7(1):7-12.
6. CABEZAS-GUTIÉRREZ, M.; PEÑA, J.P.; DUARTE, H.D.; COLORADO, J.F.; LORA, R. 2009. Un modelo para la estimación del área foliar en tres especies forestales de forma no destructiva. *Rev. U.D.C.A, Act. & Div. Cient.* 12(1):121-130.
7. CITTADINI, E.D.; PERI, P.L. 2006. Estimation of leaf area in sweet cherry using a non-destructive method. *RIA.* 35(1):143-150.
8. DEMIRSOY, H.; DEMIRSOY, L.; ÖZTÜRK, A. 2005. Improved model for the non-destructive estimation of strawberry leaf area. *Fruits.* 60:69-73.
9. DE SWART, E.A.M.; GROENWOLD, R.; KANNE, H.J.; STAM, P.; MARCELLIS, L.F.M.; VOORRIPS, R.E. 2004. Non-destructive estimation of leaf area for different plant ages and accessions of *Capsicum annum* L. *J. Hortic. Sci. Biotec.* 79:764-770.
10. GÜTEZEIT, B. 2000. Non-destructive measurement of fresh plant mass by the gamma-scanning technique applied to broccoli. *J. Agric. Engng. Res.* 75:251-255.
11. GUTIÉRREZ, T.A.; LAVÍN, A.A. 2000. Mediciones lineales en la hoja para la estimación no destructiva del área foliar en vides cv. Chardonnay. *Agric. Téc.* 60(1):9-17.
12. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES IDEAM. 2011. Información Hidrometeorológica de Colombia. Disponible desde Internet en: <http://institucional.ideam.gov.co> (con acceso 18/06/2011).
13. KAWAMURA, K.; TAKEDA, H. 2002. Light environment and crown architecture of two temperate *Vaccinium* species: inherent growth rules versus degree of plasticity in light response. *Can. J. Bot.* 80:1063-1077.
14. LITWINCZUK, W.; SZCZERBA, G.; WRONA, N. 2005. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture. *Sci. Hort.* 106:162-169.
15. LOBOS, G.A.; RETAMALES, J.B.; DEL POZO, A.; HANCOCK, J.F.; FLORE, J.A. 2009. Physiological response of *Vaccinium corymbosum* 'Elliott' to shading nets in Michigan. *Acta Hort.* 810:465-470.
16. MENDOZA DE GYVES, M.; ROUPHAEL, Y.; CRISTOFOTI, V.; MIRA, F.R. 2007. A non-destructive simple and accurate model for estimating the individual leaf area of kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Fruits.* 62:171-175.
17. MINGEAU, M.; PERRIER, C.; AMEGLIO, T. 2001. Evidence of drought-sensitive periods from flowering to maturity on highbush blueberry. *Sci. Hort.* 89:23-40.
18. NAUTIVAL, B.M.; SINGH, P.K.; SUKLA, R.N.; PRAKASH, S.; KUMAR, A. 1990. Correcting leaf area measurement by conventional methods: a new approach for apple (*Malus domestica* Borkh). *J. Hort. Sc.* 65(1):15-18.
19. PAVLOVSKI, N. 2010. Influence of winter temperatures on the yielding ability of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars in Belarus. *Internal J. Fruit Sci.* 10:157-165.
20. PAYLIS, G.C. 2004. Blueberry fruit quality and yield as affected by fertilization. *Acta Hort.* 715:353-356.
21. PEKSEN, E. 2007. Non-destructive leaf area estimation model for faba bean (*Vicia faba* L.). *Sci. Hort.* 113:322-328.
22. ROUPHAEL, Y.; RIVERA, C.M.; CARDARELLI, M.; FANASCA, S.; COLLA, G. 2005. Leaf area estimation

- from linear measurements in zucchini plants of different ages. *J. Hort. Sci. & Biotechn.* 81(2):238-241.
23. SAMUELS, M.J.; WITMER, J.A. 2003. *Statistics for the life sciences*. 3<sup>rd</sup> ed. Pearson Education, USA. 724p.
24. SCALZO, J.; CURRIE, A.; STEPHENS, J.; MCGHIE, T.; ALSPACH, P. 2008. The anthocyanin composition of different *Vaccinium*, *Ribes* and *Rubus* genotypes. *BioFactors* 34:13-21.
25. SERDAR, U.; DEMIRSOY, H. 2006. Non-destructive leaf area estimation in chestnut. *Sci. Hort.* 108:227-230.
26. SINGH, A. 2007. Approximation of leaf area by using leaf dimensions in guava. I International Guava Symposium. *Acta Hort.* 735:321-324.
27. SONNENTAG, O.; TALBOT, J.; CHEN, J.M.; ROULET, N.T. 2008. Using direct and indirect measurements of leaf area index to characterize the shrub canopy in an ombrotrophic peatland. *Agric. Forest. Meteorol.* 144:200-212.
28. VAN DER KLOET, S.P.; MCRAE, K.B. 2009. Stem longevity of *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae) in Eastern North America. *Am. Midi. Nat.* 162:395-402.
29. YANG, W.Q.; HARPOLE, J.; FINN, C.E.; STRIK, B.C. 2009. Evaluating berry firmness and total soluble solids of newly released highbush blueberry cultivars. *Acta Hort.* 810(2):863-868.
30. ZUCOLOTO, M.; LIMA, J.S.S.; COELHO, R.I. 2008. Modelo matemático para estimativa da área foliar total de bananeira Prata-anã. *Rev. Bras. Frut.* 30:1152-1154.

Recibido: Junio 15 de 2012

Aceptado: Octubre 21 de 2012

# SUSCEPTIBILIDAD DE *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A LA PROTEÍNA Cry1Ac INCORPORADA A DIETAS MERÍDICAS

## SUSCEPTIBILITY OF *Heliothis virescens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) TO Cry1Ac PROTEIN INCORPORATED TO MERIDIC DIETS

Laura Romero<sup>1</sup>, Helber Arévalo<sup>2</sup>, William Duarte<sup>3</sup>, Rodolfo Mejía<sup>4</sup>

<sup>1</sup> I.A. Ingeniería Agronómica, U.D.C.A, lauraromeror@hotmail.com; <sup>2</sup> I.A., c.M.Sc. Docente-investigador, Programa Ingeniería Agronómica, U.D.C.A, Calle 222 No. 55-37, Bogotá, D.C., harevalo@udca.edu.co; <sup>3</sup> I.A., M.Sc. Docente-investigador, Facultad Ingeniería Agronómica U.D.C.A, wduarte@udca.edu.co; <sup>4</sup> I.A., M.Sc. Docente-investigador, Facultad Ingeniería Agronómica U.D.C.A, rmejia@udca.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 381 - 389, 2012

### RESUMEN

Como alternativa de manejo a diversas plagas, se desarrollaron plantas modificadas que expresan proteínas letales contra insectos, a las cuales, pueden desarrollar resistencia las plagas, por la constante exposición a la proteína. Con el fin de monitorear los cambios en la susceptibilidad a la proteína Cry1Ac y determinar el efecto que ejerce la composición de la dieta meridica sobre la susceptibilidad de *Heliothis virescens*, se adelantaron bioensayos en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la U.D.C.A, con poblaciones colectadas en *Desmodium* sp., en el municipio El Espinal, Tolima. A las dietas ICRISAT, Greene y Shorey & Hale, se les incorporaron concentraciones seriadas de Cry1Ac, que oscilaban entre 0,01 y 100 ppm. Los bioensayos contaban con seis tratamientos, seis repeticiones y cada unidad experimental estaba representada por un vaso plástico con dieta, donde se colocaron una o cinco larvas neonatas. Con la mortalidad evaluada a los siete días, se determinó la concentración letal (CL<sub>50</sub>). Se comprobó que la composición de la dieta influye en la respuesta de susceptibilidad. La CL<sub>50</sub> obtenida para *H. virescens*, en el 2011 (0,956ppm), indica que esta plaga perdió susceptibilidad a la Cry1Ac, expresada por el Bollgard®; sin embargo, esta variedad de algodónero todavía ejerce control sobre *H. virescens*. También se observó que la mortalidad obtenida con cinco larvas por unidad experimental estaba influenciada por el canibalismo y no por el consumo de Cry1Ac, sugiriendo que para los próximos ensayos se utilice, para eliminar el efecto que tiene el canibalismo sobre la mortalidad, solamente una larva por recipiente.

Palabras clave: Bellotero del algodónero, *Bacillus thuringiensis*, tolerancia, bioensayos.

### SUMMARY

As an alternative for pest management, plants were developed to express lethal proteins against target insects, which may develop resistance due to their constant exposure to these proteins. To monitor changes in susceptibility to Cry1Ac protein and determine the effect exerted by the diet composition on the susceptibility of *Heliothis virescens*, bioassays were carried out in the U.D.C.A's laboratory of Agricultural Biotechnology with populations collected on *Desmodium* sp., at Espinal, Tolima. The diets employed were ICRISAT, Greene and Shorey & Hale, incorporating serial concentrations of Cry1Ac, ranging from 0.01 to 100 ppm. Bioassays consisted of six treatments and six replicates; each experimental unit was represented by a plastic cup with diet, in which one or five neonate larvae were placed. With the mortality assessed at day seven the lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was calculated. The diet composition influenced the susceptibility response. The LC<sub>50</sub> obtained for *Heliothis* in 2011 (0.956 ppm) indicates that this insect lost susceptibility to Cry1Ac expressed by Bollgard®; however, this plant variety still has control over the species. Results also showed that the mortality obtained with five larvae per experimental unit was influenced by cannibalism and not by the consumption of Cry1Ac, indicating that only one larva per container should be used to eliminate the effect of cannibalism on mortality.

Key words: Tobacco budworm, *Bacillus thuringiensis*, tolerance, bioassays.

## INTRODUCCIÓN

*Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae), conocido comúnmente como el bellotero del algodón, es una especie polífaga que, además del algodón, puede atacar cultivos de tabaco, de soya, de tomate y de girasol (Capinera, 2004), entre otros. En el algodón, la hembra deposita los huevos de forma individual en las hojas y yemas terminales; esta actividad, se lleva a cabo tan pronto se empiezan a formar las estructuras reproductivas de la planta (García, 1976; Hallman, 1978). El daño es producido por las larvas, especialmente, a partir del tercer instar (Bonacic *et al.* 2010), las cuales, atacan el tejido foliar inicialmente y, luego, descienden en búsqueda de órganos fructíferos y, al llegar a los botones florales, los perfora y le consume parcial o totalmente. Las estructuras afectadas abren sus brácteas y caen al suelo; si el insecto ataca las cápsulas, éstas no se desprenden, pero sufren pudriciones y son improductivas (Alcaraz, 1962; García, 1976). Este tipo de ataque genera reducciones en la calidad y en el rendimiento del algodón, por la pérdida de estructuras reproductivas o el manchado de la fibra.

Como alternativa de manejo de este y otros insectos plaga, en 1987, se desarrolló la primera planta modificada genéticamente, donde por medio de ingeniería genética, se le confirió resistencia a determinados insectos (Agro-Bio, 2012). En 1996, se dieron las primeras siembras comerciales de algodón Bt en Australia y en Estados Unidos (Perlak *et al.* 2001). En Colombia, las primeras siembras comerciales de una variedad de algodón Bt, se hicieron en el 2003, con la variedad Bollgard®, la cual, presenta resistencia a plagas, como *H. virescens*, *Helicoverpa zea*, *Trichoplusia ni*, entre otros (Cerón, 2004).

Zenner de Polanía & Borrero (1992) demostraron que en Colombia *H. virescens* había adquirido resistencia a diversos ingredientes activos de insecticidas, por la presión de selección ejercida por su constante uso, fenómeno que también se puede presentar con los insectos expuestos a variedades de algodón Bt, pues la constante exposición a una molécula puede generar cambios en la frecuencia de alelos susceptibles (Tabashnik *et al.* 2009), dando como respuesta una pérdida progresiva de susceptibilidad. Adicional a lo anterior, se ha reportado que algunas especies de lepidópteros han expresado resistencia a las toxinas del *B. thuringiensis*, cuando la toxina de esta bacteria ha sido aplicada como un bioplaguicida; tal es el caso de *Plutella xylostela* (Shelton *et al.* 1993) y *Trichoplusia ni* (Janmaat & Myers, 2003).

De otra parte, existen factores que influyen en el desarrollo de resistencia, ya que reducen la expresión de las proteínas dentro de la planta; dentro de esos factores, se encuentran las altas temperaturas (Chen *et al.* 2005), el anegamiento (Dong & Li, 2007), la etapa de desarrollo de la planta (Akhurst *et al.* 2003; Blanco *et al.* 2008), la baja cantidad de nitrógeno disponible para la planta (Bruns & Abel, 2003), el déficit de agua (Dong & Li, 2007), entre otros. A nivel de laboratorio también existen otros factores, como temperatura y humedad relativa (Álvarez *et al.* 1991), el tiempo de exposición de los individuos a la proteína (Blanco *et al.* 2005), la composición del alimento suministrado a los insectos (Blanco *et al.* 2009), entre los principales, que pueden afectar negativamente los resultados, alterando la interpretación de pérdida o ganancia de susceptibilidad.

Por esta razón, esta investigación evaluó, bajo condiciones de laboratorio, el efecto que tiene la composición de las dietas merídicas sobre la susceptibilidad de *Heliothis virescens*, procedente de plantas de *Desmodium* sp. de la zona de El Espinal (Tolima, Colombia), a la proteína CryIAC del *B. thuringiensis* y de paso monitorear los cambios en la susceptibilidad que haya experimentado *H. virescens*, como consecuencia del establecimiento de algodón genéticamente modificado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Larvas de *H. virescens* fueron colectadas en plantas de *Desmodium* sp., en el municipio de El Espinal (Tolima), situado a 4° 09' N y 74° 53' W, a 431 msnm, de bordes de lotes sembrados con algodón transgénico y convencional, para luego ser criadas en dieta ICRISAT (Tabla 1). Los ensayos, se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, situado a 2600 msnm, con condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo controladas temperatura 25±5°C, humedad relativa de 70±10% y un fotoperiodo de 0:24.

Cuando las larvas colectadas en campo se transformaron en pupas fueron puestas en un recipiente de plástico de 50 mL de capacidad, con tapa de cierre a presión (Envapac Ltda., Bogotá). Cuando los adultos emergían eran separados por sexos y ubicados por parejas en una cámara de apareamiento y oviposición, con el fin de garantizar la postura de huevos fecundados. Las cámaras de apareamiento y de oviposición consistían en frascos de vidrio, con capacidad de 3,5L. Estos frascos estaban cubiertos con tul de color blanco y con tiras de papel crepé, que colgaban del borde del frasco, para observar con mayor facilidad las posturas. Los adultos fueron alimentados diariamente con una mota de algodón saturada con una solución acuosa con el 10%, de azúcar y el 5%, de miel.

Tabla 1. Composición de las dietas merídicas para la evaluación de la mortalidad de *H. virescens*.

INGREDIENTES	ICRISAT Diet No. 3	Shorey & Hale (1965) (modificada)	Greene <i>et al.</i> (1976) (modificada)
Agua	212mL	325mL	402mL
Frijol blanco			29,2g
Frijol calima		100g	
Harina de garbanzo	75g		
Harina de soja			11,75g
Germen de trigo			23,5g
Levadura de cerveza	12g	15g	14,75g
Leche en polvo			8,9g
Metil paraben (Nipagina)	1,25g	1g	1,07g
Ácido ascórbico	1,17g	1,5g	1,4g
Ácido sórbico	0,75g	0,5g	0,7g
Tableta multivitamínica	1 tableta	1 tableta	2 tabletas
Ambramicina	0,04g		
Tetraciclina			0,025g
Formaldehído (38%)		1ml	1,4ml
Agar	4,37g	6g	5,45g

Para los bioensayos, se tomaron las posturas de la segunda generación de laboratorio ( $F_2$ ). A las dietas, se le incorporaron concentraciones logarítmicas del Cry1Ac del gene del Bt, obtenida del insecticida MVP II® (Cry1Ac encapsulado, por *Pseudomonas* sp., proporcionado por Dow AgroSciences). Las dietas merídicas a utilizar fueron: ICRISAT diet 3 a base de harina garbanzo, preparada de acuerdo a la fórmula proporcionada por el doctor H. Sharma, del Instituto Internacional de Investigación en Cultivos para las Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT) Patancheru, Andhra Pradesh, India (Arévalo & Zenner, 2009); Shorey & Hale (1965), hecha a base de harina de frijol, modificada por Bowling (1967) y preparada según Villacorta & Cobo (1978) y la dieta Greene *et al.* (1976), a base de harina de soja y de frijol blanco, modificada por Parra (2001) (García *et al.* 2006). La composición de estas dietas aparece descrita en la tabla 1. Las dosis evaluadas oscilaron entre 0,01 y 100 $\mu$ g de proteína / mL de dieta.

Para el primer semestre de 2010, se montó un bioensayo con cinco tratamientos, un testigo absoluto y seis repeticiones, donde cada unidad experimental estaba representada por un vaso plástico de 50mL, con tapa inyectada (Envapac Ltda., Bogotá), el cual, contenía aproximadamente 4g de la dieta correspondiente y, en el cual, se colocaron cinco larvas neonatas. Para el segundo semestre de 2010, el bioensayo

montado también contaba con cinco tratamientos, un testigo absoluto y treinta repeticiones, en el que cada unidad experimental consistía en un recipiente semejante al usado en el primer bioensayo, pero en donde solamente fue puesta una larva neonata. Para el 2011, se llevó a cabo un bioensayo, donde se determinó la susceptibilidad de larvas del bellotero, comparando el uso de una o de cinco larvas por unidad experimental, utilizando la dieta ICRISAT, seis tratamientos y 30 repeticiones para los ensayos de cinco y una larva por unidad experimental, respectivamente.

La mortalidad en todos los bioensayos, se evaluó a los siete días, tal como sugiere Martínez (2004). Los datos, se sometieron a análisis Probit (SAS Institute Inc. versión 9.2 (32) Español), para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ). Además, de forma individual, se continuó la cría de las larvas sobrevivientes en cada uno de los tratamientos y repeticiones de los bioensayos del 2010, con el fin de obtener datos de peso de pupas, cuando este estado era alcanzado por las larvas de cada tratamiento. También se determinó la duración de estados. Se realizó un análisis de varianza con el complemento de Excel (MegaStat), para determinar si existían diferencias para la mortalidad entre las tres dietas con cada concentración de proteína y, posteriormente, una prueba de diferencias mínima significativa de Fisher (LSD).

Para confrontar los resultados obtenidos por el grupo de Fitosanidad de la U.D.C.A con poblaciones provenientes del mismo lugar en años anteriores, se procedió a correr los datos con el mismo código Probit (Yu, 2008), al que fueron sometidos los datos obtenidos en este experimento, con el fin de observar los cambios en la susceptibilidad de esta plaga a la proteína Cry1Ac, a través del tiempo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Influencia de la dieta:** Blanco *et al.* (2009) mencionan que la composición de la dieta influye en la susceptibilidad de una colonia, lo que se puede corroborar al observar la tabla 2, en la que se encuentran las concentraciones letales medias, en cada una de las dietas; la Shorey & Hale es aquella que menor concentración necesita para causar mortalidad del 50% de la población. Para el caso del bioensayo del semestre A, la dieta que mayor concentración requirió para obtener la CL<sub>50</sub> fue la Greene (5,36µg de proteína / mL de dieta) y para el caso del semestre B fue la dieta ICRISAT (0,41µg de proteína/mL de dieta). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Arévalo *et al.* (2011), donde los individuos mantenidos en la dieta Shorey & Hale exhibieron una mayor susceptibilidad a la proteína Cry, que los individuos alimentados con la dieta Greene e ICRISAT.

Las diferentes CL<sub>50</sub> obtenidas en cada una de las dietas muestran que el tipo de alimento influye en la respuesta de susceptibilidad, lo que Blanco *et al.* (2009) atribuyen a una alteración en la expresión de enzimas digestivas, por parte de algunos componentes del alimento. Esto puede explicar el valor obtenido en la CL<sub>50</sub> de los individuos mantenidos con la dieta ICRISAT, pues al existir una alteración en la expresión de dichas enzimas la activación de la toxina se da de forma más lenta, elevando valor en la CL<sub>50</sub>.

Blanco *et al.* (2009) sugieren que la susceptibilidad expresada por una colonia es directamente proporcional a la cantidad de alimento consumido; lo contrario se observó en los insectos que se alimentaron con la dieta Shorey & Hale (Tabla 2), ya que fue esta la que tuvo un menor consumo aparente y la que menor concentración letal media arrojó. Esto se puede atribuir, posiblemente, a la baja calidad nutricional de la dieta, ya que al no aportar los nutrientes necesarios, hace las larvas más susceptibles a la acción de la toxina.

En la figura 1, se observaron diferencias significativas para el semestre A, en la concentración de 100µg de proteína / mL de dieta ( $P > 0,04$ ); para el resto de las concentraciones, no se observó diferencia estadística. En las concentraciones 0,1; 1 y 10µg del semestre B, se detectaron diferencias altamente significativas, donde la probabilidad fue de  $1,41 * 10^{-08}$ ; 0,0002 y 0,0035, respectivamente.

Como se observa en la figura 1, la dieta ICRISAT es la que menor mortalidad genera a *Heliothis*, mientras que la dieta Shorey & Hale es la que causa la mayor mortalidad, independientemente del semestre. Lo anterior apoya la idea que la dieta Shorey & Hale no aporta los nutrientes necesarios para el normal desarrollo del bellotero.

**Influencia de la toxina:** Para determinar la influencia que tiene la proteína en el desarrollo del insecto, las larvas sobrevivientes de los bioensayos fueron alimentadas con la dieta correspondiente sin proteína. Las dietas ICRISAT y Greene permitieron que las larvas pasaran a pupa, a diferencia de los individuos alimentados con la dieta Shorey & Hale, donde ninguna de las larvas pudo formar la crisálida, en ninguna de las concentraciones.

La duración del estado larval, se incrementó conforme aumentaba la concentración de la proteína (Figura 2). Las

Tabla 2. Concentraciones letales medias (CL<sub>50</sub>) en las tres dietas meridicas, en los dos semestres de 2010.

Semestre	Dieta	CL <sub>50</sub> (µg de proteína /mL de dieta)	
		Concentración	IC (95%)
A	ICRISAT	1,79	-
	Greene	5,36	2,11 - 17,66
	S & H	0,54	0,23 - 1,33
B	ICRISAT	0,41	0,007 - 76,05
	Greene	0,24	0,014 - 4,92
	S & H	0,016	0,008 - 0,027

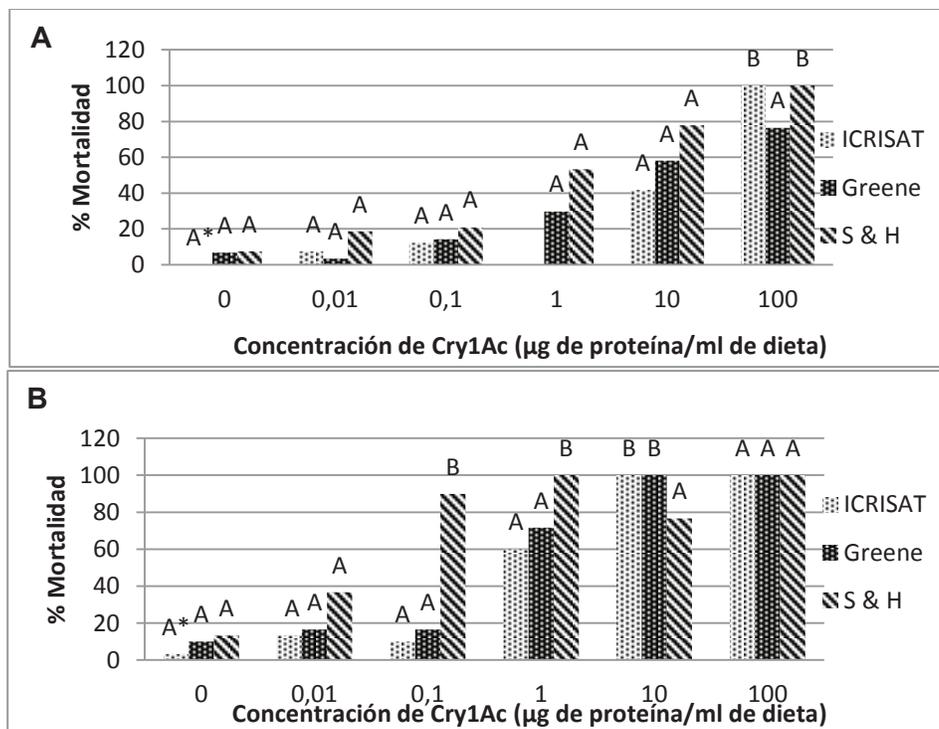


Figura 1. Mortalidad (%) de *Heliothis virescens* en tres dietas, para cada concentración de la proteína. A) Ensayo realizado en el primer semestre (2010A); B) Ensayo realizado en el segundo semestre (2010B).

\*Las mortalidades seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas entre dietas para cada concentración, por la prueba de LSD protegida de Fisher, con un 95% de confianza.

larvas alimentadas con la dieta ICRISAT necesitaron 28,75; 35; 33,1 y 48,2 días para transformarse a pupas en las cuatro primeras concentraciones de Cry1Ac, respectivamente, mientras que con la dieta Greene necesitaron 35,4; 45,5 y 37 días, en las tres primeras concentraciones, respectivamente, lo que concuerda a lo encontrado por Arévalo & Zenner de Polanía (2010); además, esa dieta permitió a algunas larvas sobrevivir a la exposición de la proteína hasta 1µg de proteína / mL de dieta, mientras que las larvas alimentadas con Greene solamente sobrevivieron hasta la concentración de 0,1µg.

Como se observa en la figura 2, en la concentración 0,1 se presentaron diferencias ( $P > f 0,0072$ ), siendo la dieta Greene la que menos posibilitó la formación de pupas en esa concentración. A diferencia de las concentraciones de 0 y 0,01 donde no se mostraron diferencias estadísticas entre las dos dietas. Estos resultados concuerdan con los hallados por Arévalo & Zenner de Polanía (2010), donde la dieta ICRISAT fue en la que las larvas requirieron un menor tiempo para la formación de la pupa.

Otra variable que permite determinar la influencia que tiene la dieta sobre el desarrollo del insecto es el peso de las pu-

pas. Arévalo & Zenner de Polanía (2010) encontraron que los pesos que se obtuvieron con la dieta Greene eran menores que los obtenidos con la dieta ICRISAT, lo cual, se confirma en la figura 3, en donde la dieta ICRISAT es la que presenta los mayores pesos, con 217; 199; 209 y 172mg en cada una de las concentraciones, respectivamente, mientras que en la dieta Greene, se obtuvieron pesos de 206mg (0ppm de Cry1Ac), 147mg (0,01 ppm de Cry1Ac), y 206mg (0,1 ppm de Cry1Ac). También, se puede observar que existen diferencias significativas entre los pesos en las dietas Greene e ICRISAT en las concentraciones de 0,01 ( $P > f 8,99 * 10^{-06}$ ) y 0,1µg ( $P > f 3,06 * 10^{-06}$ ).

El peso de las pupas es un indicador de la calidad nutricional de una dieta (Bustillo, 1979), pues con un mayor peso de las mismas existe una mayor posibilidad de supervivencia, lo que nuevamente sugiere que la dieta Shorey & Hale no cumple con los requerimientos nutricionales de esta especie, ya que ni siquiera se logró la obtención de pupas en ninguno de los tratamientos.

Al permitir el desarrollo de las larvas que sobrevivieron al bioensayo, se observó que la presión de selección ejercida

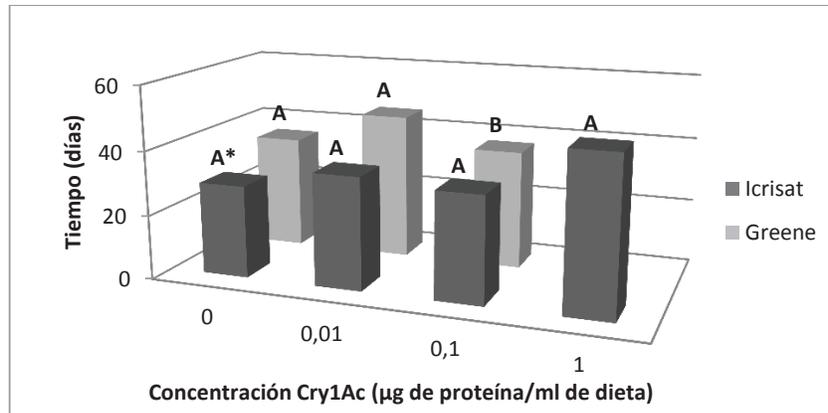


Figura 2. Duración promedio del estadio larval de *Heliothis virescens* de las larvas en dos dietas y concentraciones de la proteína Cry1AC.

\*Los tiempos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas entre dietas para cada concentración, por la prueba de LSD protegida de Fisher, con un 95% de confianza.

sobre la colonia *H. virescens* no permitió que ningún individuo completara su ciclo de vida, independientemente del tipo de alimento sobre el cual fue criado, lo que se ajusta a lo indicado por Gahan *et al.* (2010), donde se menciona que una alta concentración es letal para los insectos, pero una concentración baja altera el crecimiento de las larvas.

**Cambios en la susceptibilidad:** Al observar que existen diferentes formas, programas y versiones para obtener la concentración letal media, los datos obtenidos en este experimento, al igual que los datos logrados en los bioensayos realizados por el grupo de Fitosanidad de la U.D.C.A, con poblaciones del mismo lugar, en años anteriores, fueron sometidos al mismo algoritmo de programación para el pro-

grama del SAS, con el fin de poderlos comparar y observar los cambios en la susceptibilidad del bellotero.

En la figura 4, se observa una fluctuación en la susceptibilidad del insecto plaga, que disminuye entre el 2006 y el 2008, con CL<sub>50</sub> de 0,008 y 4,73ppm, respectivamente y que aumenta para el 2010 y el 2011, con 1,79 y 0,47ppm, respectivamente. La fluctuación en la susceptibilidad de *H. virescens* puede estar influenciada por la procedencia de los insectos, ya que la colonia colectada en 2008 era procedente de un lote de algodónero, genéticamente modificado, indicando que los individuos habían estado bajo presión de selección, haciéndolos menos susceptibles a la acción de la toxina, a diferencia de la colonia colectada para determinar la CL<sub>50</sub>,

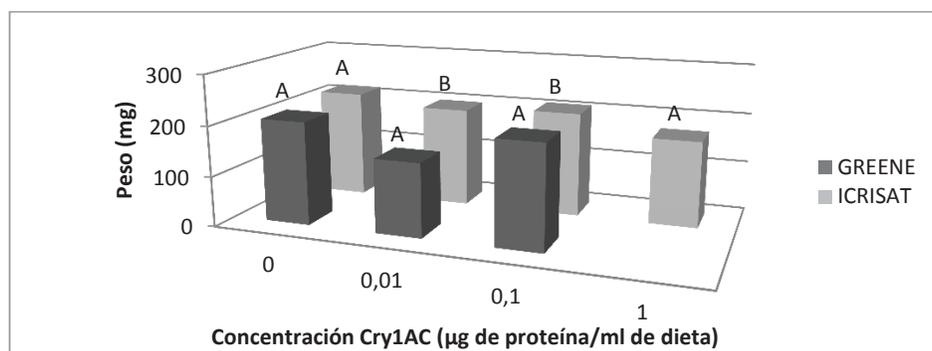


Figura 3. Peso promedio de pupas de *Heliothis virescens* en cada una de las concentraciones de la proteína, en las dietas ICRISAT y Greene.

\*Los pesos seguidos de la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas entre dietas para cada concentración, por la prueba de LSD protegida de Fisher, con un 95% de confianza.

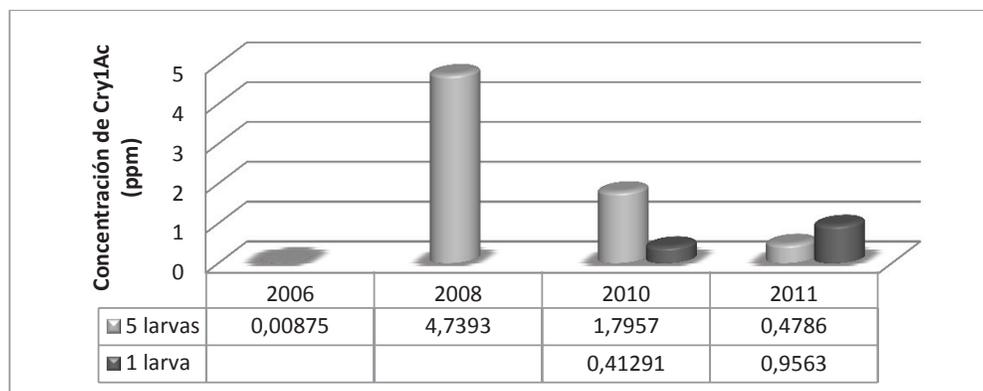


Figura 4. Concentraciones letales media de *Heliothis virescens*, a través del tiempo, con una y cinco larvas, por unidad experimental.

de 2010 y 2011, que provenía de plantas de *Desmodium* sp., que crecían en el borde de un lote sembrado con algodón convencional, en donde la baja o ausente presión de selección pudo haber incrementado la susceptibilidad de esta plaga al Cry1Ac.

**Efecto unidad experimental:** Un factor que puede estar influenciando la fluctuación en la susceptibilidad (Figura 4) es el número de larvas utilizadas por unidad experimental, pues se observó que la cantidad de insectos al final del ensayo era inferior al número de insectos puestos inicialmente, correspondiendo, posiblemente, al comportamiento de canibalismo que exhibe esta especie (Capinera, 2004). Este comportamiento, se observó con mayor frecuencia a medida que la concentración de la proteína aumentaba, pues las larvas tienden a evitar el alimento en donde existe una concentración de la proteína Cry (Gore *et al.* 2005), lo que las induce a consumir alimento con poca concentración de la proteína, llevándolas, eventualmente, a alimentarse de las otras larvas.

Como se muestra en la figura 4, la  $CL_{50}$  para el bioensayo, en donde se utilizaron cinco larvas por recipiente, se redujo 4,33 veces de 2010 al 2011, a diferencia de la  $CL_{50}$ , en la que se utilizó una larva por recipiente, que aumentó 1,99 veces, para el mismo período.

Estos resultados pueden estar influenciados por el canibalismo, puesto que la mortalidad se puede leer como consecuencia del aparente consumo de proteína y no a causa de dicho comportamiento. Así que los resultados obtenidos con el ensayo, donde se utilizó una larva, se puedan atribuir al consumo de la proteína Cry, razón por la cual, al momento de establecer un bioensayo, se debe tener en cuenta el comportamiento que presenta esta especie en la naturaleza, donde se observa que la hembra suele depositar los huevos individualmente y de forma aislada (Hallman, 1978; García, 1976).

De los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que, independientemente de la concentración letal media obtenida en ambos bioensayos en el último año, se observó que la susceptibilidad de *H. virescens* se mantiene dentro del rango que el algodón expresa de la proteína (1,67 a 4,42 ppm), reportado por Zenner de Polanía *et al.* (2008). Estas concentraciones permanecen por encima de la concentración máxima necesaria para controlar, por lo menos, la mitad de la población (1,95 ppm).

Álvarez *et al.* (1991) mencionan que la dinámica de las poblaciones de *H. virescens* no presentan ciclos definidos de infestación, por lo que, en cualquier momento, puede existir una alta densidad de esta plaga, razón por la cual, es importante seguir monitoreando la respuesta de susceptibilidad de esta especie a las proteínas Cry, con el fin de evitar la pérdida de esta herramienta en el manejo de plagas.

Los resultados confirmaron que la composición de las dietas merídicas utilizadas en bioensayos tienen influencia en la respuesta de susceptibilidad del bellotero, puesto que la dieta Shorey & Hale fue en la que se presentó una mayor susceptibilidad. Además, esta dieta no permitió completar el ciclo de vida de ninguno de los individuos. Del mismo modo, se observó que en la dieta ICRISAT se obtuvo un menor tiempo del estado larval, independiente de la concentración de la proteína, en comparación con las otras dos dietas; también fue la dieta en la que se presentaron los mayores pesos de pupas.

Además, se concluyó que la concentración letal media obtenida para *Heliothis virescens*, en el 2011 (0,956ppm), indica que el insecto ha perdido susceptibilidad a la proteína Cry1Ac expresada por el algodón Bollgard® I; sin embargo, este aun ejerce control sobre las larvas de esta especie, ya que el rango de expresión de la proteína es de 1,67 a 4,42 ppm de Cry1Ac.

Para el caso de *H. virescens*, que pone los huevos de forma individual, se sugiere que los bioensayos estén representados con una larva por unidad experimental, para aproximarse a lo que sucede en la naturaleza y, de esta manera, eliminar el efecto que tiene el canibalismo sobre los resultados de mortalidad.

Finalmente, es importante describir detalladamente los procedimientos y las herramientas utilizadas en un ensayo, con el fin de permitir a otros investigadores la reproducción del mismo y, de esta forma, evitar sacar conclusiones equivocadas sobre lo que realmente puede estar sucediendo, tanto en el experimento como en campo.

**Agradecimientos:** A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, por el apoyo financiero a la presente investigación. **Conflicto de intereses:** El artículo fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AGRO-BIO. 2012. Una historia de logros importantes para la agricultura. Disponible desde Internet en: <http://www.agrobio.org/fend/index.php?op=YXA9I2JXbDQmaW09I016UT0=> (con acceso el 26/05/12).
2. AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. 2003. Resistance to the Cry1Ac  $\alpha$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 96(4):1290-1299.
3. ALCARAZ, H. 1962. Instituto de Fomento Algodonero: Principales plagas del algodón en Colombia. Bol. Téc. 2:32-35.
4. ÁLVAREZ R., A.; SÁNCHEZ G., G.; ZENNER DE POLANÍA, I. 1991. Influencia de las condiciones ambientales en las poblaciones de *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) en el algodón. Rev. ICA. 26:197-211.
5. ARÉVALO, H.A.; ZENNER DE POLANÍA, I. 2009. Evaluación de dietas merídicas para la cría en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 12(1):79-90.
6. ARÉVALO, H.A., ZENNER DE POLANÍA, I. 2010. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 13(2):163-173.
7. ARÉVALO, H.A.; ZENNER DE POLANÍA, I.; ROMERO, L. 2011. Efecto de dietas merídicas en la toxicidad de la proteína cristalina (Cry) del *Bacillus thuringiensis* sobre tres plagas del algodón (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 14(1):39-48.
8. BLANCO, C.A.; ALI, I.; LITTRELL, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; MARTÍNEZ C., J. 2005. Susceptibility of four *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* reference colonies to a homogeneous Cry1Ac incorporated insect diet: implications for an area wide monitoring program. Belt Cotton Conferences. National Cotton Council of America. New Orleans, Louisiana. p.1226-1233.
9. BLANCO, C.A.; STORER, N.P.; ABEL, C.A.; JACKSON, R.; LEONARD, R.; LÓPEZ, J.D.; PAYNE, G.; SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; TERÁN V., A.P. 2008. Baseline susceptibility of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Ent. 101(1):168-173.
10. BLANCO, C.A.; GOULD, F.; VEGA A., P.; JURAT, F.; JUAN, L.; PERERA, O.P.; CRAIG, A. 2009. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. J. Econ. Entomol. 102(4):1599-1606.
11. BONACIC, I.; FOGAR, M.; GÜEVARA, G.; SIMONELLA, M. 2010. Algodón. Manual de campo. INTA EEA Sáenz Peña. Argentina. p.23-24. Disponible desde Internet en: [http://rian.inta.gov.ar/agronomia/Manual\\_Algodon.pdf](http://rian.inta.gov.ar/agronomia/Manual_Algodon.pdf) (con acceso el 01/12/10).
12. BOWLING, C.C. 1967. Rearing of two lepidopterous pests of rice on a common artificial diet. Ann. Ent. Soc. Am. 60(6):1215-1216.
13. BRUNS, H.A.; ABEL, C.A. 2003. Nitrogen fertility effects on Bt  $\delta$ -endotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth. Agronomy J. 95:207-211.
14. BUSTILLO, A.E. 1979. La nutrición en insectos. Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín. Boletín de Divulgación. Número 2. 43p.

15. CAPINERA, J.L. 2004. Tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida. IFAS Extension. 7p.
16. CERÓN, J. 2004. Productos Comerciales: Nativos y Recombinantes. En. Bravo, A.; Cerón, J. (eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Ed. Buena Semilla. (Colombia). p.123-147.
17. CHEN, D.; YE, G.; YANG, C.; CHEN, Y.; WU, Y. 2005. The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. Environm. Experiment. Bot. 53:333-342.
18. DONG, H.Z.; LI, W.J. 2007. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. J. Agr. Crop Sci. 193:21-29.
19. GAHAN, L.J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D.G. 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. PloS Genet. 6(12):1-11.
20. GARCÍA R., F. 1976. El Complejo *Heliothis*, sus huéspedes y sus hábitos. Rev. Col. Entomol. 2(3):75-94.
21. GARCÍA, M.S.; BUSATO, G.R.; GIOLO, F.P.; MANZONI, C.; BERNARDI, O.C.; ZART, M.; NUNES, A.M. 2006. Tabela de vida de fertilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. Rev. Bras. Agrocienc. (Pelotas). 12(1):51-55.
22. GORE, J.; ADAMCZYK, J.J.; BLANCO, A. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. J. Econ. Entomol. 98(1):88-94.
23. GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 69(4):487-488.
24. HALLMAN, G. 1978. Claves taxonómicas para las especies de *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) en Colombia. Rev. Col. Entomol. 4(3-4):61-69.
25. JANMAAT, A.F.; MYERS, J. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 270:2263-2270.
26. MARTÍNEZ, J.W. 2004. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. En. Bravo, A.; Cerón, J. (eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Ed. Buena Semilla. (Colombia). p.207-232.
27. PARRA, J.R. 2001. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: ESALQ. 134p.
28. PERLAK, F.J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRIG, R.A.; ROBERTS, J.K. 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA - early promises versus today's reality. The Plant J. 27(6):489-501.
29. SHELTON, A.M.; ROBERSON, J.L.; TANG, J.D.; PEREZ, C.; EIGENBRODE, S.D.; PRIESLER, H.K.; WILSEY, W.T.; COOLEY, R.J. 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. J. Econ. Entomol. 86:697-705.
30. SHOREY, H.H.; HALE, R.L. 1965. Mass-Rearing of the larvae of nine Noctuid species on simple artificial medium. J. Econ. Entomol. 58(3):522-524.
31. TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.J.; CARRIÈRE, Y. 2009. Field – evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory and data. J. Econ. Entomol. 102(6):2011-2025.
32. VILLACORTA, A.; COBO DE MARTÍNEZ, L.S. 1978. Efecto del modo de preparación de la dieta sobre el crecimiento y desarrollo de *Spodoptera frugiperda*. ICA (Colombia). p.96-103.
33. YU, S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press. New York. p.93-102.
34. ZENNER DE POLANÍA, I.; BORRERO F., F. 1992. Panorama nacional de susceptibilidad del algodónero a insecticidas. Agr. Trop. (Colombia). 29(2):83-95.
35. ZENNER DE POLANÍA, I.; ÁLVAREZ, A.; ARÉVALO, H.; MEJÍA, R.; BAYONA, M. 2008. Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene Cry 1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodónero. Rev. Col. Entomol. 34(1):41-50.

Recibido: Agosto 30 de 2012

Aceptado: Octubre 25 de 2012

# CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS BOVINA EN EL VALLE DE CHIQUINQUIRÁ

## CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE EPIDEMIOLOGY OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN THE CHIQUINQUIRÁ VALLEY

Juan Montaño<sup>1</sup>, Catalina Avendaño<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudiante Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.D.C.A, jsmontano89@gmail.com;

<sup>2</sup>Microbióloga Agrícola y Veterinaria, Esp. c.Ph.D. Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa Medicina Veterinaria, U.D.C.A, cavendano@udca.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 391 - 398, 2012

### RESUMEN

Dada la importancia de la criptosporidiosis en salud pública, se desarrolló un estudio en el Valle de Chiquinquirá, Boyacá-Colombia, analizando la proporción de animales y de fincas positivas y las variables alojamiento, origen del agua, edad, tamaño de hato, permanencia con la madre, alimentación y consistencia. Se evaluaron terneros menores de 30 días de edad, tomando 190 muestras de material fecal, directamente del recto, en 34 fincas. Se observaron ooquistes del parásito, en el 7 y 24%, respectivamente, en los animales y en las fincas. Se encontró asociación, estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), para las variables: municipio, edad del animal, fuente de agua y consistencia de las heces. En el municipio de Simijaca, al norte del departamento de Cundinamarca, existió diez veces más riesgo de encontrar el parásito, cuando se comparó con los municipios de Chiquinquirá y San Miguel. Los terneros muestreados con edades entre 11-20 días tuvieron seis veces más probabilidad de eliminar el parásito frente a los individuos de las otras edades. En cuanto a la calidad de agua, se observó nueve veces más riesgo de detectar ooquistes en los animales manejados con agua tratada, que en aquellos que consumían agua de pozo. Adicionalmente, existió cuatro veces más posibilidad de hallar ooquistes del parásito en la materia fecal líquida. La presentación de la criptosporidiosis bovina en la región fue menor frente a estudios previos. Se recomienda evitar el hacinamiento, aislar y tratar animales enfermos y monitorear la posible presentación de signos en los individuos que convivieron con el grupo infectado. Finalmente, implementar medidas de cuarentena y desinfección a las áreas contaminadas.

Palabras clave: Diarrea, heces, terneros, *Cryptosporidium*, Salud Pública.

### SUMMARY

In the Chiquinquirá Valley a study that sought to contribute to the characterization of bovine cryptosporidiosis was carried out. The proportion of positive animals and farms, housing variables, water origin, age, herd size, permanence with mother, food and consistency of the stool, were taken into account. Calves aged less than 30 days old, were evaluated, taking 190 stool samples directly from the rectum in 34 farms. Parasite oocysts were observed in 7% and 24% of animals and farms, respectively. Statistically significant relationship was found ( $p < 0.05$ ) in the case of the variables: township, animal age, source of water and stool consistency. In Simijaca the risk to find the parasite, when compared with Chiquinquirá and San Miguel was found to be ten times higher. Calves aged between 11-20 days were six times more likely to eliminate the parasite compared with the individuals of the other age groups. As for the water quality a probability of detecting oocysts was nine times more likely in animals handled with treated water than in those who consumed well water. Additionally, the possibility to find the parasites oocysts in liquid stool than in other consistence was four times higher. The presentation of bovine cryptosporidiosis in the region was found to be lower compared to previous studies. It is recommended to avoid overcrowding, to isolate and treat sick animals and to monitor the possible occurrence of symptoms in individuals who lived with the infected group and finally implement quarantine measures and disinfection of the areas.

Key words: Diarrhea, Feces, Calves, *Cryptosporidium*, Public health.

## INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad causada por la infección con el protozoo *Cryptosporidium* spp. del Phylum Apicomplexa (Chalmers & Davies, 2010), que tiene afinidad por varios hospedadores, incluido, mamíferos, motivo, por el que se considera un problema de salud pública, dada la posibilidad de contaminación del ambiente con ooquistes (Del Coco *et al.* 2008; Fayer *et al.* 2007; Vergara & Quílez, 2004). El principal reservorio son los bovinos, específicamente, los terneros, en los que la criptosporidiosis es responsable de una alta tasa de morbilidad, en animales menores de un mes (Broglia *et al.* 2008).

De las especies de *Cryptosporidium*, cinco son consideradas patógenas para el ser humano: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, y *C. canis* (Chalmers & Davies, 2010). En bovinos, *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. bovis* y *C. ryanae* tienen importancia a nivel poblacional, considerándose a *C. parvum* como un problema de salud pública (Fayer, 2010; Díaz de Ramírez, 2002)

En Colombia, se han realizado varios estudios sobre el tema. Vergara-Castiblanco *et al.* (2001) reportaron en la región Andina una seroprevalencia del 53% en los bovinos muestreados; Avendaño *et al.* (2010b) llevaron a cabo un estudio epidemiológico en los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, en el cual, se encontró una prevalencia del 22% en animales muestreados y también se observó que hubo una asociación entre la edad y la presencia de ooquistes, donde el periodo de mayor prevalencia se halló en los terneros que tenían entre 11 y 20 días de nacidos. Así mismo, Avendaño *et al.* (2010a) realizaron una investigación en Sabana Centro de Cundinamarca y encontraron una prevalencia similar a la hallada en los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá. Además de las variables que se tuvieron en cuenta en el estudio anterior, Avendaño *et al.* (2010a), incluyeron el nivel de precipitaciones mensual.

En las fincas, la principal fuente de contagio son los mismos animales infectados, que contaminan con sus heces las diferentes áreas; debido a este fenómeno, su prevalencia suele ser superior en explotaciones con un elevado número de animales y determinados factores, como el hacinamiento y las condiciones higiénicas deficientes. Este hecho, también suele estar relacionado con el periodo de partos, ya que el número de animales reunidos es mayor aumentando, proporcionalmente, la prevalencia (Fayer *et al.* 2000; Vergara & Quílez, 2004).

No existen terapias 100% eficaces, dado que las concentra-

ciones recomendadas para desinfectantes no son viables para eliminar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Silverlås *et al.* 2009). Los tratamientos profilácticos resultan complejos y limitados y la prevención y la reducción del riesgo son de vital importancia. Mientras no se dispongan de tratamientos farmacológicos efectivos, el control se debe fundamentar en prácticas de manejo, basadas en nutrición e higiene de los terneros y las áreas que ocupan, para así minimizar el grado de exposición al agente infeccioso, aumentando el nivel de resistencia de los neonatos, reduciéndose significativamente la morbilidad de los animales (Chalmers & Davies, 2010; Díaz de Ramírez, 2002).

Con este estudio, se pretendió contribuir al conocimiento de la epidemiología de la criptosporidiosis bovina en Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objeto de evaluar la asociación entre el efecto negativo del parásito y los factores de riesgo, se realizó un estudio epidemiológico descriptivo dirigido no aleatorio. Durante febrero, marzo y abril de 2012, se tomaron 190 muestras de materia fecal, recolectadas directamente del recto de los terneros menores de 30 días. Las 34 fincas, se seleccionaron de acuerdo al número de partos, incluyendo en el estudio aquellas que tenían más de seis terneras por mes. El muestreo, se realizó en fincas localizadas en los municipios de Chiquinquirá (37%), de San Miguel (17%), de Simijaca (13%), de Susa (24%) y de Saboyá (9%), pertenecientes a la región del Valle de Chiquinquirá. Las muestras fueron tomadas de terneros con y sin diarrea, basados en su consistencia en el momento de la colecta. Cada finca fue visitada una vez, con lo cual, a cada animal se le tomó una muestra de heces, durante el estudio. Una vez llegaron las muestras al laboratorio de investigaciones parasitarias de la U.D.C.A, se les realizó la tinción de Heine (Heine *et al.* 1984). La observación, se llevó a cabo en aumento de 40x y se verificó en aumento de 100x. La intensidad de la infección, se estimó empleando el promedio del número de ooquistes observados por campo microscópico (CM) de 100x, estableciéndose los siguientes criterios de evaluación:

a) Negativo	Ausencia de ooquistes
b) +	0 – 1 ooquistes / CM
c) ++	1 – 3 ooquistes / CM
d) +++	3 – 5 ooquistes / CM
e) ++++	> 5 ooquistes / CM

Las variables tenidas en cuenta, su distribución y el número de muestras tomadas para cada caso, se observan en la tabla 1.

Tabla 1: Variables tenidas en cuenta, distribución y número de muestras tomadas para cada caso.

VARIABLE	DISTRIBUCIÓN	NÚMERO DE MUESTRAS
Edad del ternero	4 - 10 días	40
	11 - 20 días	76
	21 - 30 días	74
Consistencia de las heces	Líquida	24
	Pastosa	166
Tamaño del hato	< 100 vacas	82
	101 - 200 vacas	36
	201 - 300 vacas	57
	> 300 vacas	15
Fuente del agua	Tratada	41
	Acueducto	59
	Pozo	90
Número de animales reunidos	< 15	41
	16-30	50
	>30	49
Tipo de alojamiento	Estabulado	26
	Potrero con estaca	146
	Potrero en corral	18
Tiempo de permanencia con la madre	1 día	36
	2 días	33
	3 días	96
	4 días	25
Tipo de Alimentación	Lactoreemplazador	46
	Leche	144

**Análisis estadístico:** Para medir la fuerza de asociación de las variables estudiadas, se realizó la prueba  $\chi^2$ ; en tanto que, para hallar la razón de disparidad entre las mismas, se usó la prueba odds ratio. Las variables tenidas en cuenta, se encuentran en la tabla 1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Proporción de animales positivos:** De 190 animales muestreados, se observaron ooquistes del parásito en el 7%, (14/190), en tanto que en el 24% (8/34) de las fincas muestreadas, se evidenció al menos un animal positivo (Gráfica 1). Al organizar cronológicamente el estudio actual y los anteriores (Avendaño *et al.* 2010a,b), el análisis estadístico de la prevalencia demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ) entre las proporciones halladas, tanto para la proporción de terneros positivos como

la proporción de explotaciones positivas a *Cryptosporidium* spp., lo que demostraría un comportamiento similar del parásito, a pesar de la diferencia de las regiones y el tiempo de realización del trabajo. Este hecho demuestra que, independientemente de la proporción, el parásito tiene una distribución cosmopolita. La diferencia en la proporción de los animales positivos, se pudo deber a la reducción del tamaño de los hatos, así como a la disminución en la cantidad de partos, hechos que fueron generados por la ola invernal que afectó a la región durante el 2011, obligando a la movilización del ganado a otras zonas, provocando alteraciones reproductivas en los animales.

**Intensidad de la infección:** En el 64% de las muestras positivas a *Cryptosporidium* spp., se encontró una intensidad de la infección baja. En tres de las 14 muestras positivas (22%), se reportaron dos cruces, mientras que en dos de 14 (14%), se evidenció una intensidad alta; ninguna muestra

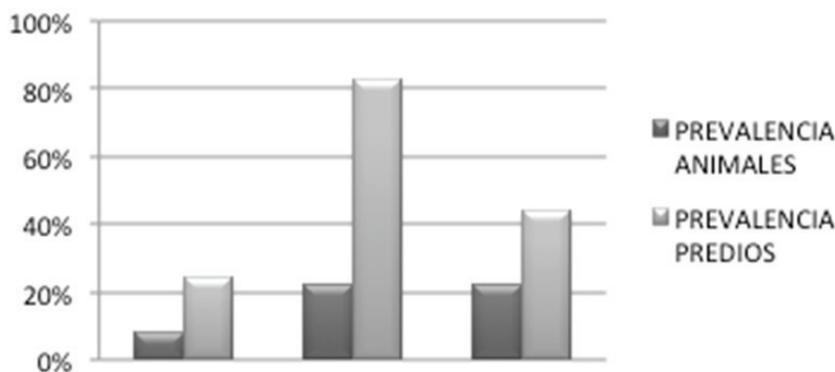
se reportó con tres cruces (+++). Los hallazgos coinciden con lo reportado en la misma zona de estudio por Avendaño *et al.* (2010b). Esto puede estar dado por el periodo de prepatencia y patencia del parásito, así como al momento en el que se tomó la muestra. Adicionalmente, la intensidad de la enfermedad está siempre ligada a diferentes variables, como el número de partos presentes en una misma temporada, la edad, la zona geografía específica y la fuente de agua.

**Infección por municipio:** Al analizar los municipios de manera conjunta, se encontró una asociación estadística entre la del municipio y la presencia de *Cryptosporidium* spp. ( $p > 0,002$ ). Del mismo modo, al analizarlos de manera individual, se apreció relación estadísticamente significativa, cuando se comparó lo hallado en Simijaca respecto al municipio de Chiquinquirá y de San Miguel ( $p < 0,02$ ), existiendo diez veces más posibilidades de encontrar ooquistes del parásito en las heces. Consecuentemente a los resultados, Simijaca presentó el mayor número de animales positivos (6/24) sobre el número total de terneros muestreados, en este municipio. El paralelo efectuado entre las muestras positivas demostró que Simijaca tuvo el mayor número de muestras positivas, frente a Chiquinquirá (2/70), San Miguel (1/32), Susa (5/46) y Saboyá (0/18) (Gráfica 2). El hecho de no haber encontrado ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las heces de los animales muestreados en el municipio Saboya no indica que se encuentre libre del parásito. Para afirmar lo anterior, sería necesario realizar más estudios en la zona trabajando en todas las fincas de la región, durante un tiempo mayor.

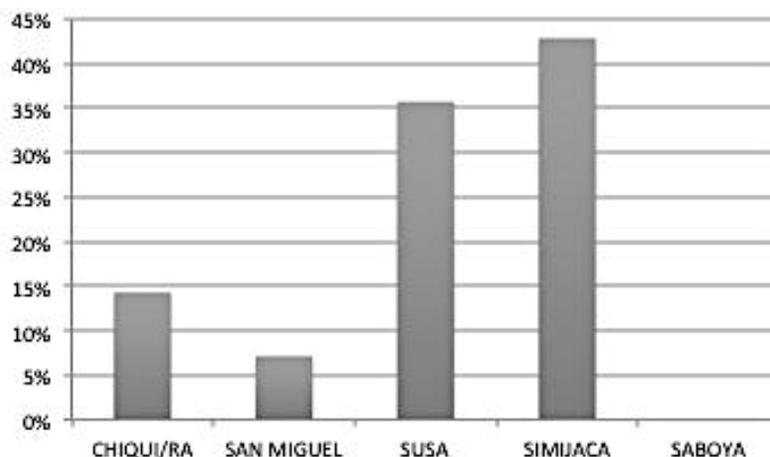
**Infección asociada al alojamiento de los animales:** Al comparar los diferentes tipos de alojamientos con la observación del parásito en las heces, no se encontró una relación estadísticamente significativa ( $p > 0,1$ ), lo que indicaría que, para este estudio, la presencia de ooquistes en las heces no

fue dependiente del sitio en que el animal se hallaba alojado. Este resultado difiere con lo reportado por Avendaño *et al.* (2010a), quienes evidenciaron una relación estadísticamente significativa, entre los diferentes tipos de alojamiento y la presencia del parásito ( $p < 0,01$ ). De los 146 animales pertenecientes al grupo manejado en potrero con estacas, en el 8% se observó, al menos, un ooquiste del parásito en las muestras analizadas del total recolectadas, bajo esta misma condición; los animales mantenidos en corral externo presentaron una positividad del 6% dentro de las muestras colectadas en fincas, que realizan este tipo de manejo; en el 4% de los animales estabulados, se encontró, al menos, un ooquiste de *Cryptosporidium* spp. Contrario a lo reportado en este estudio, Muhid *et al.* (2011) encontraron una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), cuando compararon el tipo de suelos, en el cual, se encuentran los terneros respecto a los porcentajes de positividad. La desinfección de los terneros o establos, se realiza con productos ineficaces frente a esta parásito. La presencia de los ooquistes prevalece por el manejo inadecuado en las prácticas de desinfección y el uso de productos, a concentraciones no aptas (Quílez *et al.* 2005). Se debe tener en cuenta no existe un tratamiento profiláctico que sea 100% efectivo, lo que dificulta las labores de lavado y de desinfección (Vergara & Quílez, 2004; Avendaño *et al.* 2010a).

**Infección asociada a la fuente de agua:** De los 14 animales positivos, el manejo se distribuyó de la siguiente manera: manejo con agua tratada, el 50%; un 36%, los terneros eran manejados con agua de acueducto y un 14%, con agua de pozo. En un análisis individual de la distribución de animales positivos con cada uno de los manejos, se obtuvieron 41 muestras de terneros, cuyas fincas trabajaban con agua tratada, de los cuales, el 20,6% resultó positivo a *Cryptosporidium* spp.; los animales manejados con agua de acueduc-



Gráfica 1: Comparación de los resultados de animales y predios positivos, obtenidos en los estudios realizados en la región. De izquierda a derecha: Montañó & Avendaño (Actual), Avendaño *et al.* (2010a), Avendaño *et al.* (2010b).



Gráfica 2: Proporción porcentual de animales positivos a *Cryptosporidium* spp. por municipio, en el Valle de Chiquinquirá, durante febrero, marzo y abril de 2012.

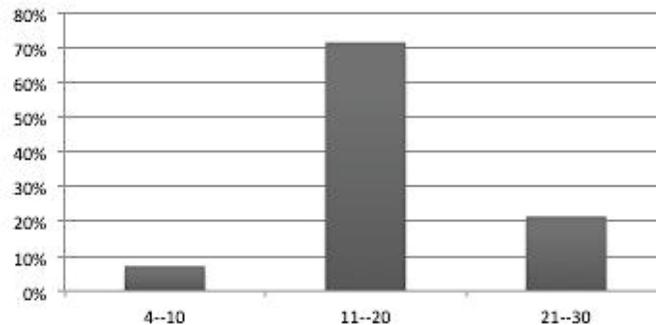
to fueron 59, hallándose ooquistes del parásito, en el 36%; finalmente, 90 terneros eran manejados con agua de pozo, donde el 14% resultó positivos. Al comparar las fuentes hubo relación estadísticamente significativa, entre los elementos analizados ( $p < 0,01$ ), existiendo 9 veces más riesgo que se presente la enfermedad, si se usa el agua tratada. El resultado es acorde con lo reportado por Quílez *et al.* (2005), quien hace referencia al agua tratada con sustancias cloradas, que no tienen efecto alguno sobre los ooquistes. Broglia *et al.* (2008) sostienen que durante los últimos años el incremento de la criptosporidiosis en el mundo tiene una relación muy particular con la calidad el agua.

**Infección asociada a la alimentación:** Al analizar los resultados, no se encontró una relación estadísticamente significativa ( $p > 0,09$ ), entre el tipo de alimentación y la presencia de ooquistes en las heces de los terneros. De los 46 terneros alimentados con este lactoreemplazador, en el 15% de las muestras se observó, al menos, un ooquiste en la muestra de materia fecal analizada; en los otros 144 terneros, que eran alimentados con leche, se halló un 5,9% de muestras positivas. Contrario a lo obtenido en el estudio de Trotz-Williams *et al.* (2008), en el que reportaron una relación estadística ( $p < 0,02$ ), presentándose dos veces mayor posibilidad de desarrollar la enfermedad en los animales, que son alimentados con lactoreemplazador, respecto a los alimentados con leche. Esta respuesta puede tener relación con los métodos ineficientes de desinfección de los elementos usados para la preparación del lactoreemplazador, como baldes y el mezclador, además del origen del agua tomada para la elaboración del producto a ofrecer al ternero (Avendaño *et al.* 2010a; Trotz-Williams *et al.* 2007).

**Infección asociada al tamaño de hato:** De las 14 muestras

positivas, se obtuvieron 14% en el primer grupo; en el segundo, 21%; del tercero, 57% y 7%, del último grupo. De las 80 muestras recolectadas en el primer grupo, se encontró el 2,5% de los animales positivos; en el segundo, con 36 terneros, los animales positivos correspondieron al 9,1%; en el tercer grupo que tenía 57 muestras, fue en el que se reportaron más muestras positivas, 16,3%; el último grupo, con un 7,1% terneros positivos, estaba compuesto por 15 muestras. El estudio de comparación de todas las variables en un mismo conjunto no mostró relación estadística ( $p > 0,082$ ). Esto coincide con lo reportado por Avendaño *et al.* (2010a), quienes no encontraron relación estadística, entre el tamaño de hato y la presencia de ooquistes en las heces de los terneros; sin embargo, se debe tener en cuenta lo reportado por Vergara & Quílez, (2004), quienes indicaron que la presencia de la enfermedad es mayor en los hatos que tienen periodos de parto muy cercanos, promoviendo la sobrepoblación.

**Infección asociada a la edad de los animales:** La población que mayor número de animales positivos reportó fue la contemplada entre los 11 y 20 días de edad (10/76); la población de terneros que tenían 4 – 10 días fue la que mostró la más baja positividad (1/40); en grupo de terneros que tenían 21 a 30 días de edad, se encontraron tres animales positivos. De las 14 muestras positivas, 10 provinieron de terneros, cuya edad oscilaba entre los 11 – 20 días (Gráfica 3). La evaluación general de los grupos de edad mostró relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ); al hacer la comparación de manera individual, también se demostró la existencia de una relación estadística entre los terneros, cuya edad oscilaba entre los 11 – 20 días, con los animales que tenían 4 – 10 días y los terneros con 11 – 20 días, frente a los que tenían 21 – 30 días de edad ( $p < 0,05$ ). Los animales entre 11 y 20 días de edad tuvieron 6 y 3,5 veces



Gráfica 3: Proporción de animales positivos a *Cryptosporidium* spp. en los grupos de edad (en días), muestreados en los predios del Valle de Chiquinquirá, durante febrero, marzo y abril de 2012.

más riesgo de presentar la enfermedad, respectivamente. La edad de los animales es un factor importante, teniendo en cuenta el tiempo de prepatencia del parásito y el desarrollo de la enfermedad. Se ha hablado que la eliminación inicia alrededor de la segunda o tercera semana, con un leve riesgo que se inicie la eliminación de ooquistes en heces, durante la primera semana (Trotz-Williams *et al.* 2007). Por su parte, los estudios que han realizado pruebas con medicamentos, también mencionan la presencia de la infección y la eliminación cerca a la primera semana de vida, disminuyendo al final de la tercera semana, alrededor del día 20 (Harp & Goff, 1998). También es acorde con lo reportado por Avendaño *et al.* (2010a), en el estudio desarrollado en la Sabana Centro de Cundinamarca, donde encontraron una mayor prevalencia en la segunda y tercera semana, respectivamente; sin embargo, solamente se halló relación estadística significativa en aquellos animales que se encontraban en la semana 4 ( $p < 0,03$ ). En los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, se encontró una asociación entre los animales que presentan edad entre 11–20 y la presencia de ooquistes en heces ( $p < 0,01$ ) (Avendaño *et al.* 2010b).

**Infección asociada al tiempo de permanencia del ternero con la madre:** De las 14 muestras positivas, 14% pertenecían a animales que permanecieron con su madre por 1 día; los que duraron 2 días, representaron el 7% de la población positiva; mientras que, en el grupo de los terneros que permanecieron 3 días con la madre, se encontró al menos un ooquiste de *Cryptosporidium* spp. en las heces, que corresponde al 71% del total de la población de animales positivos; los terneros que permanecen con su madre 4 días, reportaron el 7%. Al hacer la comparación general no se evidenció relación estadística entre las variables ( $p > 1,0$ ). Estos resultados fueron similares a los reportados en el estudio de Avendaño *et al.* (2010a,b), donde tampoco se encontró

relación estadística significativa ( $p > 0,2$ ); un valor muy cercano al hallado en el presente estudio. Silverlås *et al.* (2009) y Trotz-Williams *et al.* (2007, 2008), descubrieron resultados diferentes, indicando que la madre puede llegar a ser determinante en el momento de infectar al ternero, ya que la vaca se puede comportar como un portador asintomático. Esta variable tiene una relación estrecha con el consumo de calostro, el cual, según los estudios, no presenta actividad efectiva sobre la presencia del parásito en cuanto a los anticuerpos; sin embargo, los ácidos grasos que lo componen sí tienen efecto sobre el microorganismo, puesto que evitan la adhesión al epitelio intestinal (Boulter-Bitzer *et al.* 2007; Schnyder *et al.* 2009).

**Infección asociada al número de terneros reunidos:** Del total de las 14 muestras positivas, la mayor prevalencia (11,4%) de animales positivos, se encontró en el grupo donde habían más de 30 animales reunidos; para los grupos de 16 a 30 y menores de 15 terneros, los resultados disminuyeron (6,4% y 7,1%) casi que a la mitad, respectivamente. Al realizar la comparación general de los grupos no se encontró relación estadísticamente significativa ( $p > 0,06$ ); contrario a lo reportado por Vergara & Quilez (2004), quienes encontraron que, a mayor cantidad de terneros reunidos, se incrementa el riesgo de contaminación.

**Infección asociada a la presencia de heces diarreas:** La presencia de diarrea o no, es una descripción poco diciente, ya que esto depende del tiempo que transcurre entre la infección con el parásito y el día en el que sea tomada la muestra de materia fecal (Trotz-Williams *et al.* 2007); sin embargo, el actual estudio reveló una mayor presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en aquellos animales que presentaron diarrea al momento de la toma (64%). Al analizar los datos obtenidos, se halló una relación estadística

camente significativa ( $p < 0,007$ ), contrario a lo observado por diferentes autores, como Avendaño *et al.* (2010b); Harp & Goff (1998); Nydam & Mohammed (2005); Vergara & Quílez (2004), quienes no encontraron una relación estadística ( $p > 1,0$ ); no obstante, en el estudio realizado por Avendaño *et al.* (2010a) en la Sabana Centro de Cundinamarca, se evidenció una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ), indicando que en dicha región existió cinco veces más probabilidades de hallar los ooquistes en la heces líquidas. La presencia de los signos de la infección ocasionada por *Cryptosporidium* spp. y su severidad están relacionados con el estado inmune del ternero, además de otros factores externos, que promuevan la aparición de la diarrea.

La presencia o ausencia de diarrea, además de la eliminación de ooquistes, durante la infección con *Cryptosporidium* spp. está ligada a dos factores: el día de toma de la muestra postinoculación y el desarrollo o no de este signo. En el estudio de Harp & Goff (1998), en el cual, se trabajó la inmunización de terneros con ooquistes de *C. parvum*, revelan que la diarrea se inicia alrededor del octavo día postinfección; del mismo modo, en los diez animales usados como control, solamente nueve mostraron diarrea, por un periodo de cuatro días, clínicamente. De igual manera, se evaluó la eliminación de ooquistes en heces, que inicia alrededor del día cinco o seis y dura, aproximadamente, cinco días. Entonces, de este modo, el día de la toma de la muestra es un factor determinante en la presencia o no de ooquistes y de diarrea, pudiendo encontrar resultados falsos negativos.

Diferentes elementos han sido determinantes en la presencia de la criptosporidiosis, que se han investigado como variables que favorecen el ciclo de vida y desarrollo del parásito. En la región estudiada, se encontró una prevalencia del 7% en las muestras analizadas. El municipio que mayores muestras positivas reportó fue Simijaca, con una prevalencia del 33%; el municipio menos afectado fue Saboya, donde no se hallaron animales positivos. La mayor población de animales reunidos, se observó en el municipio más afectado, pero no se encontró una relación estadísticamente significativa ( $p > 0,1$ ); sin embargo, se concluyó que a mayor cantidad de terneros reunidos aumenta, proporcionalmente, la probabilidad de presentarse la enfermedad. La edad, como un factor determinante, confirmó lo observado en otros estudios, reportándose que el rango de mayor presencia de la enfermedad está entre 11 y 20 días de nacidos, momento, en el que la dinámica del parásito ha llevado a cabo su proceso de infección y ha iniciado su eliminación (Avendaño *et al.* 2010a). El tipo de alimentación no tuvo significancia estadística ( $p > 1,0$ ); sin embargo, se observó que en proporción la mayoría de animales positivos fueron alimentados con lactoreemplazador, con una prevalencia del 15%; esto se puede deber al agua que se está manejando para la preparación de este alimento y, posiblemente, a la presencia de fómites en los

baldes, teteros o mangueras, que tienen un contacto directo o indirecto con el ternero. El tipo de alojamiento no presentó relación estadísticamente significativa ( $p > 0,2$ ); no obstante, hubo mayor prevalencia en aquellos animales alojados en potrero, en donde no se acostumbra a realizar procesos de desinfección ni de descanso, como medida profiláctica contra el parásito y sí potencializa la presencia del microorganismo.

**Conflicto de interés:** Los autores del presente escrito declaran que no existe conflicto de intereses que pongan en riesgo la validez de los resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AVENDAÑO, C.; AMAYA, A.; BAYONA, M. 2010a. Caracterización epidemiológica de la Criptosporidiosis en bovinos en la región Sabana Centro (Cundinamarca). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 13(2):109-116.
2. AVENDAÑO, C.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. 2010b. Prevalencia de *Cryptosporidium* en terneros en el Valle de Ubaté – Chiquinquirá (Colombia). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 13(1):41-47.
3. BOULTER-BITZER, J.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. 2007. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. Biotechn. Advances. 25(1):13-44.
4. BROGLIA, A.; RECKINGER, S.; CACCIÓ, S.M.; NÖCKLER, K. 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. Vet. Parasitol. 154(1-2):8-13.
5. CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Exp. Parasit. 124(1):138-46.
6. DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A. 2008. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. Veterinary parasitology, 158(1-2): 31-35.
7. DÍAZ DE RAMÍREZ, A. 2002. Criptosporidiosis en el ganado bovino. Memorias: XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. ULA-Trujillo 2002. p.1-10.
8. FAYER, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124(1):90-77.
9. FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. 2000. Epidemiology

- of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30:1305-1322.
10. FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J.M. 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet. Parasit.* 145(3-4):260-266.
  11. HARP, J.A.; GOFF, J.P. 1998. Strategies for the control of *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *J. Dairy Sci.* 81(1):289-294.
  12. HEINE, J.; POHLENZ, J.F.L.; MOON, H.W. 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J. Infect. Dis.* 150(5):768-775.
  13. MUHID, A.; ROBERTSON, I.; NG, J.; RYAN, U. 2011. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. *Exp. Parasitol.* 127(2):534-538.
  14. NYDAM, D.V.; MOHAMMED, H.O. 2005. Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* species infection in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 88(11):3932-3943.
  15. QUILÉZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; AVENDAÑO, C.; del CACHO, E.; LÓPEZ-BERNAD, F. 2005. Efficacy of Two Peroxygen-Based Disinfectants for Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2479-2483.
  16. SCHNYDER, M.; KOHLER, L.; HEMPHILL, A.; DEPLAZES, P. 2009. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Vet. Paras.* 160(1-2):149-154.
  17. SILVERLÅS, C.; BJÖRKMAN, C.; EGENVALL, A. 2009. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Prevent. Vet. Med.* 91(2-4):73-84.
  18. TROTZ-WILLIAMS, L.; MARTIN, S.W.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.; NYDAM, D.V.; PEREGRINE, A. S. 2008. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Prevent. Vet. Med.* 83(1):11-23.
  19. TROTZ-WILLIAMS, L.; MARTIN, S.W.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.; NYDAM, D.V.; PEREGRINE, A.S. 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Prevent. Vet. Med.* 82(1-2):12-28.
  20. VERGARA, C.; QUILÉZ, J. 2004. Criptosporidiosis: Una Zoonosis Parasitaria. *MVZ Córdoba.* 9(1):353-404.
  21. VERGARA-CASTIBLANCO, C.A.; QUILÉZ-CINCA, J.; FREIRE-SANTOS, F.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; ARES-MAZÁS, M.E. 2001. Serological response to *Cryptosporidium parvum* in adult cattle from the Andean region of Colombia. *Parasit. Res.* 87(6):500-504.

Recibido: Agosto 14 de 2012

Aceptado: Octubre 18 de 2012

# CALIDAD FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LECHES CRUDAS EN EMPRESAS GANADERAS DEL SISTEMA DOBLE PROPÓSITO EN MONTERÍA (CÓRDOBA)

## PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK IN LIVESTOCK ENTERPRISES DUAL PURPOSE SYSTEM IN MONTERIA (CORDOBA)

Alfonso Calderón<sup>1</sup>, Virginia Rodríguez<sup>2</sup>, Germán Arrieta<sup>3</sup>, Nicolás Martínez<sup>4</sup>, Oscar Vergara<sup>5</sup>

<sup>1</sup>M.V.Z, M.Sc, Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), Montería, Colombia, alcaran1@yahoo.com; <sup>2</sup>Bacteriologa, M.Sc, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias de la Salud, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), Montería Colombia, consuelorr1@yahoo.com; <sup>3</sup>Microbiólogo, M.Sc, Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), Montería, Colombia arrietager@yahoo.com; <sup>4</sup>M.V.Z, M.Sc, Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Producción Animal Tropical, Montería, Colombia nicon126@gmail.com.co; <sup>5</sup>Zoot, Esp, Dr. Sc, Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Producción Animal Tropical, Montería, Colombia, overgara@correo.unicordoba.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 399 - 407, 2012

### RESUMEN

La mastitis es la inflamación de las glándulas mamarias, como respuesta para neutralizar agentes infecciosos y retornar a la función normal. Esta respuesta inflamatoria afecta la síntesis de los diferentes componentes, lo que reduce la calidad de la leche. El propósito de este estudio fue determinar calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche cruda de tanques y la sanidad de las ubres, en 15 empresas del sistema doble propósito, en Montería (Córdoba), escogidas por muestreo no probabilístico y un estudio transversal. Se recolectó una muestra de leche de tanque en cada una de las empresas involucradas en el estudio. Se determinó densidad, porcentajes de acidez, proteína, lactosa, mesófilos, recuento de células somáticas y la prevalencia de la mastitis, por medio de la prueba del CMT. Por extrapolación, se calcularon las pérdidas económicas. El análisis estadístico, se realizó mediante el programa SAS. Los valores fisicoquímicos, se encontraron dentro de los valores normales. El recuento de mesófilos fue de  $160.347 \pm 213.354$  Ufc/mL y el de células somáticas de  $345.133 \pm 302.241$  CS/mL. En todas las empresas, la prevalencia de la mastitis varió desde el 13,8% hasta el 74,7%. Se encontró regresión lineal entre la prevalencia de la mastitis y el recuento de células somáticas ( $R^2=0,867$ ). En siete de estas empresas, el recuento de células somáticas fue mayor a 250.000 CS/mL, lo cual, amerita la implementación inmediata de programas de prevención y de control de la mastitis bovina.

Palabras clave: Calidad fisicoquímica, calidad microbiológica, sanidad de la ubre.

### SUMMARY

Mastitis is the inflammation of the mammary glands in response to neutralize infectious agents and return to normal function. This inflammatory response decreases the synthesis of different components, which reduce the milk quality. The purpose of this study was to determine physicochemical and microbiological quality of tank milk and the udder health in 15 dual-purpose system enterprises in Monteria (Cordoba), chosen by non-probability sampling and a cross-sectional study. A tank milk sample in each of the enterprises involved in the study was collected. The density, acidity percentage, protein, lactose, mesophilic and somatic cell count was determined. Also, the prevalence of mastitis and, by extrapolation, economic losses were calculated. Statistical analysis was executed using SAS software. Physicochemical values were within normal values. Mesophilic count was  $160.347 \pm 213.354$  Cfu/mL and somatic cell count of  $345.133 \pm 302.241$  SC/mL. In all enterprises the prevalence of mastitis varied from 13.8% to 74.7%. Linear regression was found between the prevalence of mastitis and somatic cell count ( $R^2=0,867$ ). In seven of these enterprises, somatic cell count was up to 250.000 SC/mL, which warrants the immediate implementation of prevention and control of bovine mastitis.

Key words: physic-chemical quality, microbiologic quality, udder health.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, se presentan dos sistemas de producción de leche: el sistema especializado y el doble propósito; según la encuesta nacional agropecuaria (ENA, 2009), se estimó que este último sistema representando el 50% del total producido. En Córdoba, se presenta un desconocimiento de la calidad físico-química y microbiológica de la leche fresca. Calderón *et al.* (2006, 2007) muestran valores superiores o inferiores respecto a los mínimos establecidos en el decreto 616 del 28 de febrero del 2006.

Las actuales políticas agropecuarias para el sector lácteo (Documentos Conpes 3376 y 3675, Resolución No 00012 del 2007 y Resolución No 00017 del 2012) y los retos de los tratados de libre comercio (TLC) deben desarrollar instrumentos que permitan disminuir los costos de producción, incrementar la competitividad, productividad (volumen - calidad), proteger la salud de las personas y fortalecer la capacidad para obtener la admisibilidad de la leche a mercados más exigentes.

El Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (2005) reportó que el 47,2% de los colombianos, entre 2 y 64 años de edad, consumen diariamente leche líquida (higienizada o no), por lo tanto, la leche constituye uno de los principales elementos de la canasta familiar (ENSIN, 2005).

La leche de excelente calidad debe presentar un porcentaje de proteína >3,2%, grasa >3,5, sólidos totales >12,2 un bajo número de mesófilos <50.000 Ufc/mL y de células somáticas <100.000 CS/mL (Calderón *et al.* 2006), libre de inhibidores y se debe asegurar su inocuidad (MinProtección, Decreto 616). Entre las propiedades físicas está la gravedad específica o densidad, que expresa el peso de un litro de leche en kilogramos; se ha establecido que la densidad de la leche en Colombia es de 1,030 a 1,033g/mL a 15°C (MinProtección, Decreto 616). Valores muy bajos, se puede deber a la adición de agua y muy altos a la falta de proteína y energía (Gerber, 1994).

La acidez se modifica por la transformación de la lactosa en ácido láctico por acción de *Streptococcus* lácticos (Nasanovsky *et al.* 2001) y se expresa como porcentaje de ácido láctico (Chacón, 2006). En Colombia, la leche fresca posee una acidez normal entre 0,13 a 0,18% de ácido láctico (MinProtección, Decreto 616). El principal componente químico es la caseína, conformada por  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína, que son el 80% de las proteínas totales. Dentro de las proteínas del suero están  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, inmunoglobulinas y seroalbúminas (Baró *et*

*al.* 2001). La grasa es una mezcla de triglicéridos, formados por ácidos grasos; su concentración en la leche de vacas es de, aproximadamente, del 4%, aunque hay una variación por grupo racial (Magarinos, 2000).

La mastitis es la inflamación de las glándulas mamarias, como respuesta para neutralizar agentes infecciosos, reparar el epitelio alveolar y retornar a la función normal (Radostits *et al.* 2002); por la presencia o por la ausencia de signos clínicos, se puede clasificar en clínica y en subclínica; en ambos casos, existe un incremento de las células somáticas (Philpot & Nickerson, 2000; Saran & Chaffer, 2000; Radostits *et al.* 2002).

Las células somáticas corresponden a células epiteliales y algunos leucocitos (macrófagos, neutrófilos y linfocitos); en la mastitis, se presenta lisis de la barrera endotelial, lo que origina una mayor difusión de componentes del plasma sanguíneo al lumen de los acinos (Blowey & Edmonson, 1999; Saran & Chaffer, 2000; Philpot & Nickerson, 2000). En una leche sin mastitis subclínica esta celularidad es baja, pero en leches procedentes de cuartos con mastitis subclínicas o clínicas, su número se incrementa y su proporción cambia, de acuerdo a la severidad de la inflamación (Fernandes & Oliveira, 2006). La función de estas es lisar a los patógenos y remover los desechos producidos en el foco de infección, mediante proteasas, lipasas y fosfolipasas; enzimas e inhibidores bacterianos, que se incorporan a la leche, capaces de acelerar la descomposición de la proteína y de la grasa, confiriéndole un sabor desagradable, reduciendo la vida útil de los derivados lácteos en las góndolas de los supermercados (Saran & Chaffer, 2000; Ma *et al.* 2000).

El objetivo del presente estudio fue determinar calidad fisicoquímica, microbiológica de la leche cruda de tanque y la sanidad de las ubres, en algunas empresas del sistema doble propósito en Montería, Córdoba, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En 15 empresas ganaderas del sistema doble propósito en Montería, por medio de un estudio epidemiológico transversal y un muestreo no probabilístico (Martín *et al.* 1987), en 1065 vacas en producción, se evaluó la sanidad de la ubre, por medio de la prueba de California para mastitis (CMT), siguiendo la metodología descrita por Philpot & Nickerson (2000). Igualmente, ese mismo día se recolectó una muestra de leche de tanque de la siguiente forma: en donde la leche era almacenada en tanques refrigerados, una vez finalizado el ordeño, previa agitación por diez minutos, se obtuvo una muestra de leche por medio de un cucharón de acero inoxidable estéril; y en donde la leche fue almacenada en cantinas, de cada una de las cantinas y por medio de un agitador manual de acero inoxidable estéril, se mezcló

durante 3 o 4 minutos, seguidamente con el cucharón de acero inoxidable estéril, se tomó una submuestra de 15mL, que se mezclaron en un recipiente de acero inoxidable estéril; posteriormente, se mezclaron las submuestras y se tomaron de estas una muestra de leche, de 15mL. Todas las muestras, se recolectaron en un tubo estéril, previamente rotulado y, de inmediato, se conservaron en refrigeración (4°C), hasta su procesamiento en el laboratorio de Lactología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba, (Colombia).

A cada una de las muestras se les determinaron los parámetros fisicoquímicos por duplicado. La densidad, se determinó por medio del termolactodensímetro de Queveny y su lectura se corrigió a 15°C (Icontec, 1993). La acidez, se evaluó por titulación con hidróxido de sodio 0,1N (Icontec, 1993) y se reportó como porcentaje de ácido láctico (a. láctico); el porcentaje de grasa, por medio del método de Gerber (Gerber, 1994); el porcentaje de proteína, se obtuvo por medio de un analizador ultrasónico de leche (Biolac 60) y el de sólidos totales (% ST), por medio de la fórmula de Babcock (Jaramillo *et al.* 1999). El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, se determinó por medio del recuento estándar en placa (Invima, 1998), usando un sistema comercial (Petrifilm®) y el recuento de células somáticas (RCS), por medio de un contador óptico de células, que emplea yoduro de propidio (DeLaval, 2005).

En cada una de las fincas, se implementó una encuesta, donde se tomó información general del predio y algunos aspectos sobre el proceso del ordeño y la conservación de la leche.

La información, se analizó a través de estadística descriptiva y regresión lineal simple. Todos los procedimientos estadísticos, se efectuaron mediante el software SAS. Para calcular las pérdidas económicas, se extrapolo lo reportado por Philpot & Nickerson (1992).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio de la densidad de la leche corregida a 15°C en las empresas ganaderas evaluadas fue de 1,032 g/mL (Tabla 1), valor que se encuentra dentro del rango (1,030-1,033 gr/ml), establecido como normal en Colombia (MinProtección, Decreto 616). Valores iguales de la densidad han sido reportados en la región del Magdalena medio y de 1,030 gr/mL para la Sabana de Bogotá (Calderón *et al.* 2006) y de 1,030g/mL, en Montería (Calderón *et al.* 2007). Bernal *et al.* (2007), en México, observaron que las mayores densidades se asociaron con altos porcentajes de proteína y de sólidos totales.

La acidez promedio en las empresas ganaderas fue de 0,17% de ácido láctico (Tabla 1). Este valor se encuentra dentro del rango (0,13-0,17% de a. láctico) considerado como normal en Colombia (MinProtección, Decreto 616). Calderón *et al.* (2006) reportaron un promedio inferior (0,12% de a. láctico) en la Sábana de Bogotá, debido, posiblemente, a las mejores condiciones de higiene durante el ordeño y a la conservación de la leche en refrigeración. Igualmente, Calderón *et al.* (2007) determinaron un promedio de 0,19% de a. láctico en leche en Montería, donde el incremento en la acidez se explicó por la falta de refrigeración de la leche, almacenamiento en materiales no apropiados y a la alta temperatura ambiental en la zona.

Sólo en el 26,6 % (n=4) de las empresas del actual estudio, la acidez determinada fue mayor a 0,17% de ácido láctico, lo que podría explicarse por el ordeño y almacenamiento de la leche en materiales no apropiados (plástico), deficiencias en la desinfección de los pezones, uso de materiales no apropiados (tela, plástico) en la filtración de la leche por ser difíciles de desinfectar y esterilizar.

El promedio de proteína fue de 3,28% (Tabla 1), con un valor mínimo del 3,09% y un máximo de 3,65%; el promedio del

Tabla 1. Promedio y desviación estándar (DE) de la leche en 15 empresas ganaderas doble propósito, en Montería (Colombia).

Parámetro	Promedio	DE
Densidad 15%/15°C g/mL	1,032	0,001
Acidez expresada como ácido láctico (%)	0,17	0,01
Proteína (%)	3,28	0,17
Grasa (%)	3,70	0,23
Lactosa (%)	4,90	0,23
Sólidos totales (%)	11,45	0,75
Mesófilos (Ufc/mL)	160.346	213.354
Células somáticas (CS/mL)	345.133	302.241

presente estudio fue superior al 3,12%, para el Valle del Sinú, reportado por Calderón *et al.* (2006) e, inferior al 3,6% de Calderón *et al.* (2007), en Montería. El promedio del porcentaje de grasa fue del 3,7%, valor superior al 3%, aceptado como mínimo para leches en Colombia (MinProtección, Decreto 616) y valores similares a los reportes del 3,44% y 3,66% por Calderón *et al.* (2006), en el Sinú y Calderón *et al.* (2007), en Montería. En todas las empresas ganaderas, el porcentaje de grasa fue superior al promedio aceptado en el decreto 616. Este hallazgo, se puede explicar, debido al prototipo racial usado en estas empresas ganaderas que es *Bos indicus* x *Bos taurus* (Bríñez & Castro, 2008).

La lactosa, principal osmoregulador de la leche, alcanzó un promedio de 4,90% (Tabla 1), porcentaje superior al 4,74 y 3,38%, reportado por Calderón *et al.* (2006), para la faja litoral. Este promedio, se encuentra dentro de los valores de la leche de los bovinos, que oscila entre 4,4 y 5,3. Se ha propuesto que el porcentaje de lactosa en los bovinos sea del 4,7% (Magarinos, 2000).

El promedio del porcentaje de sólidos totales fue de 11,45%. En el 60% (n=9) de las empresas ganaderas fue menor al promedio; esto se puede deber a la disminución en la síntesis de los diferentes componentes, como consecuencia de la mastitis bovina (Fox *et al.* 1985; Sandholm *et al.* 1995; Ma *et al.* 2000), ya que la prevalencia de esta varió desde el 13,8% hasta 74,7%, lo que amerita económicamente la implementación inmediata de programas de prevención y de control de la mastitis bovina.

Los mesófilos indicadores de la calidad microbiológica de la leche (Chacón, 2006) y el promedio de 160.346 Ufc/mL, se indican en la tabla 1; pero al comparar el recuento de estos, de acuerdo al tipo de conservación (Tabla 2), se encontró que cuando la leche fue conservada en tanque de refrigeración el promedio fue de  $74.514 \pm 125.222$ , con un valor mínimo de 8.000 y un máximo de 356.000 Ufc/mL y el promedio de cantina de  $235.450 \pm 252.559$ ; con un valor mínimo de 59.000 y un máximo de 804.000 Ufc/mL. El valor promedio menor de los mesófilos de leche en tanque respecto al de cantina, se puede deber a que el enfriamiento de la leche, a 4°C, tiene por objetivos inhibir el crecimiento bacteriano, ampliar el tiempo de almacenado en la finca para disminuir los costes de transporte de la leche (DeLaval, 2006); también por la implementación de protocolos de lavado, de desinfección y la ejecución de buenas prácticas en el ordeño, con el fin de ordeñar pezones limpios, secos y sanos (Philpot & Nickerson, 2000), exceptuando una finca, donde estas prácticas no estaban siendo implementadas en forma eficiente. Por su parte, Ramón *et al.* (2011), en el departamento de Antioquia, halló un recuento de mesófilos de 218000 Ufc/mL, valor que corresponde para una leche apta para el consumo humano, pero que se puede mejorar

aún más aspectos en la rutina del ordeño, para obtener una leche de mejor calidad. Posada *et al.* (2010) hallaron que el promedio en leche de tanque fue de 316.900 Ufc/mL y, concluyeron, que el principal punto de riesgo para el incremento de los mesófilos es el tiempo que transcurre desde el inicio del ordeño hasta el enfriamiento de la leche, razón por la cual, este tiempo se debe disminuir.

Signorini *et al.* (2008) concluyeron que el escaso incremento de mesófilos totales determinados en muestras de leche obtenidas de la ubre y del tanque de almacenamiento es una evidencia que el proceso de ordeño y el enfriamiento de la leche son eficientes para inhibir el crecimiento bacteriano.

Jayarao *et al.* (2004) afirmaron que un alto recuento de mesófilos totales está correlacionado con malas condiciones de higiene durante la rutina de ordeño, asociado a ubres sucias, pezones mal higienizados en el pre y post ordeño, mala limpieza y desinfección del equipo y de los utensilios de ordeño; sin embargo, Molineri *et al.* (2009) afirmaron que un recuento alto de mesófilos no es indicativo de una fuente de contaminación específica.

Recuentos menores a 10.000 Ufc/mL son excelentes; entre 10.000 y 25.000 Ufc/mL, se requiere mejorar la calidad microbiológica y mayores a 25.000, se deben iniciar de inmediato programas para optimizar la calidad microbiológica de la leche (Philpot & Nickerson, 2000). De acuerdo con lo propuesto anteriormente, en el 13,3% (n=2) de las empresas ganaderas, la calidad bacteriológica fue excelente; en el 6,7% (n=1) de estas empresas ganaderas, la calidad fue regular y deben mejorar la calidad microbiológica y en el 80% (n=12) de estas deben, inmediatamente, iniciar programas para optimizar la calidad microbiológica de la leche.

El promedio del RCS para las muestras de leche fue de 345.133 CS/mL, en el presente estudio (Tabla 1). Un RCS normal en leche de tanque debe ser menor o igual a 250.000 CS/mL (CNM, 1990; Blowey & Edmonson, 1999), lo que indicaría que hasta un 6% de los cuartos se encuentran infectados (CNM, 1990). RCS menor a 200.000 CS/mL son buenos, pero menor a 100.000 CS/mL son ideales o excelentes del estado de la sanidad de la glándula mamaria (Philpot & Nickerson, 2000).

En el 47% (n=7) de las empresas ganaderas, el RCS fue mayor a 250.000 CS/mL, lo que indica que en estas empresas se presentan casos de mastitis clínica y subclínica, los cuales, están pasando inadvertidamente por la falta de implementación de programas de prevención y de control de la mastitis. Philpot & Nickerson (2000) proponen que RCS entre 200.000-500.000 CS/mL, necesitan mejorar la prevención y el control, con el fin de reducir la prevalencia de mastitis y cuando el RCS es mayor a 500.000 CS/mL,

Tabla 2. Promedios y desviación estándar de características fisicoquímicas de la leche, obtención, conservación, recuento de mesófilos y de células somáticas en leches cruda de tanque, en algunas empresas ganaderas doble propósito, en Montería (Colombia).

Tipo de Ordeño	Forma de conservación	Densidad 15°C g/mL	Acidez % a. láctico	Proteína (%)	Grasa (%)	Lactosa (%)	S. totales (%)	Mesófilos (Ufc/mL)	C. somáticas (CS/mL)
Manual	Tanque	1,032	0,19	3,45	4,1	5,03	12,70	34.000	125.000
Mecánico	Tanque	1,031	0,16	3,09	3,9	4,77	12,06	356.000	162.000
Manual	Tanque	1,031	0,18	3,10	4,0	4,95	12,30	50.000	1.168.000
Manual	Tanque	1,032	0,16	3,18	3,5	5,06	10,90	21.000	158.000
Manual	Tanque	1,029	0,15	3,35	3,6	4,64	11,11	8.000	192.000
Manual	Tanque	1,035	0,19	3,28	3,3	4,68	10,24	44.600	123.000
Manual	Tanque	1,032	0,16	3,19	3,5	5,12	10,90	8.000	192.000
	Promedio	1,032±0,002	0,17±0,016	3,23±0,133	3,70±0,30	4,87±0,197	11,46±0,898	74.514±125.222	302.857±382.504
Manual	Cantinas	1,033	0,17	3,65	3,9	4,81	12,09	59.000	168.000
Manual	Cantinas	1,032	0,16	3,60	3,6	5,50	11,14	343.000	340.000
Manual	Cantinas	1,032	0,18	3,23	3,9	5,06	12,07	129.000	188.000
Manual	Cantinas	1,031	0,16	3,41	3,6	4,68	11,13	95.600	308.000
Manual	Cantinas	1,032	0,17	3,09	3,8	4,89	11,76	288.000	322.000
Manual	Cantinas	1,031	0,16	3,23	3,6	4,61	11,14	90.000	480.000
Manual	Cantinas	1,032	0,17	3,25	3,9	5,00	12,07	75.000	347.000
Manual	Cantinas	1,034	0,16	3,20	3,3	4,74	10,22	804.000	904.000
	Promedio	1,032±0,001	0,17±0,007	3,33±0,201	3,70±0,214	4,91±0,283	11,45±0,664	235.450±252.559	382.125±232.251

Tabla 3. Recuento de mesófilos, células somáticas con relación a la prevalencia de mastitis y de pérdidas económicas en empresas ganaderas del sistema doble propósito, en Montería (Colombia).

Tipo de ordeño	Células somáticas (CS/mL)	Prevalencia de mastitis %	Pérdidas en producción (% día)
Manual	347.000	23,25	7,57
Manual	1.168.000	74,78	12,78
Manual	158.000	15,16	5,29
Manual	192000	38,23	5,85
Manual	123.000	16,89	4,39
Manual	192000	26,21	5,85
Manual	168.000	18,86	5,45
Manual	340.000	28,24	7,53
Manual	188.000	21,69	5,78
Manual	308.000	38,12	7,07
Manual	322000	23,93	7,25
Manual	480.000	39,15	9,69
Mecánico	162.000	16,53	5,36
Manual	125.000	13,88	4,46
Manual	904.000	56,42	14,58

se requiere inmediatamente implementar programas de prevención y de control.

Reyes *et al.* (2010), al norte de Antioquía, en sistemas especializados, encontraron que en el 23% (101/434) de las muestras tenían valores por debajo de 400.000 CS/mL, parámetro aceptable por la industria lechera, pero evidenciado un problema grave de mastitis subclínica, disminuyendo la calidad de la leche y ocasionando pérdidas en el volumen producido.

Al determinar el porcentaje de pérdidas económicas (Tabla 3), se encontró que el 13,4% (n=2) de las empresas ganaderas perdieron menos del 6% de la producción diaria de leche. En el 40,6% (n=6) de estas, la producción disminuyó entre 5 y 6%, siendo estos porcentajes aceptables. Una reducción en la producción hasta del 10%, se presentó en el 33% (n=5) de estas y mermas por encima del 15%, se halló en 13,4% (n=2) de las empresas ganaderas. Estas mermas pueden ser consecuencia de diferentes procesos infecciosos que están disminuyendo el volumen y la síntesis de los diferentes constituyentes de la leche (Fox *et al.* 1985; Saran & Chaffer, 2000; Ma *et al.* 2000).

La regresión lineal entre la prevalencia de mastitis y el RCS en las empresas ganaderas evaluadas, del sistema doble propósito, fue significativa ( $p < 0,001$ ), con un  $R^2$  de 0,867

(Figura 1), lo que indica que el 86,7% de la variación, se debió al incremento del RCS, dado que el aumento en la respuesta celular es una consecuencia del número y de la gravedad del proceso infeccioso (Philpot & Nickerson, 2000; Saran & Chaffer, 2000; Green *et al.* 2006). Al realizar la regresión entre la prevalencia y el recuento de mesófilos no significativa ( $p > 0,05$ ), con un  $R^2$  de 0,277, indicando la no dependencia entre estas dos variables, dado que el aumento de mesófilos es como consecuencia de una mala higiene del ordeño y falta de enfriamiento de la leche y no como consecuencia de casos de mastitis subclínicas o clínicas (Philpot & Nickerson, 2000; Posada *et al.* 2010).

De acuerdo a los resultados de este estudio, todas las empresas ganaderas evaluadas en este estudio presentaron una buena calidad físico-química y para el pago por calidad microbiológica, sólo en tres empresas el recuento de UFC en tanque estuvo por encima del límite de castigo ( $> 300.000$  Ufc/mL), de acuerdo a lo estipulado en la Resolución 000017 del 2012, por la cual, se reglamenta a nivel nacional el pago de leche cruda al productor.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen a los empresarios y a los administradores de las empresas ganaderas, sin cuya colaboración no sería posible haber adelantado este estudio. **Conflicto de interés:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes

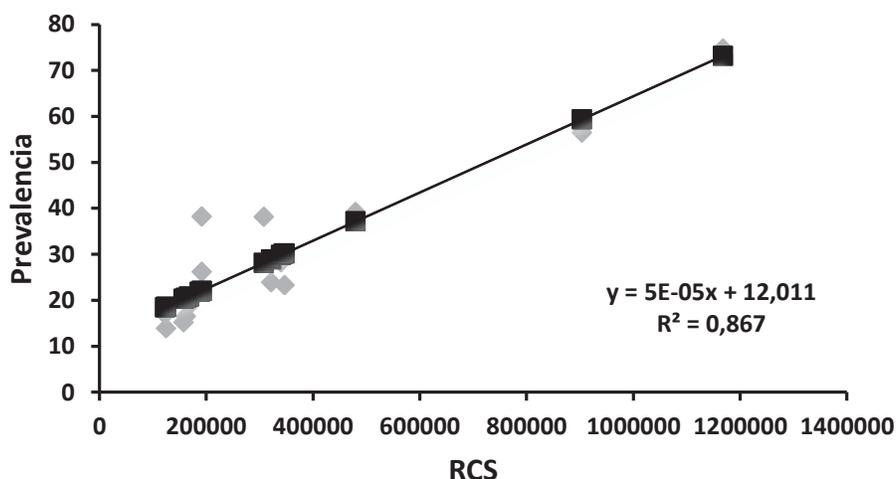


Figura 1. Regresión entre la prevalencia de mastitis y el RCS en 15 empresas ganaderas del sistema doble propósito, en Montería, Colombia.

declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. Financiación: Este estudio fue financiado por la oficina de investigaciones de la Universidad de Córdoba.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BARÓ, L.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ, FA.; BOUZA, J. 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmac.* 42:135-145.
2. BERNAL M., L.R.; ROJAS G., M. de los A.; VÁZQUEZ F., C.; ESPINOZA O., A.; ESTRADA F., J.; CASTELÁN O., O.A. 2007. Determinación de la calidad fisicoquímica de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del Estado de México. *Vet. México.* 38(4):395-407.
3. BLOWEY, R.; EDMONSON, P. 1999. El control de la mastitis bovina en granjas de ganado de leche. Guía práctica e ilustrada. Ed. Acribia S.A, Zaragoza (España). p.163-180.
4. BRÍÑEZ, W.J; CASTRO, G. 2008. Efectos del mestizaje, etapa de lactancias, número de partos t época del año en la composición de la leche en vacas doble propósito. En. *Desarrollo sostenible de la ganadería de doble propósito.* Disponible desde Internet en: [http://www.avpa.ula.ve/libro\\_desarrollosost/pdf/capitulo\\_77.pdf](http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_77.pdf). (con acceso 17/04/2012).
5. CALDERÓN, A.; GARCÍA, F.; MARTÍNEZ, G. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev. MVZ Córdoba.* 11:725-737.
6. CALDERÓN R., A.; RODRÍGUEZ, R., V; VÉLEZ R., S. 2007. Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el municipio de Montería. *Rev. MVZ Córdoba.* 12:912-920.
7. CHACÓN V., A. 2006. Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agron. Mesoam.* 17(1):55-61.
8. CONSEJO NACIONAL DE MASTITIS CNM. 1990. *Conceptos actuales de mastitis bovina.* 3ª ed. Madison (USA). 47p.
9. DE LAVAL. 2005. *Manual de instrucciones.* DeLaval International Tumba (Sweden). p.1(32)-25(32).
10. DE LAVAL. 2006. *Lechería. Por qué enfriar leche:* Disponible desde Internet en: [http://www.delaval.com.co/Dairy\\_Knowledge/EfficientCooling/Why\\_Cool\\_Milk.ht](http://www.delaval.com.co/Dairy_Knowledge/EfficientCooling/Why_Cool_Milk.ht). (con acceso el 11/02/2012).
11. DOCUMENTO CONPES 3376. 2005. Política sanitaria y de inocuidad para las cadenas de la carne bovina y de la leche. Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación.

12. DOCUMENTO CONPES 3675. 2010. Política nacional para mejorar la competitividad del sector lácteo colombiano. Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación.
13. ENCUESTA NACIONAL AGROPECUARIA. 2009. Sistema de información de la oferta agropecuaria, forestal, pesquera y acuícola encuesta nacional agropecuaria.
14. FERNANDES, A.M.; OLIVEIRA, C.A.F. 2006. Actividade enzimática relacionada às células somáticas no leite. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora. 61:350-355.
15. FOX, L.K.; SHOOK, G.E.; SCHULTZ, L.H. 1985. Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. J. Dairy Sci.. 68:2100-2107.
16. GERBER, N. 1994. Tratado práctico de los análisis de la leche y del control de los productos lácteos. Ed. Gráficas Roa. Santander (España). p.23-138.
17. GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; NEWTON, H.; BROWNE, W.J. 2006. Seasonal variation of bulk milk somatic cell counts in UK dairy herds: investigations of the summer rise. Prev. Vet. Med. 74(4):293-308.
18. INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. 2005. Encuesta nacional de la situación nutricional en Colombia.446p.
19. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS ICONTEC. 1993. Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. Ed. Icontec. Santafé de Bogotá (Colombia). p.13-16.
20. INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS (INVIMA). 1998. Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Santafé de Bogotá (Colombia). p.17-20.
21. JARAMILLO, M.; MEJÍA, L.; SEPÚLVEDA, J. 1999. La leche y su control. Ed. Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia). 48p.
22. JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V. 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. J. Dairy Sci. 87(10):3561-3573.
23. MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, DM.; GALTON, DM.; RUIDAN, MA.; BOOR, KJ. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J. Dairy Sci. 83:264-274.
24. MAGARINOS, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa. Ed. Producción y Servicios Incorporados S.A. Mixco (Guatemala). p.5-10.
25. MARTÍN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. 1987. Epidemiología veterinaria, Principios y métodos. Ed. Acribia, Zaragoza (España). p.321-370.
26. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Resolución 00017. Por la cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al proveedor. 18p. Disponible desde Internet en: <http://www.redlactea.org/anexos/Milk%202012/Resolucion%2000017%20de%202012.pdf>. (con acceso 20/05/2012).
27. MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL DE COLOMBIA. Decreto No. 616. 2006. Reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país. 32p. Disponible desde Internet en: <http://www.redlactea.org/decretos.htm>. (con acceso 09/02/2012).
28. MOLINERI, A.I.; SIGNORINI, M.L.; CUATRIN, A.L.; CANAVESIO, V.R.; NEDER, V.E.; RUSSI, N.B.; BONAZZA, J.C; CALVINHO, L.F. 2009. Calidad bacteriológica y relación entre grupos bacterianos en leche de tanque de frío. Rev. FAVE - Ciencias Vet. 8(2):75-86.
29. NASANOVSKY, M.; GARIJO, R.; KIMMICH, R. 2001. Lechería. Disponible desde Internet en: <http://www.hipotesis.com.ar/hipotesis/Agosto2001/Catedras/Lecheria.htm> (con acceso 09/02/2012).
30. PHILPOT, N.; NICKERSON, S. 2000. Ganando la lucha contra las mastitis. Westfalia-Surge Inc y Westfalia Landtechnik GmbH. Naperville (USA) Oelde (Germany) p.136-141.
31. PHILPOT, N.; NICKERSON, S. 1992. Ganando la lucha contra las mastitis Naperville (USA). 12p.
32. POSADA A., S.; LOAIZA, E.T.; RESTREPO, J.E; OLIVERA, M. 2010. Caracterización del ordeño manual e identificación de puntos críticos de control

- para la calidad higiénica de la leche en una finca del norte de Antioquia. *Rev. Lasallista Invest.* 7(2):35-46.
33. RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, C.D.; HINCNCLIFF, K.W. 2002. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana S.A. 9a Edición. Madrid (España). p.711-779.
34. RAMÓN E., J.N.; RESTREPO B., J.E.; RUIZ-CORTÉS, Z.T.; OLIVERA Á., M. 2011. Detección de riesgos de contaminación con microbios ambientales en un sistema de ordeño mecánico de un hato lechero del norte de Antioquia. *Rev. Lasallista Invest.* 8(1):7-15.
35. REYES, J.; VILLAR, D.; OLIVERA, M. 2010. Evaluación de residuos de antimicrobianos por la prueba Delvotest en una cuenca lechera de Antioquia con alto índice de mastitis subclínica. *REDVET. Rev. Electr. Vet.* 1695-7504. 11(12):1-10.
36. SANDHOLM, M.; HONKANEN, B.T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. 1995. The bovine udder and mastitis. Edit. Gummeruss Oy, Helsinki (Finland). p.76-82.
37. SARAN, A.; CHAFFER, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina). p.73-86.
38. SIGNORINI, L.M.; SEQUEIRA, G.J.; BONAZZA, J.C.; DALLA, R.D.; MARTÍ, L.E.; FRIZZO, L.S.; ROSMINI, M.R. 2008. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 18(2):207-217.
39. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS, SAS. 2001. User's Guide (Version 9.1), Cary (USA). Institute. SAS/STAT.

Recibido: Febrero 16 de 2012

Aceptado: Agosto 17 de 2012

# EFECTO DEL CHOQUE TÉRMICO SOBRE LA EFICIENCIA EN LA TRIPLOIDIZACIÓN Y LA SOBREVIVENCIA DE LARVAS DE *Rhamdia quelen*

## EFFECT OF THERMALSHOCK ON TRIPLOIDIZATION EFFICIENCY AND SURVIVAL OF LARVAE OF *Rhamdia quelen*

Liliana Cardona<sup>1</sup>, Martha Olivera<sup>2</sup>, Mónica Botero<sup>3</sup>, Ariel Tarazona<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Zoot. M.Sc. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Dpto. Producción Animal, grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia. Calle 56A # 63-20 Bloque 50 Of 316, Medellín, Antioquia, lncardona@unal.edu.co;

<sup>2</sup> DMV, Dra. Sci. Agr. Grupo de Investigación BIOGENESIS/Universidad de Antioquia–Universidad Nacional de Colombia. Carrera 75 # 65-87 Bloque 46-202, Medellín Antioquia, syngamia@gmail.com; <sup>3</sup> Zoot. Ph.D. GRICA/Universidad de Antioquia, Colombia. Carrera 75 # 65-87, Medellín, Antioquia, vicedecanaturafca@gmail.com; <sup>4</sup> Zoot. M.Sc, c.PhD. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Dpto. Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia. Calle 56A # 63-20 Bloque 50 Of 316, Medellín, Antioquia. amtarazonam@unal.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 409 - 417, 2012

### RESUMEN

La triploidía permite mejoras en el cultivo de peces, ya que se evita la madurez sexual, controla la superpoblación y aumenta la estabilidad en el desarrollo. Debido a su esterilidad, se pueden retrasar las cosechas, logrando peces de mayor peso y edad. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del choque térmico sobre la eficiencia en la triploidización y la sobrevivencia de larvas de *Rhamdia quelen*. Se emplearon dos hembras y tres machos sexualmente maduros, inducidos con extracto de hipófisis de carpa. Las ovas fueron inseminadas y siete minutos posfertilización, sometidas a choque térmico, con tres temperaturas: 34, 36 y 38°C y dos tiempos: 2 y 5 minutos. Posteriormente, fueron incubadas hasta el momento de la eclosión. Se registraron: temperatura, oxígeno y porcentajes de eclosión y de sobrevivencia. Se evaluó la ploidía de las larvas, mediante tinción con nitrato de plata de las regiones organizadoras de nucléolo (RON). El porcentaje de eclosión fue igual en el control y en los TTOs de 2 minutos; todos los TTOs de 5 minutos presentaron menor porcentaje de eclosión ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de sobrevivencia fue mayor al 91% en todos los tratamientos, sin diferencia estadística entre ellos. Los porcentajes de triploidía para los tratamientos con choque térmico, sin incluir el control, oscilaron entre 78,8 y 96,6%, sin observarse diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ). Se concluye, que el choque térmico meiótico, con las tres temperaturas y con una duración de 2 y 5 minutos, induce la triploidía en *Rhamdia quelen*.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, meiosis, región organizadora de nucléolo, triploide.

### SUMMARY

Triploidy enables improvements in fish farming since it avoids sexual maturity, controls overpopulation and increases the developmental stability. Because of its sterility, the fish harvest may be delayed, attaining fishes with greater weight and age. The aim of this study was to evaluate the effect of thermal shock on the efficiency of triploidization and the survival of *Rhamdia quelen* larvae. Two females and three males sexually mature were used, induced with carp pituitary extract. The eggs were inseminated and seven minutes post-fertilization, submitted to thermal shock with three temperatures: 34, 36 and 38°C during two and five minutes, respectively; then incubated until hatching. Temperature, oxygen, hatching rates and survival were recorded. Larval ploidy was evaluated by staining organizing nucleolus regions (NOR) with silver nitrate. The hatching rate was similar in the control and the treatments, being of two minutes, while hatching percentage was lower ( $p < 0.05$ ) in the five minutes treatments. The survival rate was higher than 91% in all treatments, without statistical difference between them. The percentages of triploidy by heat shock treatments, not including the control, ranged between 78.8 and 96.6%, without significant difference between them ( $p > 0.05$ ). It was concluded that meiotic thermal shock with the three temperatures and duration within 2 to 5 minutes can induce triploid in *Rhamdia quelen*.

Key words: Embryo development, meiosis, nucleolus organizer region, triploid.

## INTRODUCCIÓN

Algunas características de los peces, como la fecundación externa, la alta fecundidad, el control de la diferenciación sexual y un intervalo generacional relativamente corto (Tabata, 2008), los convierten en ejemplares deseables para la manipulación sexual y cromosómica (Thorgaard, 1983). La biotecnología ha hecho muchos aportes en diferentes ciencias y disciplinas, entre ellas, la acuicultura (Pineda *et al.* 2004); un avance importante ha sido la obtención de individuos poliploides, con una variación cuantitativa del conjunto de cromosomas (Díaz & Neira, 2005), la cual, ha permitido mejoras en la producción de especies de cultivo, ya que se evita la madurez sexual (Piferrer *et al.* 2009; Díaz & Neira, 2005), se controla la superpoblación y aumenta la estabilidad en el desarrollo (Piferrer *et al.* 2009); dada la condición de esterilidad, se pueden retrasar las cosechas, logrando peces de mayor peso y edad (Díaz & Neira, 2005). Adicionalmente, pueden servir para programas de repoblamiento sin que exista competencia reproductiva con las especies nativas (Piferrer *et al.* 2009). Algunos de los cambios y consecuencias de la tecnología fueron citados por Benfey (1999), dentro de los que se destacan una disminución en la relación área/volumen de células de tejidos y de órganos, puesto que estas poseen un mayor contenido de material genético, que conlleva a que se afecten fenómenos de comunicación celular y transporte, a través de membranas. Aunque la biotecnología para la obtención de individuos triploides se ha implementado desde 1943 en diversas familias de peces (Hulata, 2001), aún es poco conocido cómo se origina y se mantiene esta condición de triploidía (Benfey, 1999) y surgen en ellos una serie de cambios que no han permitido mejorar el uso de estas biotecnologías y entender el comportamiento y las respuestas fisiológicas de los organismos al medio. Se cree que pueden existir otras alteraciones que involucran la forma de la célula, la fluidez de la membrana celular y la síntesis de ácidos nucleicos, cuando se utilizan choques de temperatura, para inhibir la expulsión del segundo cuerpo polar (Hildebrandt, 2002). Estos choques han sido uno de los métodos más empleados para la obtención de triploides a gran escala (Piferrer *et al.* 2009; Díaz & Neira, 2005; Thorgaard, 1983; Pineda *et al.* 2004).

*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) es un pez perteneciente al orden Siluriforme, que ha demostrado buena resistencia a la manipulación (Rodríguez, 2007) y es de fácil adaptación y reproducción, bajo condiciones de laboratorio, por lo que se ha convertido en un modelo para realizar investigaciones en diferentes áreas, dentro de las cuales, la biotecnología aplicada es un campo de impacto productivo en Colombia y adaptable a las especies de

producción más utilizadas (Pineda *et al.* 2004) o en aquellas que se consideran promisorias para el desarrollo piscícola del país. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del choque térmico sobre la eficiencia en la triploidización y la sobrevivencia de larvas de *Rh. quelen*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:** Se emplearon dos hembras de 0,1219 y de 0,1776kg y tres machos de 0,0977; 0,081 y 0,1099kg, sexualmente maduros, seleccionados según las características descritas por Varela *et al.* (1982). Los animales fueron obtenidos de ejemplares en cautiverio, mantenidos en la Estación Piscícola San José del Nus, ubicada en el municipio de San Roque (Antioquia); la temperatura promedio del agua fue de 24°C. Los animales fueron transportados hasta el laboratorio, donde permanecieron en acuarios durante un periodo de adaptación de 20 días.

**Obtención de gametos:** Para la inducción de la reproducción, se utilizó extracto de hipófisis de carpa (EHC, Stoller Fisheries, USA), usando el protocolo propuesto por Woyanovich & Horvath (1983), con las modificaciones descritas a continuación. Para las hembras, se aplicaron dos dosis de 0,5 y 5,0mg/kg de peso vivo, con intervalo de doce horas, entre la primera y la segunda dosis. Los machos fueron inducidos con una dosis única de 3,5mg/kg, la cual, se aplicó simultáneamente con la segunda dosis de la hembra. Los animales fueron previamente anestesiados con Quinaldine® 200µL/3L de agua y se emplearon los protocolos de manipulación de menor estrés para los animales. Los gametos, se obtuvieron por extrusión manual en dirección cráneo-caudal y se mezclaron para formar un grupo de oocitos y un grupo de semen; de este último, se tomó una muestra de 0,5mL, para evaluar parámetros espermáticos y asegurar la calidad del mismo; dentro de éstos, se tuvo en cuenta movilidad (Araújo *et al.* 2003), tiempo de activación y concentración espermática (Cruz-Casallas *et al.* 2005).

**Choque térmico meiótico:** Las ovas fueron inseminadas para permitir la fertilización; posteriormente, se hidrataron con agua de clorada a 25°C; se depositó una muestra de 2mL para cada tratamiento en incubadoras; 7 minutos posfertilización y se sometieron a choque térmico. Los tratamientos de choque térmico evaluados fueron a tres temperaturas: 34, 36 y 38°C, cada una con dos tiempos: 2 y 5 minutos (34-2, 34-5, 36-2, 36-5, 38-2, 38-5); para lo cual, todas las incubadoras fueron sumergidas, simultáneamente, en baños termostáticos, durante tiempos y temperaturas respectivas mencionadas. El grupo control consistió en ovas inseminadas, a una temperatura de 25°C y no se les hizo choque térmico. Cada tratamiento, incluyendo el control, tuvo cuatro réplicas, excepto los de 38°C, que se hicieron por duplicado, debido al número de ovocitos disponibles. Una vez finaliza-

do el choque térmico, las ovas de cada réplica fueron distribuidas de manera aleatoria en incubadoras de acrílico tipo californiana, con agua a 25°C y se mantuvieron allí hasta el momento de la eclosión. Durante este tiempo, se registraron los siguientes parámetros de calidad de agua: temperatura y oxígeno, evaluados mediante un oxímetro Orion 3 Star DO y pH con un pHmetro marca WTW.

**Evaluación del porcentaje de eclosión y sobrevivencia:** Para determinar los porcentajes de eclosión (a) y de sobrevivencia (b), se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Eclosión} = \left( \frac{\sum \text{larvas vivas y muertas}}{\sum \text{larvas vivas, muertas y huevos}} \right) * 100$$

$$\% \text{ sobrevivencia de larvas con vitelo} = \left( \frac{\sum \text{larvas vivas}}{\sum \text{larvas totales}} \right) * 100$$

Las larvas vivas fueron separadas por réplicas en frascos de vidrio, con 2L de agua, previamente clorada y mantenidas a 25°C.

**Evaluación del porcentaje de triploidía:** Nueve días después de la eclosión, se tomó al azar una muestra de poslarvas de cada réplica, de acuerdo al número de sobrevivientes a la fecha y se anestesiaron con Quinaldine®, en una proporción de 50µL/0,25 litros de agua. Se obtuvieron suspensiones celulares individuales de cada larva, empleando el protocolo reportado por Vozzi *et al.* (2003), utilizando citrato de sodio al 0,7%, como solución hipotónica, en vez de cloruro de potasio. Posteriormente, se trataron con solución de metanol: ácido acético 3:1 y se adicionó ácido acético al 50%, durante 3 minutos. Se realizó goteo en placas portaobjetos, incluyendo los restos de los animales, los cuales, se maceraron. Las placas se secaron sobre una plancha térmica a 60°C.

Para facilitar la observación de núcleos interfásicos, cada placa fue coloreada durante 10 minutos, con tinción de Giemsa al 5%, preparada en fresco y llevadas a la plancha térmica. Se realizó tinción con nitrato de plata de las regiones organizadoras de nucléolo (RON), según el protocolo descrito por Alonso *et al.* (2000). La observación de los núcleos interfásicos con la expresión de las regiones organizadoras de nucléolo, se hizo en un microscopio óptico marca Leica (40X - 100X). Se contabilizó un número mínimo de 50 núcleos por placa y se determinó, en cada núcleo observado, el número de regiones organizadoras de nucléolo expresadas. Un individuo se consideró triploide, si presentaba al menos un núcleo con 3 RONes.

**Análisis estadístico:** Se usó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado efecto fijo balanceado en arreglo factorial 3 x 2, con una adición correspondiente

al control; se realizó análisis suplementado con ANOVAS de tipo unidimensional y pruebas de contraste de Tukey, con un error tipo I del 5%. Las variables, el porcentaje de eclosión y de sobrevivencia, se transformaron con base en la función arco seno. Se aplicó análisis descriptivo exploratorio de tipo unidimensional, con el objetivo de hallar promedio, desviación típica y coeficiente de variación, para cada una de las variables de interés; para los análisis, se empleó el programa SAS versión 8.2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio de temperatura registrado en el experimento fue de 25±0,9°C; el valor mínimo de oxígeno disuelto en las diferentes réplicas fue de 4,8 mg/L y el mayor de 6,1mg/L; los valores de pH oscilaron entre 7,13 ± 0,20 y 7,22 ± 0,10. Respecto a los parámetros físico-químicos del agua y su posible influencia en los resultados obtenidos para las variables reproductivas evaluadas en los diferentes tratamientos durante el tiempo de incubación y eclosión, estuvieron dentro de los rangos permisibles y recomendados para especies de aguas cálidas (Roldán, 1992), lo que es apoyado por los valores encontrados, dado que no hubo diferencia significativa entre tratamientos.

**Eclosión:** El mayor porcentaje de eclosión se obtuvo en el tratamiento control a una temperatura de 25°C con un valor de 43,5 ± 3,3% sin choque térmico. El valor mínimo correspondiente a 15,8 ± 10,4% fue obtenido en el tratamiento 36-5. En general, se observa que los menores porcentajes de eclosión se presentan cuando el tiempo de duración del choque térmico es mayor (5 minutos). En la figura 1A, se presentan los resultados obtenidos para el porcentaje de eclosión de ovas, sometidas a choque térmico meiótico.

El porcentaje de eclosión presentó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el control y los tratamientos 34-5, 38-5 y 36-5; los resultados de los tratamientos con tiempos de choque térmico de 2 minutos, no presentaron diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 1A). La tabla 1 muestra los promedios, las desviaciones típicas, los coeficientes de variación y la diferencia estadística de los porcentajes de eclosión, luego de someter las ovas a los diferentes tratamientos.

En cuanto a los tratamientos, se podría decir que el tiempo del choque térmico tiene un efecto deletéreo para este parámetro. Se observa una marcada tendencia de obtener menores porcentajes de eclosión con los tratamientos de choque de 5 minutos, al oscilar entre 15,8 a 17,8% (Tabla 1), siendo éstos los más bajos.

Las células en los distintos organismos tienen diferentes respuestas cuando existe incremento en el estrés, causado por una elevación de la temperatura, que depende de la duración

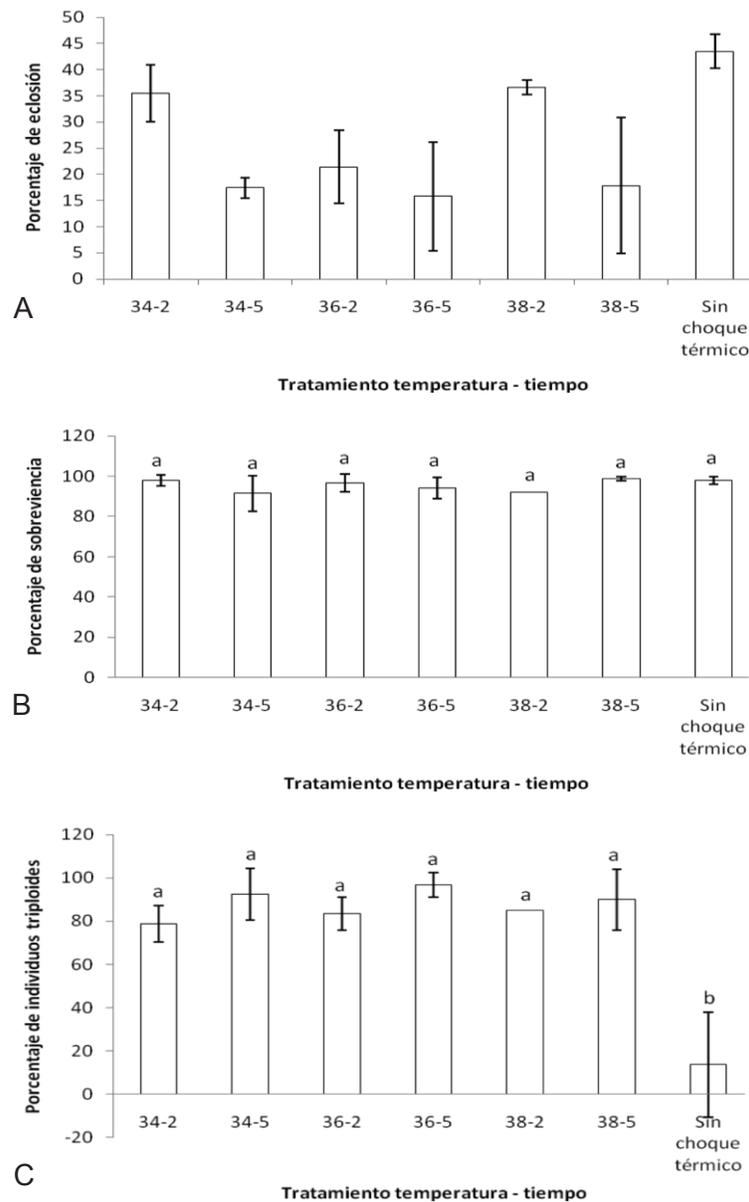


Figura 1. A) Porcentaje de eclosión de ovas de *Rhamdia quelen* sometidas a choque térmico; B) Porcentaje de sobrevivencia por tratamientos (promedio ± d.e). Letras diferentes significan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) y C) Porcentaje de triploidía por tratamientos (promedio ± d.e). Letras diferentes significan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

que esta permanezca alta (Arvelo, 2002). Cuando es leve, como en el caso del choque con duración de dos minutos, se podría aseverar, aunque no fue demostrado en este trabajo, que se presenta una superproducción de proteínas de choque térmico (Hsp), que permiten que se desarrolle la termo tolerancia, previniendo la apoptosis al desencadenar mecanismos protectores contra la oxidación, como los reportados por Fleury *et al.* (2002). Si se presenta una situación de estrés más intenso, como ocurrió con el choque de cinco minutos, se puede generar necrosis celular (Arvelo, 2002),

fenómeno que se ve reflejado en las bajas tasas de eclosión, en ovas sometidas a este tratamiento.

**Sobrevivencia:** El porcentaje de sobrevivencia fue alto, superando el 91% en todos los tratamientos, siendo muy homogéneos los resultados, de acuerdo a lo observado en la desviación estándar (Figura 1B).

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos 34-2, 34-5, 36-2, 36-5, 38-2, 38-5 ( $p > 0.05$ ). Los

Tabla 1. Porcentaje de eclosión, triploidía y descripción del número de núcleos interfásicos con 1 RON, 2 RON y 3 RON observados por tratamiento, expresado como promedio  $\pm$  d.e.

TTO	n	% de eclosión	C.V	1 RON	2 RON	3 RON	% Triploidía
34-2	80	35,5 $\pm$ 5,4 <sup>ab</sup>	15,2	26,5 $\pm$ 6,0 <sup>ab</sup>	26,3 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>	78,75 $\pm$ 8,53 <sup>a</sup>
34-5	78	17,4 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	11,6	25,5 $\pm$ 5,7 <sup>abc</sup>	26,9 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>	2,2 $\pm$ 1,6 <sup>bc</sup>	92,5 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>
36-2	73	2,4 $\pm$ 7,0 <sup>ab</sup>	32,7	24,7 $\pm$ 5,5 <sup>bc</sup>	28,4 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	2,2 $\pm$ 1,4 <sup>bc</sup>	83,3 $\pm$ 7,6 <sup>a</sup>
36-5	37	15,8 $\pm$ 10,4 <sup>b</sup>	65,9	26,1 $\pm$ 5,7 <sup>abc</sup>	25,4 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	96,6 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>
38-2	39	36,6 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	3,8	22,6 $\pm$ 5,6 <sup>c</sup>	27,9 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	85 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
38-5	21	17,8 $\pm$ 13,0 <sup>b</sup>	73,2	26,6 $\pm$ 5,1 <sup>ab</sup>	28,7 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>	90 $\pm$ 14,1 <sup>a</sup>
Sin choque	64	43,5 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	7,7	29,2 $\pm$ 8,4 <sup>a</sup>	26,1 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>	13,7 $\pm$ 24,2 <sup>b</sup>

Letras diferentes significan diferencia estadística ( $p < 0,05$ ). Desviación estándar: d.e.; coeficiente de variación: cv.

valores expresados en promedio  $\pm$  desviación estándar y el coeficiente de variación para los tratamientos y sin choque térmico, fueron 97,9  $\pm$  2,6 (c.v=2,6), 91,5  $\pm$  8,8 (c.v=9,6), 96,6  $\pm$  4,3 (c.v=4,4), 94,1  $\pm$  5,1 (c.v=5,5), 92,0  $\pm$  0,0 (c.v=0,0), 98,8  $\pm$  1,0 (c.v=1,1), 97,9  $\pm$  1,7 (c.v=1,7), respectivamente.

Vozzi *et al.* (2003) encontraron, en el momento de la eclosión, el mayor porcentaje de sobrevivencia, correspondiente a 33,40%, cuando se sometieron ovas de *Rh. quelen* a choque térmico, a 36°C, durante 5 minutos, 5 minutos posfertilización; valor inferior a los reportados en el presente estudio. La misma especie, sometida a choques térmicos fríos, para obtención de triploides, exhibió 65,4 $\pm$ 3,1% de sobrevivencia (Soller *et al.* 2007).

Después de la eclosión, no se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia de larvas entre los tratamientos. Lo anterior conduce a suponer que no existe efecto del choque térmico en las larvas, luego de la eclosión y durante la reabsorción de saco vitelino. Es posible que ello sea mediado por una familia de proteínas de choque térmico (Hsp); moléculas encargadas de la respuesta celular al estrés, que se sintetizan en forma constitutiva e inducible, una vez sobreviene aquel y actúan como chaperonas moleculares asociadas con ensamble y plegamiento de otras proteínas (Hartl, 1996). Se ha reportado que algunas de las proteínas de este tipo persisten en las células, cuando desaparece el factor causante del estrés (Dubeau *et al.* 1998).

Chippari *et al.* (1999) reportaron que el rango de confort para *Rh. quelen*, en el periodo de larvicultura, es de 21-30°C, valores de temperatura que abarcan la mantenida durante el experimento, por lo tanto, las condiciones de temperatura

en las que se desarrollaron las larvas no habrían sido las causantes de su muerte.

**Ploidía:** Para determinar la distribución de las regiones organizadoras de nucléolo en núcleos interfásicos de suspensiones celulares, se realizó un Anova, encontrándose diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el análisis de la variable número de núcleos interfásicos, con 1 RON; entre el control respecto al tratamiento 36-2 y al 38-2; el tratamiento 38-5 respecto al 38-2 y tratamiento 34-2 respecto al 38-2. El mayor número de núcleos con 1 RON, se presentó en el control, mientras que el menor se observó en el 38-2. La menor desviación estándar encontrada para la expresión de una Región Organizadora de Nucléolo, se evidenció en el tratamiento 38-5 (Tabla 1).

Para la variable número de núcleos con 2 RON, no hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). De manera general, se observa que el número de núcleos con 2 RON fue mayor al encontrado con 1 RON (Tabla 1). Dado que las Regiones Organizadoras de Nucléolo son requeridas por las células somáticas para la construcción de los ribosomas, posiblemente, como respuesta de la célula a los choques de temperatura, se aumentaría la capacidad de síntesis de proteínas, principalmente, las de choque térmico, que se ve reflejado en el número de estas estructuras presentes en el núcleo, como mecanismo para evitar la muerte celular.

En los núcleos interfásicos de individuos considerados triploides de los diferentes tratamientos, los cuales, exhibieron 3 RON, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Hubo diferencia entre el tratamiento 36-5 y los demás; en el tratamiento 38-2 con respecto al 38-5, al control y al 34-2; en el tratamiento 34-5, 36-2, 34-2 y 34-5 respecto al control.

La frecuencia de presentación de 3 RON fue inferior que la de 1 y 2 RON (Tabla 1).

Las frecuencias mostradas anteriormente corresponden a individuos diploides y triploides, siendo estos últimos los que exhibieron hasta 3 RON, por lo tanto, en todos los tratamientos, se presentó poliploidía.

En cuanto a la distribución de las regiones organizadoras de nucléolo en núcleos interfásicos de suspensiones celulares, donde se encontraron diferencias a las temperaturas y tiempos de choque térmico respecto a 1 RON o dos RONs, se podría deber a que las variaciones de RONs se pueden incrementar por recombinación homóloga desigual dentro del ribosoma del gen, tal como lo sugieren Schmickel *et al.* (1985) y que es altamente dependiente de la actividad celular y que dependen de los depósitos en los centros fibrilares o en la segregación de los nucléolos durante la interfase en las RONs durante la mitosis (Hernández *et al.* 1980).

La figura 2 muestra la expresión de RONs en núcleos interfásicos de poslarvas diploides y triploides de *Rh. quelen*.

Los porcentajes de triploidía para los tratamientos con choque térmico, sin incluir el control, oscilaron entre 78,8 y 96,6%, sin observarse diferencia significativa entre ellos ( $p > 0,05$ ), siendo menor para el tratamiento 34-2 y el mayor para 36-5. Con respecto al tratamiento sin choque térmico, se hallaron valores de 13,7% de triploides, observándose diferencia estadística ( $p < 0,05$ ), con respecto a los demás tratamientos (Tabla 1); adicionalmente, se observa una amplia desviación estándar (Figura 1C).

La eficiencia en la triploidización encontrada en el presente estudio, no es un parámetro definitivo a la hora de escoger una temperatura y un tiempo de choque térmico para obtener individuos triploides en esta especie, ya que se deben tener en cuenta otros factores, como las tasas de eclosión y la sobrevivencia, que son afectados por los procedimientos realizados. Lincoln & Bye (1984) reportaron para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que, en la medida en que se aumenta la temperatura para choque térmico, se aumenta el número de triploides, hasta cierto punto, pero se afecta negativamente el porcentaje de sobrevivencia en la fase de ojos visibles y, aún más, el de vesícula reabsorbida.

Soller *et al.* (2007) realizaron inducción de triploidía en *Rh. quelen* con choque térmico frío; el mayor porcentaje de triploides obtenido fue 97,9% con tratamiento a una temperatura de 4°C, durante 20 minutos; valor muy cercano al obtenido al hacerlo a 36°C, 5 minutos (96,6%), en este trabajo. Con la realización de choque térmico cálido a 36°C, durante cinco minutos, 5 minutos posteriores a la fertilización, Vozi *et al.* (2003), para la misma especie, obtuvieron 74,8% de triploides; un dato inferior al encontrado en este trabajo, variando únicamente el momento del choque. Aunque en el trabajo de Vozi no evaluaron exactamente 7 minutos, como tiempo posfertilización para hacer el choque, es posible que entre este tiempo y 5 minutos no existan diferencias y lo que realmente determinó un inferior porcentaje de triploidía fue el procedimiento o las herramientas utilizadas, para que la distribución del calor fuera uniforme en las unidades experimentales y se manifestara el verdadero efecto de la temperatura y el tiempo. Se puede hipotetizar que las diferencias existentes pueden ser originadas por los contrastes presentes, entre la *Rh. quelen* procedente de las lagunas marginales, en

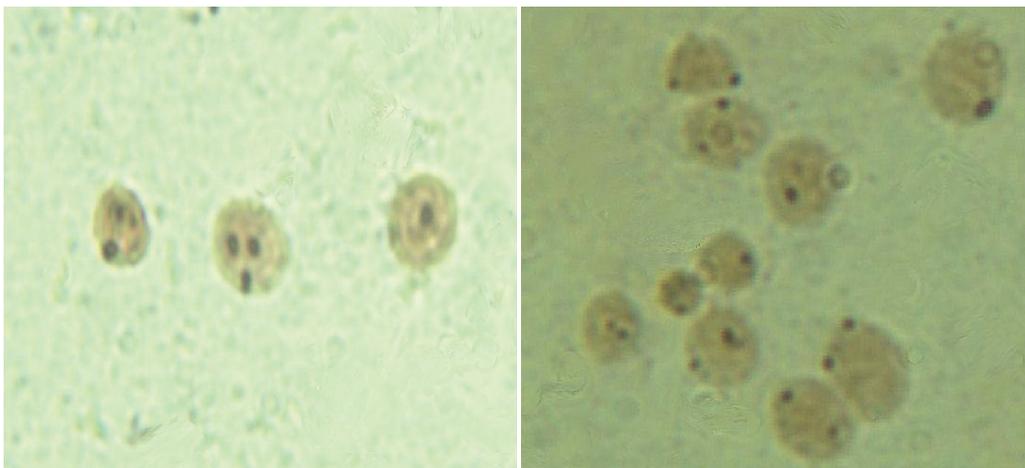


Figura 2. Expresión de RONs en núcleos interfásicos de poslarvas diploides y triploides de *Rhamdia quelen* teñidos con nitrato de plata. A la izquierda, se observa núcleo con 3 regiones organizadoras de nucléolo, indicando triploidía (40X). A la derecha, núcleos con 1 y 2 regiones organizadoras, pertenecientes a un individuo diploide (40X).

la provincia de Corrientes, en Argentina y la procedente de la cuenca la Vega, en el municipio de San Roque, en Colombia y las condiciones ambientales en las que se encuentran y, es por ello, que se hace necesario la estandarización de los procedimientos, para la obtención de individuos poliploides, para cada población en particular.

El 100% de individuos triploides se ha obtenido en *Salmo salar*, por medio de choque térmico (Benfey & Sutterlin, 1984); en *Rh. quelen* este mismo porcentaje se ha alcanzado, realizando un choque de presión (Huergo & Zaniboni-Filho, 2006), lo que conlleva a resultados más consistentes, pero presenta la desventaja de requerir equipos costosos (Maxime, 2008). En Colombia, la obtención de triploides de *Rh. quelen* en porcentajes superiores al 90% es un gran logro, ya que se tienen pocos reportes, hasta el momento, y la estandarización de ese procedimiento es importante para cuando se quieran utilizar dichos individuos como modelos experimentales o se quieran aprovechar sus ventajas de esterilidad; además, serviría para promover a los productores acuícolas del país a utilizar este tipo de biotecnologías, que son de gran importancia, para obtener ventajas productivas y son económicas.

En el grupo en que no se realizó choque térmico, se halló un porcentaje de triploides equivalente al 13,7%, lo que conlleva suponer varias posibilidades: primero, que de manera natural, en una pequeña proporción, se haya presentado una falla en la extrusión del cuerpo polar después de fertilizar los huevos (Tiwary *et al.* 2004); o se dio el proceso de fertilización normal, pero los huevos posiblemente por estrés mecánico generado en la manipulación; o por agentes químicos, se encontraban en un estado no reducido  $2n$  (Borin *et al.* 2002).

Phillips *et al.* (1986) propusieron el método de identificación de individuos triploides por medio de la observación de regiones organizadoras de nucléolo teñidas con plata, en núcleos interfásicos, en diferentes especies de salmónidos, incluyendo la trucha arco iris; sin embargo, sugirió que la técnica solamente debía ser usada en el caso único de que la especie expresara un cromosoma con una región organizadora de nucléolo por genoma haploide. Zharskaya & Zatssepina (2007) plantearon que dentro del cariotipo existen unos cromosomas específicos, en los cuales, se encuentra el conjunto de regiones organizadoras de nucléolo y de ADN<sub>r</sub> y el número presente de cromosomas de este tipo, está directamente relacionado con el número de nucléolos en la interfase, que puede ser alterado como respuesta celular al choque térmico. En *Rh. quelen* se ha reportado que en cada cromosoma submetacéntrico del par número 20 se encuentran ubicadas las RONes (Moraes *et al.* 2007); sin embargo, existen otros autores que las han reportado en pares acrocéntricos (Fenocchio *et al.* 2003) y subtelocéntricos (Stivari *et al.* 2004), en una frecuencia mucho menor; Moraes *et al.*

(2007) afirman que la variación en la ubicación de las regiones organizadoras de nucléolo asociadas a cromosomas es debido a rearreglos cromosómicos; no obstante, estas variaciones no alteran su número y, por ello, no limitan la utilización de la técnica para la identificación de la ploidía en la especie.

El choque térmico meiótico con las temperaturas 34, 36 y 38°C y con una duración de 2 y 5 minutos permite obtener individuos triploides en *Rhamdia quelen*; sin embargo, es importante considerar que existe un efecto marcado en el tiempo de duración del choque, que disminuye los porcentajes de eclosión, por lo tanto, es deseable usar el menor tiempo para el choque de temperatura con el que se puedan obtener triploides, observándose que el tratamiento 38-2 si bien no arrojó los mayores porcentajes de triploidía es el que mejor se comporta en cuanto a tasas de eclosión y supervivencia.

Este trabajo es el primero que se reporta en el país en cuanto a obtención de triploides en una especie nativa, lo que es importante, dado que teniéndose un referente para su producción, se pueden emplear estos ejemplares como modelos experimentales para estudios en otras áreas o para aprovechar su condición de esterilidad y no madurez sexual, que favorece mayores ganancias de peso en etapas específicas de crecimiento y, además, serviría para promover a los productores acuícolas del país a utilizar este tipo de biotecnologías altamente importantes para diversificar producto, ya que permitiría ampliar el mercado del filete en ciertas especies y son de bajo costo.

**Agradecimientos:** A Colciencias y a la Universidad Nacional Sede Medellín, por financiar el programa de Jóvenes Investigadores 2008-2009, en el marco del convenio especial de cooperación No 209. Al laboratorio de Larvicultura de peces y producción de alimento vivo (Larpeali), de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALONSO, M.; TABATA, Y.; RIGOLINO, M.; TSUKAMOTO, R. 2000. Effect of induced triploidy on fin regeneration of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Zool. (Brasil). 287:493-502.
2. ARVELO, F. 2002. Mitocondria y apoptosis. Acta Cient. Ven. 53:297-306.

3. ARAÚJO, H.; CORDERO, W.; RUGELES, C.; ATENCIO, V. 2003. Evaluación de las características seminales de Blanquillo *Sorubim cuspicaudus* inducido con ova-prim®. Rev. Col. Cienc. Pec. 16 (suplemento):78p.
4. BENFEY, T. 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. Rev. Fish. Sci. (Inglaterra). 7(1):39-67.
5. BENFEY, T.; SUTTERLIN, A. 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult (EE.UU). 42:359-367.
6. BORIN, L.; MARTINS, I.; OLIVEIRA, C. 2002. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. Genetica (EE.UU). 115:253-258.
7. CHIPPARI, A.; GOMES, L.; BALDISSEROTTO, B. 1999. Lethal temperature for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. J. Appl. Aquac. (Brasil). 9(4):11-21.
8. CRUZ-CASALLAS, P.E.; LOMBO-RODRÍGUEZ, D.A.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y.M. 2005. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. Aquacult. Res. 36:682-86.
9. DÍAZ, N.; NEIRA, R. 2005. Biotecnología aplicada a la acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. Cie. Invest. Agraria (Chile). 32(1):45-59.
10. DUBEAU, S.; FENG, P.; TREMBLAY, G.; BRADLEY, T. 1998. Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein hsp 70 and confers protection against osmotic shock. Aquacult. 168:311-323.
11. FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; DIAS, A.L.; SWARÇA, A.C. 2003. Cytogenetic studies and correlated considerations on Rhamdinae relationships (Pisces, Siluroidei, Pimelodidae). Cytologia. 68(4):363-368.
12. FLEURY, C.; MIGNOTE, B.; VAYSSIERE, J. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie (EE.UU). 84:131-141.
13. HARTL, F. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature. 381:571-580.
14. HERNÁNDEZ, D.; HUBERT, J.; BOURGEOIS, C. 1980. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. Chromosoma (Inglaterra). 79: 42-362.
15. HILDEBRANDT, B.; WUST, P.; ALHERS, O.; DIEING, A.; SREENIVASA, G.; KERNER, T.; FELIX, R.; RIESS, H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. Crit. Rev. Oncol. Hematol. (EE.UU). 43:33-56.
16. HUERGO, G.; ZANIBONI, E. 2006. Triploidy induction in Jundiá *Rhamdia quelen* through hydrostatic pressure shock. J. Appl. Aquacult. 18(4):45-57.
17. HULATA, G. 2001. Genetics manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. Genetica (EE.UU). 111:155-173.
18. LINCOLN, R.; BYE, V. 1984. Triploid rainbows show commercial potential. Fish Farmer (EE.UU). 7:30-32.
19. MAXIME, V. 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. Fish Fisheries (Inglaterra). 9:67-78.
20. MORAES, V.; CEREALI, S.; FROELICH, O.; DIAS, A. 2007. Cytogenetic characterization of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Brazil. Genetics Mol. Res. (Brasil).6(3):627-633.
21. PHILLIPS, R.; ZAJICEK, J.; IHSEN, P.; JOHNSON, O. 1986. Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. Aquacult. 54:313-319.
22. PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J.C.; FLAJŠHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquacult. 293(3-4):125-156.
23. PINEDA, H.; JARAMILLO, J.; ECHEVERRI, M.; OLIVEIRA, A. 2004. Triploidía en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): posibilidades en Colombia. Rev. Col. Cienc. Pec. 17(1):45-52.
24. RODRÍGUEZ, M. 2007. Fichas de especies. Acuicultura Uruguay. Disponible desde Internet en: <http://www.dinara.gub.uy/fichas%20de%20especies/bagre%20negro.htm> (con acceso 14/08/07).

25. ROLDÁN, G. 1992. Fundamentos de Limnología Neotropical. Edit. Universidad de Antioquia, Medellín. 529p.
26. SCHMICKEL, R.; GONZALEZ, I.; ERICKSON, J. 1985. Nucleolus organizing genes on chromosome 21: recombination and non-disjunction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 450:121-131.
27. SOLLER, F.; GUIMARÃES, R.; OROZCO, R.; SILVA, A. 2007. Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes) (Quoy&Gaimard, 1824). Aquacult. 272S1:S110-S114.
28. STIVARI, M.; MARTINS-SANTOS, I. 2004. Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). Cytologia (Japón). 69:25-34.
29. TABATA, Y. 2008. Biotecnologías aplicadas a truiticultura. Rev. Col. Cienc. Pec. 21:455-522.
30. THORGAARD, G. 1983. Chromosome set manipulation and sex control. En: Hoard, W.S.; Randall, D.J.; Donaldson, E.M. (eds). Fish Physiology. Acad. Press. New York. p.405-434.
31. TIWARY, B.; KIRUBAGARAN, R.; RAY, A. 2004. The biology of triploid fish. Rev. Fish Biol. Fisheries (Reino Unido).14:391-402.
32. VARELA, Z.; FISCHER, K.; FABIANO, G. 1982. Reproducción artificial de bagre negro *Rhamdia sapo*. Project reports. Montevideo. 34p. Disponible desde Internet en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AC568S/AC568S01.htm> (con acceso 15/08/2007).
33. VOZZI, A.; SÁNCHEZ, S.; PERMINGEAT, E. 2003. Inducción de triploidía en *Rhamdia quelen* (PISCES, PI-MELODIDAE). Bol. Inst. Pesca, São Paulo. 29(1):87-94.
34. WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. 1983. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 220p.
35. ZHARSKAYA, O.; ZATSEPINA, O. 2007. The dynamics and mechanisms of nucleolar reorganization during mitosis. Cell Tissue Biol. (EE.UU). 1(4):277-292.

Recibido: Enero 12 de 2012

Aceptado: Octubre 26 de 2012

# VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

## VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*

Orlando Ramírez <sup>1</sup>, Sandra Bernal <sup>2</sup>

<sup>1</sup> DVM, M.Sc., Profesor Auxiliar Facultad de Ciencias Pecuarias. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Calle 222 No. 55-37, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: orramirez@udca.edu.co; <sup>2</sup> DVMZ, Esp, M.Sc., Profesor auxiliar Facultad de Ciencias Pecuarias. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Calle 222 No. 55-37, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: sabernalu@udca.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 419 - 429, 2012

### RESUMEN

En Colombia y en el mundo la producción de embriones *in vitro*, a nivel comercial, se ha incrementado en los últimos años. La transferencia de los mismos, se realiza, principalmente, en fresco, debido a las posibles lesiones causadas por los procesos de criopreservación. La vitrificación es una herramienta útil en tecnologías de reproducción asistida (TRA), que se emplea en medicina humana y en veterinaria, que puede ser usada como alternativa para la criopreservación de germoplasma (oocitos, espermatozoides y embriones). Pese a los grandes avances que se han realizado en el desarrollo de dicha técnica, su aplicación es escasa en la industria de producción de embriones bovinos y se emplea, básicamente, en proyectos de investigación. En esta revisión, se discuten diferentes aspectos involucrados en el proceso de vitrificación de embriones *in vitro*, algunos de los resultados obtenidos, las ventajas y las principales limitantes de la misma.

Palabras clave: Criobiología, criopreservación, FIV, ganadería.

### SUMMARY

Around the world and in Colombia the *in vitro* cattle embryo production has increased in the last years. The embryo transfer of *in vitro* produced embryos is mainly realized with fresh embryos, due to the possible injuries induced during the cryopreservation process. Vitrification is a tool applied in assisted reproductive technologies (ARTs) and it is used as an alternative for germplasm cryopreservation (sperm, oocytes and embryos) in human and veterinary medicine. Despite major efforts focused on the development of the technique,

its commercial application is scarce in the embryo production industry and it is employed mainly in research. In this review, different aspects involved in the *in vitro* embryo vitrification technique, such as protocols, main advantages, limitations and some results, are discussed.

Key words: Cattle, cryopreservation, cryobiology, IVF.

### INTRODUCCIÓN

La producción de embriones bovinos *in vitro* ha aumentado, globalmente, durante la última década; para el 2010, la IETS reportó la transferencia de 339.685 embriones bovinos, a nivel mundial (Stroud, 2011). En Suramérica, la producción de embriones es cerca del 35% de la producción global e, incluso, en algunos países, como Brasil, la producción de embriones *in vitro* ha superado y remplazado los procedimientos convencionales de superovulación (Pontes *et al.* 2010).

En Colombia, la producción de embriones obtenidos aplicando protocolos de superovulación (Bolívar & Maldonado, 2008), así como los embriones producidos bajo condiciones *in vitro* (Chacón, 2001), se han intensificado desde su introducción, a finales de los años 80's y 90's, respectivamente; sin embargo, no existen datos sobre el número total de embriones y las tasas de preñez obtenidas (Bolívar & Maldonado, 2008). Un elevado desarrollo en la producción de embriones requiere, por una parte, de una amplia disponibilidad de hembras receptoras, previamente sincronizadas y listas para ser transferidas y, por otra, mantenimiento de las receptoras, que influyen, notoriamente, en los costos de producción, por lo tanto, una alternativa para incrementar la flexibilidad de los procesos de transferencia

de embriones es la criopreservación, evitando, de esta manera, la necesidad de su transferencia a la receptora en fresco. Tradicionalmente, para criopreservar embriones producidos *in vivo*, se utiliza la técnica de congelación que requiere de un equipo especializado para su realización; sin embargo, es sabido que los embriones producidos *in vitro* poseen una calidad inferior a los embriones producidos *in vivo*. Se ha identificado que los producidos *in vitro* pueden diferir de sus homólogos *in vivo* en morfología, en metabolismo, en expresión génica, en perfiles de metilación y en criotolerancia, entre otros. Dichas diferencias pueden influenciar la capacidad de desarrollo del mismo (Iwasaki *et al.* 1990; De la Fuente & King, 1997, Rizos *et al.* 2008; Hansen *et al.* 2010; Stinshoff *et al.* 2011; Bernal *et al.* 2012). La congelación, como técnica de preservación, puede afectar la posterior viabilidad de los embriones producidos *in vitro* (Massip *et al.* 1995; Stinshoff *et al.* 2011), por lo tanto, se prefieren las transferencias de embriones *in vitro* en fresco a las receptoras, cuando solamente se tiene acceso a este método de criopreservación, con el ánimo de obtener tasas de preñez satisfactorias.

En estos casos, la vitrificación ha probado ser una alternativa efectiva para la criopreservación de este tipo de embriones (Wurth *et al.* 1994; Palasz *et al.* 1997; Martínez *et al.* 2002; Stinshoff *et al.* 2011). La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones (Palma, 2008). Rall & Fahy (1985) fueron los primeros en reportar la eficacia de la vitrificación en la criopreservación de embriones de ratón. Durante la vitrificación, el embrión al ser enfriado no se cristaliza sino que se produce una solidificación, pasando del estado líquido a un estado sólido no estructurado, similar al vidrio (Huang *et al.* 2007). La vitrificación es un procedimiento de

criopreservación más simple que la congelación lenta y se ha utilizado en embriones de búfalos (Manjunatha *et al.* 2009), ovinos (Martínez *et al.* 2006), cabras (El-Gayar & Holtz, 2001), equinos (Eldridge-Panuska *et al.* 2005), animales silvestres (Piltti *et al.* 2004) y en humanos (Elnahas *et al.* 2010). A pesar de ser una técnica simple, de bajo costo, con aparentemente buenos resultados, pocos trabajos se han publicado sobre este tema en el país y vagamente se conoce sobre sus beneficios, bajo nuestras condiciones (Serrano *et al.* 2002; Rodríguez & Jiménez, 2011). Adicionalmente, los estudios publicados, a nivel mundial, varían en cuanto a protocolos y resultados obtenidos, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es proveer una revisión de las principales ventajas, variables, procedimientos y eficiencia de la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Características de la vitrificación: Durante la vitrificación, la velocidad de enfriamiento es rápida (107°C/seg) y la concentración utilizada de crioprotectores es alta, pero en bajo volumen. Estas características hacen que los efectos tóxicos y las lesiones osmóticas, causadas por el crioprotector, disminuyan. Igualmente, al minimizar el volumen de la muestra, combinada con un enfriamiento acelerado, permite reducir la concentración de crioprotectores y la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelular; es una de las crioinjurias más comunes (Cuadro 1) (Arav, 1992; Vajta *et al.* 1998; Hamawaki *et al.* 1999; Vajta, 2000; Visintin *et al.* 2002; Vajta & Kuwayama, 2006; Yavin & Arav, 2007).

Diversos protocolos de vitrificación han sido aplicados para criopreservar embriones bovinos *in vitro*, en los últimos años. Estos protocolos difieren en el tipo y la concentración del crioprotector utilizado, en el número de pasos de equilibrio, en las técnicas de almacenamiento y en los tiempos de

Cuadro 1. Principales ventajas de la vitrificación.

1. Contacto directo entre los embriones y el nitrógeno líquido.
2. No hay cristalización del embrión.
3. Utiliza altas concentraciones de crioprotector que disminuye el periodo de exposición del embrión a los crioprotectores.
4. Los procesos de vitrificación - desvitrificación son rápidos.
5. El uso de pequeños volúmenes provee un incremento significativo en la tasa de enfriamiento.
6. Las tasas de enfriamiento, se pueden dar entre 15,000 y 30,000°C/ minuto.
7. Se minimizan las crioinjurias por los cambios osmóticos.
8. Se reduce el tiempo del procedimiento de criopreservación (entre 2- 10 min).
9. Los protocolos son sencillos.
10. Se eliminan los costos de adquisición de equipos.

Modificado de Liebermann *et al.* 2002.

exposición del embrión, en cada una de las etapas del proceso (Park *et al.* 1999; Nguyen *et al.* 2000; Martínez *et al.* 2002; Dattena *et al.* 2004).

**Tipos de crioprotectores:** Los embriones para ser criopreservados necesitan ser deshidratados parcialmente para evitar la formación de cristales de hielo (cristalización) y de gradientes de concentración, los cuales, lesionan las estructuras citoplasmáticas y provocan lesiones osmóticas y tóxicas en la membrana celular (Yavin & Arav, 2007). Esta deshidratación, se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación (Celestinos & Gatica, 2002). Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular, durante el proceso de congelación (Van Wagendonk de Leeuw *et al.* 1997).

En la criopreservación de embriones, se pueden utilizar dos clases de crioprotectores o la combinación de estos:

- **Permeables o intracelulares:** Son crioprotectores de bajo peso molecular e incluyen: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG), 1-2 propanediol, etanol, propilenglicol (Martínez *et al.* 2006; Palma, 2008). Estos compuestos deshidratan la célula penetrándola para ayudar a proteger el citoplasma (Miyake *et al.* 1993). El más utilizado en los procedimientos de vitrificación es el EG, ya que tiene mayor permeabilidad y relativa baja toxicidad (Sommerfeld & Niemann, 1999), comparado con otros crioprotectores, como el glicerol y el propilenglicol (Palasz & Mapletoft, 1996); no obstante, altas concentraciones de estos crioprotectores no son recomendables, puesto que pueden tener efectos tóxicos e hipertónicos. Visintin *et al.* (2002) mencionan que cuando se utiliza una concentración de 3,6 Molar (M) de EG, las tasas de viabilidad son similares entre los embriones vitrificados y embriones no congelados; sin embargo, cuando se aumenta a 7,2 M, la concentración de EG, se presenta embriotoxicidad.
- **Impermeables o extracelulares:** Son crioprotectores de alto peso molecular que extraen el agua intracelular aplicando la diferencia de presión osmótica sin penetrar al embrión y concentran las macromoléculas en el citoplasma, reduciendo así la formación de hielo intracelular (Rall, 1987; Sommerfeld & Niemann, 1999; Visintin *et al.* 2002; Huang *et al.* 2007). Dentro de estos crioprotectores, se incluyen sucrosa, glucosa, dextrosa, trealosa, polivinil-pirrolidona (PVP) y Ficoll 70 (Kasai, 1996; Martínez *et al.* 2002; Huang *et al.* 2007), siendo el más utilizado, la sucrosa.

Con el ánimo de disminuir los efectos tóxicos (shock

osmótico) específicos de los crioprotectores, durante la fase de equilibrio de la vitrificación, se puede utilizar la combinación de dos o tres crioprotectores permeables e impermeables (EG+DMSO/1,2 Propanediol/Glicerol + Sucrosa) (Vajta *et al.* 1997; Vajta, 2000; Martínez *et al.* 2002; Huang *et al.* 2007). Estos crioprotectores, se emplean en altas concentraciones, que permite deshidratar al embrión en forma rápida (Yavin & Arav, 2007). Físicamente, existe una correlación entre la tasa de enfriamiento y la concentración de los crioprotectores; entre más rápida la tasa, menor será la concentración de crioprotectores requeridos y viceversa (Elnahas *et al.* 2010).

**Procedimiento de vitrificación:** Para realizar la vitrificación, se requieren básicamente cuatro pasos: 1) Colocar al embrión en una solución de equilibrio (SE); 2) Poner en contacto al embrión con la solución vitrificante (SV); 3) Empacar y sumergir el embrión en nitrógeno líquido y 4) Calentar el embrión vitrificado (desvitrificación).

Respeto al primer paso, **embrión en solución de equilibrio (SE):** Durante la fase inicial de equilibrio, los embriones obtenidos entran en contacto con un medio de mantenimiento antes de ponerse en contacto con la solución vitrificante. Para el periodo de equilibrio, se han reportado valores de 1,5 minutos (Vajta *et al.* 1999), 5 min (Martínez *et al.* 2002; Varago *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007), 7 minutos (Dobransky *et al.* 1991) o 10 minutos (Kasai, 1996; Martínez *et al.* 2006). La solución de equilibrio (SE) consiste en un medio de mantenimiento (normalmente TCM-199), suplementado con bajas concentraciones de crioprotectores (i.e. 10% EG+ 10% DMSO) (Vajta *et al.* 1998). En esta fase, el embrión empieza a entrar en contacto con el(los) crioprotector(es) en múltiples pasos, incrementando, gradualmente, la concentración de crioprotector, en cada uno de ellos. Se ha reportado la exposición del embrión en un solo paso (Saha *et al.* 1996; Walker *et al.* 2006), dos pasos (Vajta *et al.* 1998) y tres pasos (Donnay *et al.* 1998).

Los resultados indican que al aumentar el número de pasos de equilibrio antes de la inmersión final en la solución de vitrificación, la viabilidad de los embriones es mayor después de la desvitrificación (Kuwayama *et al.* 1992; Ohboshi *et al.* 1997; Walker *et al.* 2006; Manjunatha *et al.* 2009). Este incremento gradual en la concentración del crioprotector permite que se disminuya el estrés osmótico y el daño celular (Kuwayama *et al.* 1992); sin embargo, el número de pasos en la fase de equilibrio es uno de los puntos críticos que aún impiden que la vitrificación sea utilizada a nivel comercial, ya que el tiempo en cada uno de los pasos puede retrasar el proceso, cuando se trata de vitrificar un número elevado de embriones. Walker *et al.* (2006) evaluaron las tasas de viabilidad de los embriones *in vitro*, comparando

procesos en los que se adicionaba el crioprotector, en uno o dos pasos. Las tasas de viabilidad embrionaria con un paso fueron inferiores a las obtenidas con dos pasos (85% vs 98%, respectivamente); por lo tanto, el simplificar este proceso para hacerlo en una forma más rápida podría ser inadecuado, para la posterior viabilidad de los embriones.

Con relación al segundo paso, contacto del embrión con la solución vitrificante (SV): Después de la fase de equilibrio, el embrión entra en contacto con la solución vitrificante. En este caso, la SV contiene altas concentraciones de crioprotector (i.e. 20% EG + 20% DMSO) (Vajta *et al.* 1998), pero el tiempo de contacto del embrión con el crioprotector disminuye considerablemente, puesto que existe un límite biológico en la tolerancia de las células al crioprotector, para evitar su toxicidad y la formación de cristales de hielo (Vajta *et al.* 1999). El tiempo de exposición de los embriones con la SV varía entre los reportes dependiendo de los crioprotectores utilizados y el tipo de embrión a vitrificar (mórula o blastocisto).

El periodo de contacto del embrión con la solución vitrificante oscila entre 20-60 segundos (Vajta *et al.* 1997; Vajta *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2002; Varago *et al.* 2006; Walker *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007; Manjunatha *et al.* 2009). Algunos consideran que la viabilidad de los embriones es mayor cuando el tiempo de exposición es menor; sin embargo, Walker *et al.* (2006) consideran que tiempos cortos puede ser insuficientes para permitir que niveles adecuados del crioprotector ingresen al interior de la célula y eviten la formación de cristales de hielo y la posterior muerte celular.

Concerniente al tercer paso, empaquete del embrión: Diversas técnicas han sido descritas para el almacenamiento de los embriones vitrificados. Estas técnicas han sido diseñadas para mantener el embrión en un contacto íntimo con el nitrógeno líquido, con el fin de obtener tasas altas de enfriamiento, para alcanzar el estado vítreo (Ríos *et al.* 2010). Estas técnicas permiten el uso de pequeños volúmenes de crioprotector, con la consecuente disminución de la embriotoxicidad (Ríos *et al.* 2010).

Inicialmente, se utilizó para la vitrificación la pajilla plástica convencional de 0,25 cc, la cual, utiliza volúmenes grandes de crioprotector (>20  $\mu$ L) (Palasz & Maplefot, 1996; Lewis *et al.* 1999; Martínez *et al.* 2006; Vieira *et al.* 2007). Posteriormente, Vajta *et al.* (1998) adelgazaron y estiraron por calentamiento la pajilla plástica, hasta alcanzar un diámetro interno de 0,7-0,8 mm y desarrollaron la denominada Pajilla abierta estirada OPS (Open Pulled Straw). Este adelgazamiento de la pajilla permite utilizar un menor volumen de crioprotector y la tasa de enfriamiento pasa de 2500°C/min, obtenidos con las pajillas convencionales, hasta los 20.000°C/min, obtenidos con la OPS (Vajta *et al.* 1998). Con esta sistema, el embrión

es cargado en el medio de mantenimiento (volumen 0,5 $\mu$ L – 1 $\mu$ L) por la parte más fina de la pajilla e, inmediatamente, es sumergido en nitrógeno líquido quedando en contacto directo, durante el periodo de almacenamiento (Celestinos & Gatica, 2002). Esta exposición directa con el nitrógeno y la posibilidad de contaminación con patógenos virales durante el almacenamiento (Bielanski *et al.* 2003) motivaron el desarrollo de técnicas, para evitar el contacto directo del embrión con el nitrógeno líquido (sistemas cerrados), eliminando el riesgo de contaminación. A partir de allí, se desarrollaron el cryoloop (Lane *et al.* 1999), cryotop (Kuwayama *et al.* 2005; Vajta & Kuwayama, 2006; Lucena *et al.* 2006), el McGill Cryoleaf (Huang *et al.* 2007), la super pajilla abierta estirada (Super Open Pulled Straws; SOPS) (Yu *et al.* 2010), entre otros.

Al evaluar la viabilidad de los embriones utilizando sistemas abiertos (OPS) vs sistemas cerrados (SOPS), Yu *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas en las tasas de viabilidad a las 72 horas post-vitrificación en los sistemas de almacenamiento abiertos (OPS) y cerrados (CPS) (35,2% y 34,9%, respectivamente). Por el contrario, en un reciente estudio realizado por los autores (datos sin publicar), se encontró que al vitrificar blastocistos expandidos producidos bajo condiciones *in vitro*, en medios enriquecidos con suero fetal bovino (SFB), almacenados en OPS y en Cryotop, utilizando una solución de etilenglicol (20%) DMSO (20%) y sucrosa (10%) en concentraciones decrecientes, con volúmenes de 0,2  $\mu$ L, no se presentó re-expansión de los blastocistos, a las 24 y 48 horas post desvitrificación.

Se han aplicado otros sistemas de empaque con diferentes materiales, como el vidrio (micropipetas de vidrio estiradas, glass pulled micropipettes GPM) (Ríos *et al.* 2010); nylon (Matsumoto *et al.* 2001) o gel (Gel-loading tips GL-Tip®) (Tominaga & Hamada, 2001). Estas variaciones en el material de empaque pretenden utilizar elementos que permitan una tasa de enfriamiento más rápido y, por lo tanto, utilice un menor volumen de crioprotector (Ríos *et al.* 2010).

Finalmente, el cuarto paso calentamiento del embrión (desvitrificación): Antes de realizar la transferencia, los crioprotectores utilizados deben ser retirados en forma lenta de los embriones, ya que, una vez en contacto con los fluidos uterinos isotónicos, se produce una sobrehidratación que provoca daños celulares irreversibles con ruptura de la membrana celular y la posterior muerte embrionaria (Visintin *et al.* 2002; Cabrera *et al.* 2006).

Para el proceso de desvitrificación, los embriones vitrificados son sumergidos en una serie de soluciones hipertónicas y rehidratantes, que contienen concentraciones decrecientes de soluciones osmóticas no permeables (ib. 0,5 M Sucrosa), para mantener el equilibrio entre la presión osmótica interna y exter-

na (Yavin & Arav, 2007). El tiempo de exposición del embrión con las soluciones hiperosmóticas decrecientes varía entre 3 y 5 min por paso (Martínez *et al.* 2006). Durante el calentamiento, la sucrosa actúa como una solución buffer para evitar la excesiva hinchazón de los embriones durante la remoción del crioprotector de las células (Vajta & Kuwayama, 2006).

**Consecuencias de la vitrificación (crioinjurias):** En contraste de lo que ocurre con los embriones bovinos producidos *in vivo*, los embriones producidos *in vitro* presentan un mayor daño y una capacidad disminuida de sobrevivencia después de la criopreservación (Gómez *et al.* 2009); sin embargo, mediante el uso de la vitrificación las lesiones producidas, se reducen considerablemente. Los embriones cuando son vitrificados pueden sufrir daños morfológicos y funcionales, denominados crioinjurias (Zeron *et al.* 1999; Vajta & Kuwayama, 2006). Dentro de las crioinjurias, se encuentran alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, por la formación de cristales de hielo (Leibo *et al.* 1996), fragmentación del ADN, daño en el huso meiótico, apoptosis celular (Park *et al.* 2006) y expresión génica alterada (Stinshoff *et al.* 2011). El grado de crioinjurias que sufre el embrión depende de ciertos factores, como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de las membranas y la calidad y sensibilidad del embrión (Gómez *et al.* 2009).

La calidad del embrión ha estado relacionada con la resistencia del embrión a la criopreservación (Rizos *et al.* 2003). En algunos reportes, se ha establecido que el número de células en embriones producidos *in vitro* puede ser menor (De la Fuente & King, 1997) y de menor compactación (Iwasaki *et al.* 1990), comparadas con los embriones producidos *in vivo*. El efecto del estado embrionario para sobrevivir a los procedimientos de criopreservación está relacionado con el número de células (Saha *et al.* 1996). Gómez *et al.* (2009) hallaron que, después de la vitrificación, se disminuye el número de células en la masa celular interna y este factor puede explicar por qué la viabilidad de los embriones *in vitro* después de la criopreservación es algunas veces escasa. Estos hallazgos están de acuerdo con lo reportado por Donnay *et al.* (1998), quienes mencionan que existe una alta correlación entre la tasa de viabilidad embrionaria y el promedio del número de células en blastocistos, que sobrevivieron después de la vitrificación.

Ríos *et al.* (2010) encontraron que el estado embrionario influye en las tasas de eclosión embrionaria después de la vitrificación. Los blastocistos expandidos son menos resistentes a la vitrificación que los blastocistos (Leibo *et al.* 1996; Vajta *et al.* 1996; Donnay *et al.* 1998) y si artificialmente se elimina el blastocelo, las tasas de viabilidad aumentan después de la vitrificación, ya que este puede alterar el potencial de criopreservación, debido a la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento (Vanderzwalmen

*et al.* 2002; Hiraoka *et al.* 2004; Huang *et al.* 2007). Igualmente, se han reportado mayores tasas de expansión de blastocistos cuando los embriones son vitrificados en estado avanzado de desarrollo de blastocisto que cuando se vitrifican mórulas (Vajta *et al.* 1996; Tominaga & Hamada, 2001; Campos-Chillon *et al.* 2009).

Las diferencias en la tolerancia a la criopreservación, se pueden explicar por las diferencias entre mórulas y blastocistos, como el tamaño celular y, posiblemente, permeabilidad alterada a los crioprotectores y la concentración de lípidos (Walker *et al.* 2006). Periodos largos de exposición al crioprotector son nocivos para mórulas que son más sensibles a la exposición del crioprotector, necesitando, posiblemente, tiempos de exposición más cortos (Manjunatha *et al.* 2009). En el caso de mórulas, la concentración de lípidos es mayor que el encontrado en blastocistos, lo cual, favorece que estas sean más susceptibles a presentar crioinjurias (Saragusty & Arav, 2011) y ha llevado a que la mayoría de los estudios de criopreservación de embriones en bovinos, se realicen alrededor del día 7, en estado de blastocisto.

**Eficiencia de la vitrificación de embriones producidos *in vitro*:** A pesar de las ya mencionadas ventajas que ofrece la técnica existen algunas variables que pueden afectar los resultados de este proceso (Cuadro 2). Algunas de estas son también compartidas con la técnica de congelación, como la toxicidad de los crioprotectores, los cuales, pueden inducir daños embrionarios dependiendo de su concentración (Saragusty & Arav, 2011). Las otras variables están ligadas, principalmente, a la técnica como tal, es decir, al manejo del protocolo en cada laboratorio. Como ya se mencionó son diversas las modificaciones reportadas en cada publicación (procedimiento de vitrificación), las cuales, hacen que los resultados también varíen de laboratorio a laboratorio. Estas diferencias en los resultados pueden estar relacionadas con los factores mencionados anteriormente, como el tipo y la concentración de crioprotector(es) utilizado(s), la combinación de los mismos, el sistema de empaque y de métodos aplicados para la vitrificación, la tasa de enfriamiento, el volumen utilizado para la vitrificación, la calidad y el estado de embrión, así como la habilidad del técnico (Saragusty & Arav, 2011; Vajta, 2012). Básicamente, la eficiencia de la técnica empleada puede ser probada, como ya fue mencionado, *in vitro*, mediante la valoración de la viabilidad del embrión morfológicamente después de la desvitrificación (re-expansión y eclosión) o, *in vivo*, transfiriendo los embriones desvitrificados a receptoras y, posteriormente, evaluando las tasas de gestación y de nacimientos. Diferentes trabajos reportan tasas de supervivencia embrionaria post- desvitrificación altas, de hasta el 100% (Tabla 1); sin embargo, cuando se evaluaron las tasas de gestación después de la transferencia de embriones producidos *in vitro* y vitrificados, estas fueron

Cuadro 2. Variables que pueden afectar la eficiencia de la vitrificación.

1. Toxicidad de los crioprotectores.
2. Temperatura de las soluciones de vitrificación.
3. Tiempo de exposición del embrión al crioprotector.
4. Volumen de la solución crioprotectora.
5. Método de vitrificación (tasa de enfriamiento).
6. Calidad y estadio de desarrollo de los embriones.
7. Experiencia y eficiencia del personal.
8. El contacto directo entre el nitrógeno líquido y la solución de vitrificación.

Modificado de Liebermann *et al.* 2002.

Tabla 1: Tasas de preñez obtenidas con procedimientos de vitrificación

% Preñez	Embriones transferidos*	Evaluación <i>in vitro</i>		Solución de vitrificación	Sistema empaque	Fuente
		Re-expansión	Eclosión			
0%*	6	18,80%	--	40% EG + 0,3M SUC	Pajilla francesa 0,25mL	Palasz <i>et al.</i> 1997
4,50%	22	67%	53%	25% GLI + 25% EG	Pajilla francesa 0,25mL	Donnay <i>et al.</i> 1998
64%	22	--	--	20% EG + 20% DMSO	Open Pulled Straws	Lewis <i>et al.</i> 1999
50%	40	71,60%	66,60%	25% EG + 25% GLI + 0,1 M SUC	Pajilla francesa 0,25mL	Martínez <i>et al.</i> 2002
30%	10	60%	54%	6,5M GLI	Pajilla francesa 0,25mL al	Nedambale <i>et al.</i> 2004
41,9%	481	91,8%	80,6%	35% EG + 5% PVP + 0,4 M TRE	Microgota sobre base metálica	Xu <i>et al.</i> 2006
19%	21	94,80%	75,80%	20% EG + 20% DMSO	Micropipeta de vidrio	Vieira <i>et al.</i> 2007
40%	30	100%	95,50%	16,5% EG+ 16,5 DMSO +0,5M SUC	Criotop	Inaba <i>et al.</i> 2011

\*Blastocistos

muy variables. En la tabla 1, se pueden observar resultados de diferentes grupos de investigación que oscilan entre 0-64% usando diferentes sistemas de empaque y diversas soluciones en el medio de vitrificación. Según estos resultados, las mejores tasas de gestación se presentaron cuando se utilizaron OPS como dispositivo de almacenamiento y una

solución de vitrificación conteniendo 20% etilenglicol y 20% dimetil sulfóxido (Lewis *et al.* 1999). Este estudio fue uno de los primeros estudios en reportar esta técnica con éxito en bovinos, en donde dos embriones fueron transferidos en la misma receptora. Los demás valores presentados en la tabla 1, no evidencian una mejoría en las tasas de gestación, lo que

señala que pese a los grandes avances en investigación, las modificaciones realizadas al proceso no han incrementado la eficiencia del mismo. Desafortunadamente, muchos trabajos publicados no realizaron transferencia de los embriones, por lo cual, es difícil conocer si los procesos son realmente viables, es decir, que no afectan la capacidad de desarrollo del embrión, aun cuando las tasas de re-expansión y eclosión sean satisfactorias. Adicionalmente, en la mayoría de estudios que reportan transferencias, se realizaron usando grupos pequeños de embriones y receptoras, lo cual, también es cuestionable. Un estudio realizado por Xu *et al.* (2006) es un ejemplo importante, con un número representativo de embriones transferidos y tasas altas de viabilidad pos desvitrificación y satisfactorias de gestación (Tabla 1). En dicho estudio no se utilizó OPS sino que la vitrificación se realizó en micro-gotas sobre una superficie metálica enfriada previamente y las tasas de gestación superaron el 40%. Desafortunadamente, tanto la OPS como las micro - gotas no permiten la transferencia directa del embrión, mientras que el uso de pajillas de 0,25mL podría facilitar la misma, así como permitir el almacenamiento en nitrógeno líquido. En general, los protocolos de vitrificación incluyen una combinación de crioprotectores, con el ánimo de reducir la toxicidad; no obstante, el etilenglicol es el más utilizado por su alta de penetración celular estando presente en casi todos los estudios de vitrificación y evidenciando que la toxicidad, a largo tiempo y a bajas temperaturas, no supera a la congelación tradicional (Saragusty & Arav, 2011; Vajta, 2012). A nivel sanitario, la vitrificación aun es fuente de discusión, ya que los procesos con mejores resultados, como por ejemplo las OPS y otros sistemas abiertos, aparentemente, no ofrecen seguridad en cuanto a la posible transmisión de enfermedades, por el contacto directo con el nitrógeno líquido, lo cual, también limita la aplicación comercial de la técnica y, por el contrario, los sistemas completamente cerrados aun no cuentan con la misma eficiencia de los métodos abiertos (Vajta, 2012). Estas diferencias en los procesos y puntos de vista de cada grupo de investigación hacen que la estandarización del protocolo de vitrificación sea compleja, puesto que no permiten la evolución de los protocolos más sólidos. Pese a las diferencias, se puede observar que mediante el uso de esta técnica es posible obtener tasas satisfactorias de gestación empleando embriones producidos *in vitro* y, posteriormente, crioconservados, aun cuando no exista un protocolo universal y aprobado para realizar la vitrificación.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La vitrificación es una alternativa para la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*. Es una técnica sencilla, que no requiere la compra de equipos de criopreservación costosos y al no formar cristales de hielo en el interior del embrión, menores lesiones se presentan

durante el proceso, lo que resulta en la obtención de tasas de preñez aceptables después de la transferencia; sin embargo, en la literatura se reportan múltiples protocolos y resultados variables. Esta variabilidad en los resultados podría ser explicada por los diversos factores que pueden influir en el proceso, incluyendo el tipo de crioprotector y sus diferentes concentraciones en las soluciones de vitrificación y de desvitrificación, la curva de descenso de temperatura, el protocolo de vitrificación, el sistema de almacenamiento o la adición de suplementos durante la producción de embriones, así como la experticia del personal que la realiza.

La variabilidad en los procesos de vitrificación/desvitrificación es el reflejo de la diversidad en los protocolos de producción y de conservación de embriones en cada laboratorio, lo que, a su vez, modifica los resultados y la calidad de los embriones que se producen. Todos los factores mencionados anteriormente demuestran la falta de estandarización en los procedimientos. Por lo tanto, el reto consiste en desarrollar un procedimiento de vitrificación universal, rápido, eficiente, seguro a nivel sanitario y toxicológico, que mantenga los bajos costos, ya que en la medida en que se implementa la estandarización de los protocolos se incrementan los costos, siendo necesario el desarrollo e implementación de equipos. Cuando sea factible dicha estandarización, seguramente, la expansión de la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* será posible, haciéndose rutinaria la técnica a nivel comercial. Por consiguiente, se requiere mayor investigación y un consenso en la comunidad científica, para lograr tan importante avance.

Conflicto de intereses: El manuscrito fue preparado y revisado por los autores, quienes declaran que no existe ningún conflicto de interés que ponga en riesgo la validez de la información presentada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ARAV, A. 1992. Vitrification of oocytes and embryos. En: Lauria AGF, editor. New trends in embryo transfer. Cambridge (UK). Portland Press; 255-264.
2. BERNAL, S.M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; TIMMERMANN, B.; NIEMANN, H. 2012. Effects of different *in vitro* maturation systems on bovine embryo development. Repr., Fert. Developm. 23(1):210(Abstract).
3. BIELANSKI, A.; BERGERON, H.; LAU, P.C.; DEVENISH, J. 2003. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. Cryobiology. 46(2):146-152.
4. BOLÍVAR, P.; MALDONADO, E.J. 2008. Análisis de

- costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. Rev. Col. Cie. Pec. 21(3):351-364.
5. CABRERA, P.; FERNÁNDEZ, A.; BASTIDAS, P.; MOLINA, M.; BETHENCOURT, A.; DÍAZ, T. 2006. Vitrificación: Una Alternativa para la Criopreservación de Embriones. Rev. Fac. Cie. Vet. 47(1):9-23.
  6. CAMPOS-CHILLON, L.F.; BARCELO, T.K.F.; SEIDEL, J.R.G.; CARNEVALE, E. 2009. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. Theriogenology. 71(2):349-354.
  7. CELESTINOS, M.; GATICA, R. 2002. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. Arch. Med. Vet. 34(2):157-165.
  8. CHACÓN, J.L. 2001. Nacen primeros terneros *in vitro* en Colombia. Agr. Américas. 302:37-38.
  9. DATTENA, M.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; ISACHENKO, V.; MARA, L.; CHESSA, B.; CAPPAL, P. 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts *in vitro* produced and *in vivo* derived. Theriogenology. 62(3-4):481-493.
  10. DE LA FUENTE, R.; KING, W.A. 1997. Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. Zygote. 5(4):309-320.
  11. DOBRINSKY, J.R.; HESS, F.F.; DUBY, R.T.; JROBL, J.R. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. Theriogenology. 37:202(abstract).
  12. DONNAY, I.; AUQUIER, P.H.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A. 1998. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. An. Repr. Sci. 52(2):93-104.
  13. ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; DI BRIENZA, V.C.; SEIDEL, J.R.; SQUIRES, E.; CARNEVALE, E.M. 2005. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. Theriogenology. 63(5):1308-1319.
  14. EL-GAYAR, M.; HOLTZ, W. 2001. Technical note: vitrification of goat embryos by the open pulled straw method. J. An. Sci. 79(9):2436-2438.
  15. ELNAHAS, A.; ALCOLAK, E.; ABU MARAR, E.; ELNAHAS, T.; ELNAHAS, K.; PALAPELAS, V.; DIEDRICH, K.; AL-HASANI, S. 2010. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. Middle East Fert. Soc. J. 15(1):2-9.
  16. GÓMEZ, E.; MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; CAAMANO, J.N.; FACAL, N.; DIEZ, C. 2009. Vitrification of Bovine Blastocysts Produced *In vitro* Inflicts Selective Damage to the Inner Cell Mass. Repr. Dom. An. 44(2):194-199.
  17. HANSEN, P.; BLOCK, J.; LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; HENDRICKS, K. 2010. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro* - produced embryos for post-transfer survival in cattle. Repr., Fert. Developm. 22(1):59-66.
  18. HIRAOKA, K.; HIRAOKA, K.; KINUTANI, M.; KINUTANI, K. 2004. Case report: successful pregnancy after vitrification of human blastocyst that had completely escaped from the zona pellucida on day 6. Hum. Repr. 19(4):988-990.
  19. HUANG, J.; CHUNG, J.; LIN TAN, S.; CHIAN, R. 2007. High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. Repr. BioMed. 14(4):464-470.
  20. HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. 1999. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. Theriogenology. 51(1):165 (Abstract).
  21. INABA, Y.; AIKAWA, Y.; HIRAI, T.; HASHIYADA, Y.; YAMANOUCHI, T.; MISUMI, K.; OHTAKE, M.; SOMFAI, T.; KOBAYASHI, S.; SAITO, N.; MATOBA, S.; KONISHI, K.; IMAI, K. 2011. In straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. J. Repr. Developm. 57(4):437-443.
  22. IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. J. Repr. Fert. 90(1):279-284.
  23. KASAI, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. An. Repr. Sci. 42(1-4):67-75.
  24. KUWAYAMA, M.; HAMANO, S.; NAGAI, T. 1992.

- Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured *in vitro*. *J. Repr. Fert.* 96(1):187-193.
25. KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; LEDA, S.; KATO, O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination *Repr. Biomed.* 11(5):608-614.
26. LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fert. Ster.* 72(6):1073-1078.
27. LEIBO, S.P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, J.; POLLAR, J.W. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *An. Repr. Sci.* 42(1):45-53.
28. LEWIS, I.M.; LANE, M.W.; VAJTA, G. 1999. Pregnancy rates following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology.* 51(1):168 (Abstract).
29. LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. 2002. Potential Importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Repr.* 67(6):1671-1680.
30. LUCENA, E.; BERNAL, D.P.; LUCENA, C.; ROJAS, A.; MORAN, A.; LUCENA, A. 2006. A successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fert. Ster.* 85(1):108-111.
31. MANJUNATHA, B.; GUPTA, P.; RAVINDRA, J.; DEVARAJA, M.; NANDI, S. 2009. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced *in vitro*. *The Vet. J.* 179(2):287-291.
32. MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro*-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Repr.* 10(11):3004-3011.
33. MARTÍNEZ, A.G.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI, G. 2002. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *An. Repr. Sci.* 73(1):11-21.
34. MARTÍNEZ, A.G.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. 2006. Cryopreservation of *in vitro*-produced ovine embryos. *Small Rum. Res.* 63(3):288-296.
35. MATSUMOTO, H.; JIANG, J.Y.; TANAKA, T.; SASADA, H.; SATO E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology.* 42(2):139-144.
36. MIYAKE, T.; KASAI, M.; ZHU, S.E.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology.* 40(1):121-134.
37. NEDAMBALE, T.; DINNYE'S, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.; TIAN, X.; YANG, X. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology.* 62(3-4):437-449.
38. NGUYEN, B.X.; SOTOMARU, Y.; TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. 2000. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology.* 53(7):1439-1448.
39. OHBOSHI, S.; FUJIHARA, N.; YOSHIDA, T.; TOMOGANE, H. 1997. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of *in vitro* derived bovine blastocysts. *An. Repr. Sci.* 48(1):27-36.
40. PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotech. Adv.* 14(2):127-149.
41. PALASZ, A.T.; GUSTAFSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GUSTA, L.; LARSSON, B.; MAPLETOFT, R.J. 1997. Vitrification of bovine ivf blastocysts in an ethylene glycosucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology.* 47(4):865-879.
42. PALMA, G. 2008. *Biología de la Reproducción.* 2ª ed. Ed Reprobiotec, Buenos Aires, Argentina. 669p.
43. PARK, S.P.; KIM, E.Y.; KIM, D.I.; PARK, N.H.; WON, Y.S.; YOON, S.H.; CHUNG, K.S.; LIM, J.H. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum. Repr.* 14(11):2838-2843.

44. PARK, S.Y.; KIM, E.Y.; CUI, X.S.; TAE, J.C.; LEE, W.D.; KIM, N.H.; PARK, S.P.; LIM, J.H. 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote*. 14(2):125-131.
45. PILTTI, K.; LINDBERG, H.; AALTO, J.; KORHONEN, H. 2004. Live cubs born after transfer of OPS vitrified-warmed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*). *Theriogenology*; 61(5):811-820.
46. PONTES, J.H.; SILVA, K.; BASSO, A.; RIGO, A.; FERREIRA, C.; SANTOS, G.; SANCHES, B.; PORCIONATO, J.; VIEIRA, P.; FAIFER, F.; STERZA, F.; SCHENK J.; SENEDA, M. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm *Theriogenology*. 74(8):1349-1355.
47. RALL, W.F.; FAHY, G.M. 1985. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313:573575.
48. RALL, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*. 24(5):387-402.
49. RÍOS, G.L.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; ALBERIO, R.H. 2010. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. *An. Repr. Sci.* 118(1):19-24.
50. RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Repr.* 68(1):236-243.
51. RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. 2008. Consequences of *In vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Repr. Dom. An.* 43(4):44-50.
52. RODRÍGUEZ, P.; JIMÉNEZ, C. 2011. Criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot.* 58(2):107-119.
53. SAHA, S.; OTOI, T.; TAKAGI, M.; BOEDIONO, A.; SUMANTRI, C.; SUZUKI, T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*. 33(3):291-299.
54. SARAGUSTY, J.; ARAV, A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Repr.* 141(1):1-19.
55. SERRANO, C.; SIERRA, R.; SÁNCHEZ, J.; RESTREPO, L. OLIVERA, M. 2002. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. *Rev. Col. Cie. Pec.* 15(3):286-292.
56. SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38(2):95-105.
57. STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BRÜNING, K.; WRENZYCKI, C. 2011. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*. 76(8):1433-1441.
58. STROUD, B. 2011. Statistics and data retrieval Committee report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. Disponible desde Internet en: <http://www.iets.org/pdf/December2011.pdf> (con acceso 01/07/2012).
59. TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. 2001. Gel-loading tips as a container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. *J. Repr. Developm.* 47(5):267-273.
60. VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. 1996. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *An. Repr. Sci.* 45(3):191-200.
61. VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. 1997. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*. 47(2):501-509.
62. VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Repr. Developm.* 51(1):53-58.
63. VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.; HELM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. 1999. The effect of media, serum

- and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocyst after open pulled straw (OPS) vitricación. *Theriogenology*. 52(5):939-949.
64. VAJTA G. 2000. Vitricación of the oocytes and embryos of domestic animals. *An. Repr. Sci.* 60-61:357-364.
65. VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 65(1):236-244.
66. VAJTA, G. 2012. Vitricación in human and domestic animal embryology: work in progress. *Repr., Fert. Developm.* Disponible desde Internet en: <http://dx.doi.org/10.1071/RD12118> (con acceso el 01/07/2012).
67. VARAGO, F.; SALIBA, W.; ALVIM, M.; VASCONCELOS, A.; OLIVEIRA, C.; STAHLBERG, R.; LAGARES, M. 2006. Vitricación of *in vitro* produced Zebu embryos. *An. Repr.* 3:353-358.
68. VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAERT, V.; VAN ROSENDAAL, E.; VANDERVORST, M.; BOLLEN, N.; ZECH, H.; MUKAIDA, T.; TAKAHASHI, K.; SCHOYSMAN, R.; 2002. Births after vitricación at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitricación. *Hum. Repr.* 17:744-751.
69. VAN WAGTENDONK DE-LEEIJW, A.M.; DEN-DAAS, J.H.G.; RAIL, W.F. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitricación and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*. 48(7):1071-1084.
70. VIEIRA, A.D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J.L. 2007. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitricated in hand-pulled glass micropipettes. *An. Repr. Sci.* 99(3-4):377-383.
71. VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.P.F.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.; NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*. 57(1):345-359.
72. WALKER, D.J.; CAMPOS-CHILLON, L.F.; SEIDEL, G.E. 2006. Vitricación of *in vitro*-produced bovine embryos by addition of ethylene glycol in one-step. *Repr. Dom. An.* 41(5):467-471.
73. WÜRTH, Y.A.; REINDERS, J.M.C.; RALL, W.F.; KRUIP, T.A.M. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*. 42(8):1275-1284.
74. XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNYÉS, A.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F. 2006. Developmental potential of vitricated Holstein cattle embryos fertilized *In vitro* with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.* 89(7):2510-2518.
75. YAVIN, S.; ARAV, A. 2007. Measurement of essential physical properties of vitricación solutions. *Theriogenology*. 67(1):81-89.
76. YU, X.L.; DENG, W.; LIU, F.J.; LI, Y.H.; LI, X.X.; ZHANG, Y.L.; ZAN, L.S. 2010. Closed pulled straw vitricación of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 73(4):474-479.
77. ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology*. 38(1):35-42.

Recibido: Marzo 9 de 2012

Aceptado: Octubre 1 de 2012

# INDUCCIÓN *IN VITRO* DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA CON HEPARINA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS BRAHMAN Y GYR

## *IN VITRO* INDUCTION WITH HEPARIN OF ACROSOME REACTION IN FROZEN BRAHMAN AND GYR BULLS SEMEN

José Montes<sup>1</sup>, María Torres<sup>2</sup>, Clara Rugeles<sup>3</sup>, Roberto Almanza<sup>4</sup>, José Guimarães<sup>5</sup>

<sup>1</sup>MVZ, estudiante de maestría, Universidad Federal de Viçosa, Brasil, zecave@live.com; <sup>2</sup>MVZ, estudiante de maestría, Universidad de Córdoba, Colombia, torresmariaelena2@hotmail.com; <sup>3</sup>MVZ, M.Sc. Profesora Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Colombia, crugelespint@yahoo.es; <sup>4</sup>MVZ, profesional particular, Colombia; <sup>5</sup>MV, Ph.D. Profesor Universidad Federal de Vicoso, Brasil, jdguima@ufv.br

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 431 - 436, 2012

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta del semen congelado-descongelado de toros Brahman y Gyr a la inducción de la reacción acrosómica *in vitro* con heparina y su uso como prueba complementaria, para predecir la fertilidad del semen congelado-descongelado. Fueron usados siete toros cebuínos (4 Brahman y 3 Gyr), sexualmente maduros. En la evaluación seminal posdescongelación, se evaluó la Motilidad Progresiva Individual Rápida (MPIR), Anormalidades Primarias (AP), Anormalidades Secundarias (AS), Anormalidades Totales (AT) y porcentaje de inducción de la Reacción Acrosómica (RA). La RA fue determinada sobre extendidos con eosina-nigrosina, mediante microscopía óptica a 100X. No hubo diferencia entre las dosis seminales de ambas razas para la MPIR, morfología espermática y RA ( $p > 0.05$ ), con excepción de las AP, donde la raza Brahman evidenció menor porcentaje de defectos que la raza Gyr ( $p < 0.05$ ). El valor obtenido para las Tasas de No Retorno (TNR) fue de  $79,4 \pm 1,4\%$ ; sin embargo, no se observó asociación entre la evaluación de calidad seminal (MPIR, AP, AS, y RA) con las TNR de los toros ( $p < 0.05$ ). Los resultados de este estudio indican que la técnica de inducción de RA puede ser empleada como una prueba complementaria en la evaluación de rutina del semen congelado bovino; no obstante, de forma aislada no es eficaz en predecir el potencial fecundante del semen criopreservado.

Palabras clave: Acrosoma, inductor, capacitación, fertilidad.

### SUMMARY

The aim of this study was to value the *in vitro* induction by heparin of acrosome reaction in frozen semen from

Brahman and Gyr bulls, as a method to estimate frozen semen fertility. Seven sexually mature Zebu bulls (4 Brahman and 3 Gyr bulls) were used in this study. In a post-thawing seminal assessment the progressive rapid individual motility (MPIR), primary abnormalities (AS), secondary abnormalities (AP), total abnormalities (AT) and percentage of acrosome reaction induction (RA) were studied. Acrosome reactions were determined on a glass microscopic slide with eosine-nigrosine stain and examining under 100X magnification, using optical microscopy. There was no difference between the seminal doses for both races in the MOTP, spermatic morphology and RA ( $p < 0.05$ ), however AP made an exception, indicating that the Brahman type presented a lower percentage of defects than the Gyr type ( $p > 0.05$ ). No correlation was observed between semen quality assessment (MPIR, AS, AP, AT and RA) and the non-return rate of the bulls ( $p < 0.05$ ). The results indicate that RA technique can be used as complementary test in the seminal routine assessment of frozen bovine semen; however, alone it is no effective in predicting the fertilizing potential of cryopreserved semen.

Key words: Acrosome, inductor, capacitation, fertility.

### INTRODUCCIÓN

El análisis de calidad seminal representa una valiosa herramienta para evaluar el potencial fecundante de los machos de diferentes especies y complementa la valoración física del animal (Bissonnette *et al.* 2009). En programas de inseminación artificial, como en los programas de selección y de mejoramiento genético de los reproductores, la identificación de los toros fértiles es fundamental y, por ello, se aplican distintos métodos, que sugieren correlación positiva con el criterio de fertilidad del semen (Ax & Lenz, 1986;

Bissonnette *et al.* 2009). Tradicionalmente, la movilidad, la concentración y la morfología espermática han sido los parámetros más usados dentro de la evaluación de la calidad seminal (Sutkeviciene *et al.* 2009); sin embargo, el valor predictivo de la fertilidad es limitado, debido a la complejidad del espermatozoide y del proceso de fecundación (Costa *et al.* 2010).

La constante búsqueda de una prueba altamente correlacionada con la fertilidad de los reproductores, ha permitido tener a disposición distintas alternativas para medir la calidad seminal, a pesar que no exista una única técnica capaz de predecir, con gran precisión, la fertilidad de un toro (Rodríguez-Martínez *et al.* 1997). Las técnicas de laboratorio, para confirmar la calidad espermática, incluyen parámetros relacionados con la integridad de estructuras, como el acrosoma, la membrana celular, la mitocondria, el DNA genómico y parámetros dinámicos, como la movilidad hiperactivada, así como la interacción entre el espermatozoide y el ovocito (Bissonnette *et al.* 2009). La variabilidad en los resultados puede estar relacionada con los diversos factores que intervienen en el proceso de fecundación (Hammerstedt *et al.* 1990), como es el caso de la capacitación espermática y la reacción acrosómica (RA). Durante la capacitación espermática, los espermatozoides son activados por moléculas del aparato reproductivo de la hembra, adquiriendo un batido del flagelo más vigoroso y una mayor amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (Yanagimachi, 1994; Olivera *et al.* 2006). Después del proceso de capacitación, el espermatozoide llega a la zona pelúcida y experimenta la RA, caracterizada por la exocitosis de las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma, que facilitan la penetración del ovócito por el espermatozoide (Parrish *et al.* 1988; Yanagimachi, 1994).

Estos eventos son desencadenados *in vitro*, mediante la adición de agentes capacitantes, como la heparina (Yang *et al.* 1993), que producen efectos químicos, desestabilizando y potencializando el espermatozoide, la fusión de las membrana y la RA (Miller *et al.* 1990; Risopatrón *et al.* 2005). La heparina es un glicosaminoglucano (GAGs) presente en el fluido oviductal, que estimula la capacitación espermática y, a medida que se acerca la ovulación, su concentración aumenta. Además de inducir la capacitación de los espermatozoides, la heparina mejora las tasas de fecundación *in vitro* en bovinos (Gliedt *et al.* 1996; Méndez *et al.* 2003). Según Ax & Lenz (1986), los espermatozoides de toros con alto índice de fertilidad tienen más RA en respuesta a sustancias, como la heparina, debido a que poseen más afinidad a los GAGs. Considerando la RA como prerrequisito para una normal fecundación, la eficacia del número de espermatozoides que sufren RA, se espera que influya el potencial fecundante de un reproductor (Birck *et al.* 2010). Whitfield & Parkinson (1995) destacan la

importancia de establecer la relación entre la RA *in vitro* de los espermatozoides de semen descongelado con la fertilidad y el uso de agentes inductores, como la heparina y cómo se puede aplicar para observar alteraciones estructurales de los espermatozoides y como prueba de fertilidad de los reproductores. En respuesta al aumento de la demanda en programas de mejoramiento de empresas ganaderas por la correcta identificación de toros fértiles (Birck *et al.* 2010), se hacen necesarias pruebas complementarias de evaluación seminal, que permitan mejorar la eficiencia reproductiva.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta del semen congelado-descongelado a la inducción de la RA con heparina y su uso como prueba complementaria, para predecir la fertilidad del semen congelado-descongelado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad de Córdoba, localizado en Ciénaga de Oro, Córdoba, Colombia, con una temperatura promedio de 29°C, 80% de humedad relativa, precipitación anual de 1200 mm, posición geográfica determinada entre los 8°45'27" de latitud Norte y 75°53'24" de longitud Oeste. Fueron usados siete toros cebuínos (4 Brahman y 3 Gyr), sexualmente maduros. En la evaluación seminal posdescongelación, se evaluó la movilidad progresiva individual rápida (MPIR) y el porcentaje de anomalías mayores (AP), menores (AS) y totales (AT). Para la evaluación de MIRP, se colocaron 20µL de semen sobre un portaobjetos y se cubrió con una laminilla, para posterior observación en el microscopio, con objetivo de 40X. La morfología espermática fue evaluada sobre un extendido en portaobjeto, a partir de la mezcla de 20µL de semen y 20µL de eosina. Para ello, se contaron 200 espermatozoides en el microscopio, con un objetivo de 100X, anotando las diferentes anomalías encontradas. Para el proceso de inducción de RA, se aplicó la metodología propuesta por Whitfield & Parkinson (1992). El semen fue descongelado a 37°C en baño maría, vertido en un tubo cónico de 15mL y centrifugado a 320 gravedades (g), durante 10 minutos; luego, el sobrenadante se descartó y los espermatozoides se resuspendieron en 5mL de solución TALP y, nuevamente, se centrifugó por 10 minutos, a 320g. El sobrenadante fue descartado y al precipitado, se le adicionaron 0,5mL de solución TALP. Para obtener una concentración final de espermatozoides 20 x 10<sup>6</sup>/mL, se realizó una dilución 1:40 de la solución anterior con agua destilada y se contaron los espermatozoides en cámara de Neubauer. La solución obtenida (Spz + TALP) fue repartida en cuatro viales de 1mL cada uno, agregando 10µg de heparina/vial a dos viales, mientras que los restantes, sin heparina, se consideraron como controles. Inmediatamente, todos los tubos fueron incubados a 37°C

durante una hora y cumplido este período, se adicionaron 50µL de formalina 10%, a cada una de las muestras. Para la lectura, se realizaron extendidos en portaobjetos, a partir de la mezcla de 20µL de la solución anterior, con 20µL de eosina-nigrosina. La respuesta a la inducción de la RA, se valoró en microscopía de luz, con objetivo de 100x, teniendo en cuenta la diferencia de los porcentajes obtenidos de las muestras incubadas con heparina y las muestras control y expresando los resultados, de acuerdo a una escala de 0 a 100%. En el análisis estadístico fue usado el programa SAEG-9.1 (UFV, 2007), siendo obtenidas las medias y la desviación estándar para todas las variables y fueron realizados las pruebas de Lilliefors y Cochran y Bartlett para verificar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas, respectivamente, no siendo necesaria la conversión de los datos de ningún parámetro estudiado. El análisis de varianza fue realizado para verificar el efecto entre raza, toro y dosis de heparina y cuando mostraron efecto significativo por el test F, se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey, con 5% de probabilidad de error. Para el análisis de las tasas de no retorno (TNR), los datos fueron agrupados en tablas de contingencia y, posteriormente, evaluados por el análisis de Chi-cuadrado, con probabilidad de 5% de error.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios obtenidos de MPIR, AP y AT para los toros de raza Brahman y Gyr usados en este estudio fueron  $77,1 \pm 2,5\%$ ,  $0,42 \pm 0,6\%$  y  $17,1 \pm 3,5\%$ , respectivamente (Tabla 1). Estos resultados, se muestran satisfactorios para las características seminales posdescongelación, divulgadas por la Society for Theriogenology (Chenoweth *et al.* 1993) y el Colegio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry & Neves, 1998), siendo animales maduros sexualmente y usados rutinariamente como reproductores, aptos para congelación de semen. En el análisis de los datos, no se observó diferencias estadísticas entre las dosis seminales de ambas razas para estas características ( $p > 0.05$ ), con excepción de las AP, donde la raza Brahman presentó menor porcentaje

de defectos que la raza Gyr ( $p < 0.05$ ). Palmieri *et al.* (2004) usaron semen fresco de toros criollos Romosinuano y Costeño con cuernos y no hallaron diferencias estadísticas para la MPIR y las AT, entre ambas razas ( $p > 0.05$ ). Siqueira *et al.* (2007), evaluando la calidad seminal del semen congelado-descongelado de toros Nelore, encontraron valores menores para MPIR ( $53,38 \pm 11,9\%$ ), y superiores en AP de  $12,48 \pm 5,7\%$  y AT de  $17,44 \pm 6,08\%$  comparados con los resultados de este estudio. Estos autores resaltan que los resultados de evaluaciones macroscópicas dependen de varios factores, como el medio utilizado para diluir el semen, las tasas de dilución, la temperatura y el tiempo de realización, durante la evaluación. Sumado a lo anterior, es necesario considerar que el espermatozoide es una célula compleja, que envuelve factores bioquímicos y morfológicos y que se puede tornar no funcional, cuando alguno de ellos es afectado. Por lo anterior, para realizar un diagnóstico de la funcionalidad e integridad del espermatozoide es necesaria la combinación de varios factores en un análisis multifactorial (Melo & Henry, 1999), a pesar de que la evaluación convencional contempla características más fáciles de evaluar, como la movilidad, la morfología y la concentración espermática.

La inducción de RA, como técnica *in vitro* de evaluación de calidad seminal, contribuye a los exámenes tradicionales, al considerar características morfológicas y funcionales de los espermatozoides (Obando & Holguín, 2003). En este estudio, la respuesta a la inducción de la RA en toros Brahman y Gyr, usando concentración de heparina de 10µg, fue elevada ( $p < 0.05$ ), al considerar la diferencia con las muestras que fueron incubadas sin heparina (control), mostrando el efecto del inductor utilizado. El resultado obtenido de porcentaje de RA, se muestra inferior a los observados por Palmieri *et al.* (2004) y Whitfield & Parkinson (1995) (Tabla 1). Estos resultados, se pueden deber a que en los procedimientos utilizados por estos autores, las muestras fueron incubadas con heparina, durante un período de seis horas, ya que de acuerdo con Parrish *et al.* (1988), un mayor tiempo de incubación de los espermatozoides

Tabla 1. Movilidad progresiva individual rápida y morfología espermática del semen postdescongelación, según raza.

Variable	BRAHMAN (X ± DE)	GYR (X ± DE)	Media General
MPIR	$76,9 \pm 2,5^a$	$77,5 \pm 2,6^a$	$77,1 \pm 2,5$
AS	$17,1 \pm 3,2^a$	$16,1 \pm 3,5^a$	$16,7 \pm 3,3$
AP	$0,1 \pm 0,3^a$	$0,8 \pm 0,7^b$	$0,42 \pm 0,6$
AT	$17,2 \pm 3,1^a$	$17,0 \pm 3,9^a$	$17,1 \pm 3,5$
%RA	$85,7 \pm 4,9^a$	$81,7 \pm 7,3^a$	$83,7 \pm 6,1$

<sup>a, b</sup> Medias con diferentes letras en la misma columna difirieron (Tukey,  $p < 0.05$ ); MPIR: Movilidad individual rápida progresiva; AS: anomalidades menores; AP: anomalidades mayores; AT: anomalidades totales.

con heparina, incrementa la tasa de fecundación. Obando & Holguín (2003), al trabajar con toros de raza Brahman y Sanmartinero, al igual que Siqueira *et al.* (2007) con toros de raza Nelore, reportan resultados inferiores de 32,8% y 9,85%, respectivamente, valores bajos que se pueden deber que no se utilizó ningún inductor. Costa *et al.* (2010), usaron heparina y lisofosfaditilcolina, como inductores de RA, como parámetro para estimar la producción *in vitro* (PIV) de embriones Nelore y observaron que los tratamientos en los que usaron heparina mostraron mayor porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados que los tratamientos con lisofosfatidilcolina y control, demostrando ser un eficiente inductor de RA ( $P < 0.01$ ). En un estudio realizado por Januskauskas *et al.* (2000), la heparina fue comparada con otro GAG, el ácido hialurónico, para evaluar el potencial fecundante de semen congelado-descongelado de toros Sueco Rojo y Blanco, observando que la heparina incrementó la frecuencia de capacitación y RA en los espermatozoides, mientras que el ácido hialurónico no tuvo ningún efecto capacitante.

En la tabla 2, se observan los valores obtenidos para las TNR, los cuales, fueron de  $79,4 \pm 1,4\%$  y  $72,6 \pm 8,9\%$ , para las razas Brahman y Gyr, respectivamente, sin hallar diferencia entre las medias para ambas razas ( $p > 0.05$ ). En el análisis de correlaciones no se encontró una asociación entre la MPIR y las TNR, al igual que la asociación entre el %RA y TNR; entre las AT y las TNR, se observó correlación negativa ( $-0,29$ ;  $p > 0,05$ ). Freneau (2011) destaca la morfología espermática como factor rutinario más importante en la evaluación de un toro, por su relación con la fertilidad, además de estar relacionada con los procesos de pubertad y de madurez sexual, lo que no coincide con nuestros resultados, debido a la variabilidad de factores que influyen en la fertilidad. Los valores de TNR de los toros Brahman y Gyr de este estudio fueron superiores a los obtenidos por Whitfield & Parkinson (1992), quienes reportan valores entre 62,1 y 76,1% de TNR, a los 90 días, utilizando semen congelado-descongelado de toros Holstein; así mismo Siqueira *et al.* (2007) encontraron  $63,8\% \pm 13,7$  de tasa de gestación con toros Nelore criados a campo.

Correa *et al.* (1997) demuestran que no existe diferencia entre la MPIR de semen congelado-descongelado de toros

con alta y baja fertilidad, similar a los resultados de este estudio, donde no se halló correlación entre los valores de MPIR y TNR. Siqueira *et al.* (2007) hallaron correlación negativa ( $-0,22$ ) con semen de toros Nelore, verificando que las muestras de semen de motilidad más alta post-descongelación no fueron las relacionadas con las tasas de preñez más altas; ello se puede dar a daños en estructuras, como el acrosoma, lo que puede representar la infertilidad de espermatozoides con alta motilidad espermática, posterior a la congelación. La correlación negativa entre las AT y las TNR obtenida ( $0,29$ ;  $p > 0,05$ ), es similar a la observada por Siqueira *et al.* (2007) ( $-0,11$ ), quienes trabajaron con toros Nelore. De igual forma, Correa *et al.* (1997), evaluando semen congelado-descongelado de toros Holstein, hallaron asociación entre el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad ( $0,59$ ).

La asociación observada entre el porcentaje de RA y las TNR de los toros estudiados, no fue significativa ( $p > 0.05$ ), contrario a los hallazgos de Whitfield & Parkinson (1992), quienes trabajando con toros de raza Holstein hallaron una correlación de  $0,81$  ( $p < 0.01$ ). Posteriormente, estos mismos autores, usando ionóforo de calcio (A23187), como inductor, encontraron nuevamente asociación entre la RA y las TNR ( $r = 0.86$ ;  $p < 0.01$ ) (Whitfield & Parkinson, 1995). Los resultados obtenidos en este estudio, se pueden deber a que la tasa de gestación depende más de la influencia de otras variables externas y algunas poco controlables, como el ambiente, manejo reproductivo, alimentación, estado sanitario, reproductivo y fisiológico de las hembras, que de la reacción del acrosoma de los espermatozoides del macho cebuino en trópico bajo. Es de anotar que aunque no se evidenció asociación entre las TNR y los porcentajes de inducción de RA en los toros Brahman y Gyr de este estudio, se observa que la heparina se comporta como un excelente inductor, permitiendo respaldar las pruebas de uso rutinario en los laboratorios de evaluación de semen congelado-descongelado. Según Salvador *et al.* (2001), existe la posibilidad que los estudios que evalúan el potencial de fecundación de los espermatozoides, como la inducción de RA, sean exámenes complementarios a las pruebas andrológicas de rutina, principalmente, en la selección de toros superiores o sometidos a altos desafíos de cruzamiento en campo.

Tabla 2. Tasa de no retorno al estro de las vacas sometidas a inseminación artificial con semen de los toros, de acuerdo a la raza.

Raza	% TNR (X $\pm$ DE)
BRAHMAN	$79,4 \pm 1,4^a$
GYR	$72,6 \pm 8,9^a$

TNR: Tasa de no retorno al estro; X: media; DE: desvío estándar. <sup>a</sup> = Medias seguidas por letras minúsculas iguales en la misma columna no difieren entre sí ( $P < 0.05$ ) por el test de Chi-cuadrado.

Es así, como los resultados del presente estudio demuestran que la técnica *in vitro* de inducción de reacción acrosómica con heparina puede ser empleada como una prueba complementaria en la evaluación de rutina del semen congelado bovino; sin embargo, de forma aislada no es eficaz en predecir el potencial fecundante del semen criopreservado.

**Agradecimientos.** Con gran estimación, los autores manifiestan los agradecimientos a la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba y a la firma comercial Abastecedora. **Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

- AX, R.L.; LENZ, R.W. 1986. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J. Dairy Sci.* 70(7):1477-1486.
- BIRCK, A.; CHRISTENSEN, P.; LABOURIAU, R.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S. 2010. In vitro induction of the acrosome reaction in bull sperm and the relationship to field fertility using low-dose inseminations. *Theriogenology* 73:1180-1191.
- BISSONNETTE, N.; LE´VESQUE-SERGERIE, J.P.; THIBAUT, C.; BOISSONNEAULT, G. 2009. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction* 138:65-80.
- CHENOWETH, P.J.; HOPKINS, F.M.; SPITZER, J.C.; LARSEN, R.E. 1993. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. In: *Theriogenology Handbook*. p.B-10.
- CORREA, J.R.; PACE, M.; ZAVOS, P. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*. 48:721-731.
- COSTA, M.Z.; OLIVEIRA, L.Z.; RESENDE, M.V.; LÚCIO, A.C.; PERINI, A.P.; MIGUEL, M.C.V.; LIMA, V.F.M.H. 2010. Induction of the acrosome reaction test to in vitro estimate embryo production in Nelore cattle. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 (4):771-777.
- FRENEAU, G.E. 2011. Aspectos da morfologia espermática em touros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35, (2):160-170.
- GLIEDT, D.W.; ROSENKRANS, C.F.; RORIE, R.W.Jr.; RAKES, J.M. 1996. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *J Dairy Sci.* 79:532-535.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
- HENRY, M.; NEVES, J. Eds. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 49p.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SO´DERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2000. Relationship between sperm response to glycosami-noglycans in vitro and non-return rates of Swedish dairy AI bulls. *Reprod Dom Anim.* 35 (5):207-212.
- MELO, M.; HENRY, M. 1999. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(1):71-78.
- MÉNDEZ, J.JR.; BURNS, P.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.; SEIDEL, G.JR. 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology.* 60(2):331-340.
- MILLER, D.; WINER, M.; AX, R. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol.Reprod.* 42:899-915.
- OBANDO, H.; HOLGUÍN, N. 2003. Inducción de la reacción acrosómica in vitro, como prueba de fertilidad del semen bovino. *ICA Informa.* 30(1):42-46.
- OLIVERA, M.; RUIZ, T.; TARAZONA, A.; GIRALDO C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc. Pec.* 19(4):426-436.
- PALMIERI, A.; SUÁREZ, D.; GONZÁLEZ, M.; ESPITIA, A. 2004. Variables seminales en toros criollos colombianos Costeño con cuernos y Romosinuano. *MVZ Córdoba.* 9(1):381-385.
- PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.; FIRST, N. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38:1171-1180.

19. RISOPATRÓN, J.; CATALÁN, S.; SEPÚLVEDA, N.; SÁNCHEZ, R. 2005. Efecto de diferentes concentraciones de heparina sobre la capacitación espermática in vitro en canino. *Rev. Cient. Vet. FCV-LUZ*, 16:6.
20. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B.R.; SÖDERQUIST, L. 1997. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod. Develop.* 43:1-11.
21. SALVADOR, D.; ANDRADE, V.; VALE FILHO, V. 2001. Potencial das proteínas do plasma seminal ou ligadas à membrana espermática como indicador da fertilidade de touros. *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia.* 35:61-71.
22. SIQUEIRA, J.; GUIMARÃES, J.; DA COSTA, P.; HENRY, M.; TORRES, C.; SILVA, M.; SILVEIRA, T. 2007. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. *Rev. Bras. Zoot.* 36 (2):387-395.
23. SUTKEVICIENE, N.; RISKEVICIENE, V.; JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H.; ANDERSSON, M. 2009. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Vet. Scand.* 51:53.
24. UNIVERSIDAD FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. 2007. *Sistemas de Análisis Estadísticos y Genéticos – SAEG.* (Versión 9.1). Viçosa, Brasil.
25. WHITFIELD, C.; PARKINSON, T. 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology.* 44:413-422.
26. WHITFIELD, C.; PARKINSON, T. 1992. Relationship between fertility of bovine semen and In vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology.* 38:11-20.
27. YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil, E.; Neill, J. (Eds). *The physiology of reproduction.* Ed. Raven Press (New York). p.189-317.
28. YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Develop.* 34(1):94-100.

Recibido: Junio 27 de 2012

Aceptado: Octubre 4 de 2012

# ANÁLISIS DE INTERESES AMBIENTALES MEDIANTE LÓGICA DIFUSA EN LA RESERVA FORESTAL REGIONAL DEL NORTE DE BOGOTÁ-COLOMBIA

## ANALYSIS OF ENVIRONMENTAL CONCERNS THROUGH FUZZY LOGIC: IF REGIONAL FOREST RESERVE IN THE NORTH OF BOGOTÁ-COLOMBIA

Adriana Posada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Economista Agrícola, Esp. Gestión Social y Ambiental. M.Sc. Planeación Urbana y Regional. Docente Facultad Ingeniería Geográfica y Ambiental, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Calle 222 No. 55-37, Bogotá, Colombia. [aposada@udca.edu.co](mailto:aposada@udca.edu.co)

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 437 - 446, 2012

### RESUMEN

En Bogotá, Distrito Capital de Colombia, a pesar de ocurrir una expansión urbana, que sin considerar las condiciones naturales, se declaró como reserva forestal regional a una zona en el norte de la ciudad, en límites con otros municipios, que están respondiendo, paulatinamente, a la alta demanda de vivienda. La existencia de esta reserva forestal, en medio de la presión de los urbanizadores, ha generado un conflicto de intereses, durante más de una década. El conflicto se profundiza, ya que, por una parte, la información sobre los intereses reales de los diferentes grupos es imprecisa y volátil y, por otra, las acciones sobre el uso, el manejo y la ocupación del suelo, se deben definir y llevar a cabo, por parte de los entes encargados. Con el fin de aportar datos para observar esta situación, se adelantó una investigación, que tuvo como resultado la aplicación de una metodología alternativa, para establecer los intereses ambientales respecto a la reserva. La lógica difusa es el método que mejor se ajusta al análisis de intereses ambientales, en tanto, permite flexibilidad en las mediciones de las respuestas y amplía el horizonte de la gestión socioambiental, considerando diversos grupos de trabajo, para poder desarrollar un plan de manejo ambiental, más acertado en zonas de alta complejidad.

Palabras clave: Intereses ambientales, expansión urbana, conflicto ambiental.

### SUMMARY

In Bogotá, capital of Colombia, due to its urban expansion, which does not consider the natural conditions, a regional

forest reserve in the northern area of the city, limiting with other municipalities that are gradually responding to the high demand for housing, was declared. The existence of this forest reserve in the midst of pressure of housing development has created a conflict of interest for over a decade. The conflict deepens since, on one hand, the information about the real interests of the different groups is imprecise and volatile and on the other one, actions on the use, management and land use must be defined and carried out by the responsible authorities. In order to provide data to monitor this situation, a research project was carried out, resulting in the implementation of an alternative methodology to establish the environmental concerns with respect to the reserve. Fuzzy logic is the method best suited to the analysis of environmental concerns, insofar as it allows flexibility in the measurements of responses and expands the horizon of the socio-environmental action, taking into account various working groups, in order to develop a more successful environmental management plan in areas of high complexity.

Key words: Environmental concerns, urban sprawl, environmental conflict.

### INTRODUCCIÓN

Colombia, se caracteriza por ser un país heterogéneo en su geografía, con diferentes niveles de desarrollo regional y con condiciones culturales y sociales diversas (DNP, 2010). Su capital, Bogotá, de acuerdo con la Alcaldía Mayor (2012), registra una población de 7.467.804 habitantes, que representan el 16% de la población de la Nación; la alta tasa de crecimiento ha generado una ocupación de 36.364ha, de

las 38.431 del suelo urbano, a un ritmo de 326ha/año, logrando una densidad poblacional de 19.388 hab./km<sup>2</sup> y una densidad habitacional de 5.354 viviendas/km<sup>2</sup>. Este proceso refleja un cambio en la concepción del valor de la tierra, en el que se ha privilegiado la urbanización sobre otros tipos de usos del suelo, como la agricultura o la conservación. Esta condición, se evidencia en la zona norte de Bogotá, donde, según Acevedo *et al.* (2000), debido a las características particulares de sus geoecosistemas y a su papel en la dinámica del sistema ecológico regional, el impacto de las decisiones de expansión es mayor que en cualquiera otra de las zonas de expansión autorizadas.

El IEU (2011) informó que, en el 2000, por falta de concertación entre la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR y el gobierno distrital, respecto al Plan de Ordenamiento Territorial de Bogotá, el Ministerio de Medio Ambiente expidió la Resolución 475, por medio, de la cual, ordenó a la CAR delimitar y desarrollar el Plan de Manejo, de la que se denominó "Reserva Forestal Regional del Norte de Bogotá" (RFRNB); no obstante, la sentencia, la declaración de esta reserva, se interrumpió por más de una década, debido a la objeción de grupos sociales de interés, de los cuales, según el IEU (2011), se destacan, por una parte, los intereses de quienes insisten en que esta zona se debe dedicar a la expansión urbana y, por la otra, los intereses de los que creen que debe ser una zona de conectividad y de protección de la estructura ecológica principal. Algunos investigadores, como Ardila (2009), explican que la demora en la declaratoria de la RFRNB es un ejemplo de los conflictos interinstitucionales y de las complejidades surgidas entre las acciones de gobierno y la dinámica social y política, en la cual, los juegos de intereses determinan la dirección de los procesos, aún a costa de acuerdos concretados en la normatividad.

En el enfoque de Carrizosa (2006), la sostenibilidad integral potencial es una característica de la totalidad de un territorio, que plantea la necesidad de construir metodologías capaces de estudiar complejamente esa totalidad. En esa tendencia, ve la necesidad de considerar que sus objetivos surgen de percepciones individuales sobre las prioridades del ambiente y la sostenibilidad. Es aquí, donde se requiere aplicar la metodología que ofrece la lógica difusa, pues conforme la complejidad de un sistema aumenta nuestra capacidad para ser precisos y construir instrucciones sobre su comportamiento, disminuye hasta el umbral más allá, del cual, la precisión y el significado son características excluyentes (Morales, 2002).

La lógica es la razón, el principio que gobierna al universo (Aznar & Alarcón, 2006). Para D'Negri & De Vito (2006), es un conjunto de reglas usadas para generar inferencias creíbles en el marco del razonamiento exacto, es decir, es una lógica dicotómica o binaria, que admite dos posibilidades: verdadero o falso (1 o 0), mientras que, la lógica difu-

sa (fuzzy logic), es una metodología que proporciona una manera de obtener conclusiones, a partir de información de entrada vaga, ambigua, imprecisa, con ruido o incompleta; esta atenta a la aceptación de la imprecisión en el mundo real, especialmente, en la percepción y en el pensamiento humano; la lógica difusa, se basa en el principio que todo es cuestión de grado. La lógica difusa también es denominada "lógica borrosa". Mediante la lógica borrosa es posible valorar impactos ambientales a partir del conocimiento, generalmente impreciso y subjetivo, de una serie de características que componen la esencia de dichos impactos; empleando técnicas de razonamiento aproximado, se puede traducir la estimación borrosa de cada característica, llevar a cabo la agregación de dichas valoraciones y obtener un valor global del impacto (Peché, 2006). Adicionalmente, como lo expresa Durán (s/f), los sistemas borrosos permiten modelar cualquier proceso no lineal y aprender de los datos, haciendo uso de determinados algoritmos de aprendizaje.

Particularmente, el interés ambiental sobre la RFRNB contiene una incertidumbre de mayor o de menor grado y para obtener precisión al respecto, es necesario analizar la situación como un proceso complejo (no lineal), frente, al cual, no existen modelos absolutos, pero sí es posible admitir valores cuantificando la incertidumbre, lo difuso del interés ambiental. Con base en lo explicado por D'Negri & De Vito (2006), lo que se busca, mediante el empleo de la lógica difusa, es describir y formalizar una realidad, aplicando modelos flexibles que interpretan las leyes del comportamiento humano y las relaciones entre las personas. Para describir tal realidad incierta es necesario valerse de elementos que pueden ser nítidos, pero también difusos. En el caso de la RFRNB, utilizando la lógica difusa, se busca demostrar cómo y porqué el interés ambiental con más peso o con mayor grado de certeza, será el mejor para decidir el camino a seguir.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La aplicación de la lógica difusa, para establecer intereses ambientales, demuestra el paso de métodos tradicionales a alternativos, para obtener conocimiento frente a un caso de complejidad, que amerita contar con información adicional, útil para dirimir con mayor certeza los conflictos socioambientales. Por ello, en primera instancia, se establecieron los nudos críticos de la situación compleja, que están ligados a asuntos de intereses así: Sobre el qué: No hay claridad entre los intereses individuales y los colectivos. Sobre los recursos: Los recursos son los bienes y los servicios ambientales; en este caso, el recurso de mayor interés es el suelo, como soporte de actividades y de ocupación. Sobre el lugar: La zona del conflicto es para unos exclusivamente del distrito y, para otros, por sus características geoecosistémicas, es de la región. Sobre el quién: Los entes más influyentes en las decisiones pueden ser los grupos sociales que habitan

la zona, el D. C., la CAR, la Procuraduría, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Sobre el tiempo: Situación que se mantiene, con sus variantes, data de ayer, es vigente hoy y continúa con tendencias hacia el mañana, pero por la urgencia de lograr armonía ambiental, se convierte en una situación que está en límite sobre el tiempo. De estos intereses, se destacaron como las restricciones más relevantes, las siguientes:

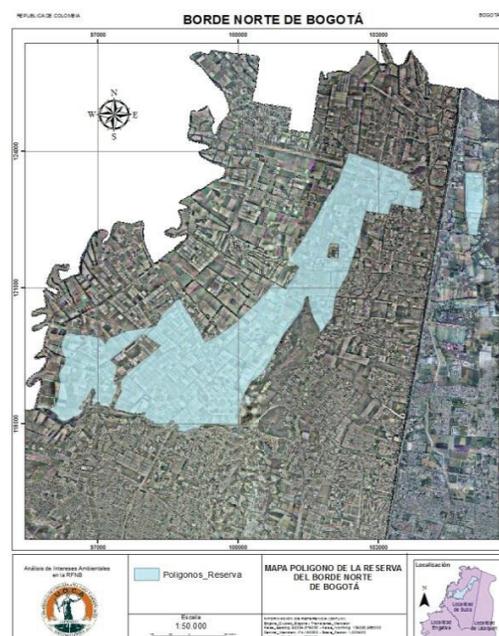
- De autoridad: quién manda a quién en materia ambiental: ¿El Distrito, la Procuraduría General de la Nación, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, la CAR? Y en materia de desarrollo: ¿Planeación Nacional, el Distrito Capital, la Localidad de Suba? Y en cuanto a desarrollo urbano: ¿La Lonja de Propiedad Raíz, la Cámara de Comercio, la Curaduría Urbana? En suma, ¿quién direcciona los aspectos ambientales del desarrollo urbano-regional?
- De aprovechamiento de la renta del suelo: este es el interés de mayor peso, que se expresa en contravía frente a los intereses generales sobre la RFRNB, pues la velocidad de ocupación del suelo para viviendas de estratos altos es lo que predomina en las zonas vecinas a la RFRNB, evidenciando un interés de particulares.
- De tipo espacial: porque el uso, el manejo y la ocupación de la RFRNB impacta positiva o negativamente a toda la Nación y porque la zona está ubicada en coordenadas del Distrito, pero al mismo tiempo, está asociada a toda la región de la sabana (especialmente, con los municipios vecinos de Bogotá), debido a que hace parte de su estructura ecológica principal.

Para trasladar estos interrogantes a la población, el conjunto de la muestra fue el 42% del total del universo, que está representado en personas del interior de la reserva (interesados intrínsecos) y también en su exterior inmediato (interesados extrínsecos), lo que equivale a 65 entrevistados. Para los interesados extrínsecos, se abordaron personas de la zona rural de la Localidad de Suba de Bogotá y a personas en los municipios vecinos de Cota, de Chía, de Cajicá y de Sopó, debido a que el ámbito regional, desde la óptica de los municipios vecinos, permite ver “la otra cara de la moneda”.

Se diseñó una entrevista semiestructurada, con 15 preguntas, que condujeran, gradualmente, hacia la obtención de datos relacionados con las variables del método fuzzy logic. La aplicación de cada entrevista, se georeferenció en la cartografía, obtenida a partir de la aprobación oficial de la RFRNB, por parte de la CAR (2011), quedando el polígono tal como se ubica en el mapa 1, donde se aprecia la zona de estudio.

La entrevista, se diseñó utilizando un flujograma, en el que se concentra la atención en tres preguntas claves, que permiten determinar el interés que existe por la RFRNB, con las siguientes tres variables:

Disponibilidad a agruparse o unión de esfuerzos (UF): La intención y la posibilidad de trabajar en grupo demuestra que, en temas ambientales, “la unión hace la fuerza”; cuando el trabajo es en grupo existe la necesidad de consensuar, de distribuir los esfuerzos y, en este orden de ideas, de “repartir



Mapa 1. Inserción de los datos sobre la declaratoria de reserva forestal de la CAR, en la base SIG del proyecto U.D.C.A (Romero, 2012).

las ganancias”, incluyendo beneficios para personas que no se conocen entre sí y que aún no han nacido. **Disponibilidad de tiempo o temporalidad de las acciones (TDLA):** Gran parte de la convicción sobre lo que se hace está determinada por el tiempo de dedicación que se le asigna a tal acción, por ello, si alguien está verdaderamente interesado en algo, el “invertir” tiempo en su realización pasa a ser un placer. **Disponibilidad a pagar (DAP) o apoyo monetario:** Posada (1997) explica que un mercado es una institución de intercambio, que sirve para desarrollar la actividad económica de la sociedad. Para ello, la valoración contingente es un intento de asignar un valor cuantitativo y monetario a los bienes y a los servicios suministrados por los recursos o sistemas ambientales, sea que se cuente o no, con precios de mercado (Azqueta, 1994). Al respecto, Mendieta (2005) afirma que la valoración contingente, estima cambios en el bienestar económico, derivados de cambios, en los niveles disponibles de calidad y de cantidad ambiental.

En síntesis, si una persona tiene la capacidad de trabajar en grupo, por siempre y, adicionalmente, está dispuesta a pagar para que se cumpla el fin de la RFRNB, está demostrando un interés real y no un interés difuso.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al aplicar la lógica difusa, se abre la posibilidad de entender que existen otras personas interesadas en la RFRNB, pero con vaguedad en su posición; esta vaguedad también cuenta cuando se trata de asuntos ambientales, porque no es obstáculo en la construcción de un mejor futuro, pero sí requieren mecanismos y estrategias para ser potenciados hacia la superación del conflicto ambiental.

Particularmente, para el caso de las posiciones (intereses) de las distintas autoridades, en la tabla 1, se resumen los respectivos argumentos a favor de alguna posición sobre la RFRNB. Se observó, además, que desde la óptica del constructor existe mucho suelo disponible, oferta que al ser cruzada contra la demanda de vivienda, da como resultado una fuerte dinámica en el mercado inmobiliario, añadiendo, como valor agregado, las características ambientales de la zona. En esta situación, el urbanizador aprovecha la demanda de los ciudadanos por contar con lugares “tranquilos y sanos” para vivir y por los que están dispuestos a pagar un excedente, asunto que evidencia el diario El Tiempo (2012), al ofrecer proyectos urbanísticos, ubicados en zona forestal, como ventajas de vivir en las afueras de Bogotá.

Tabla 1. Síntesis de argumentos institucionales respecto a la RFRNB.

ENTE	ARGUMENTOS	A FAVOR DE
Misión (panel) de expertos	Constituye la necesidad más apremiante de la zona, pues permite la conexión de los pequeños parches de bosque entre sí y los flujos de vida entre los cerros orientales y el río Bogotá, asegurando su restauración y conservación en el tiempo	Conectividad ecológica entre los cerros orientales y el río Bogotá (Área Forestal)
Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial	Beneficio ambiental de orden nacional, apoyado por la Resolución 475/2000 y 621/2000	Reserva Forestal Regional del Norte (RFRN)
CAR	A pesar que existe una alta transformación del área (96,4%) frente a la baja presencia de áreas naturales (2,5%), se destaca su gran importancia para Bogotá y la región, en virtud de sus valores de conservación. Acuerdo #011/2011	Reserva Forestal Regional Productora del Norte de Bogotá, D.C. Thomas Van der Hammen.
Procuraduría general de la Nación	Circular #023 del 13 de abril de 2010. La figura jurídica de reserva forestal protectora No refleja la situación real e ideal de la zona y ésta no tiene vocación e importancia ecológica.	Modelo sostenible de desarrollo y de protección de los recursos naturales
Distrito Bogotá	Decretos 619/200, 1110/2000, 469/2003, 190/2004 y 043/2010 (Plan zonal del norte). Es al distrito a quien le corresponde incorporar los esquemas de protección en su territorio, independiente que tengan un carácter regional. El manejo del territorio Bogotano es de potestad del Distrito.  Se destaca el Plan de Desarrollo de Bogotá 2012-2016, “Bogotá Humana”	Clasificación del suelo distrital en: zona de expansión urbana, suelo Rural y suelo de Protección.  Incorporó la Reserva Forestal Regional del Norte de Bogotá Thomas van der Hammen en la política de gestión ambiental.

Antes de aplicar la lógica difusa y con el fin de comparar metodologías, se aplicaron análisis tradicionales para interpretar los resultados de las entrevistas. Al respecto, se pudo constatar que en un porcentaje importante, el interés manifestado por la RFRNB es superficial. En el gráfico 1, se pre-

sentan los resultados distribuidos en proporciones, donde se aprecia que, en términos generales, la mayoría de las personas relacionadas con la zona, no están interesadas en la RFRNB como tal, pues sus intereses son variables, dispersos y poco puntuales al respecto.

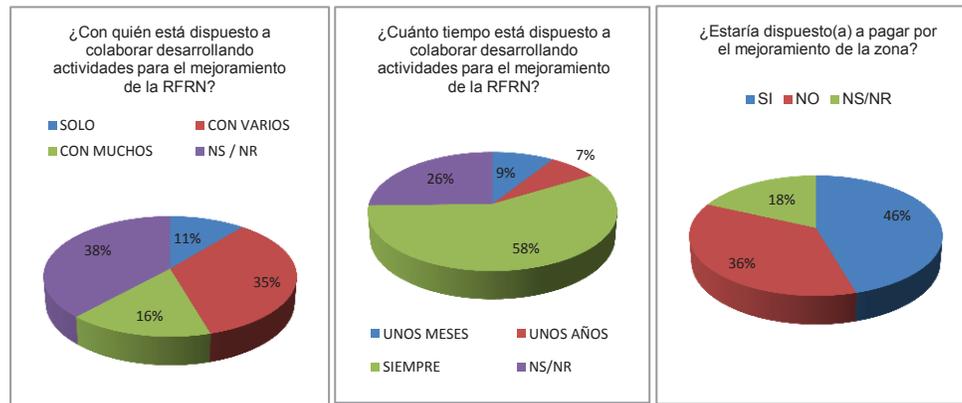


Gráfico 1. Distribución porcentual de las respuestas sobre "Unión de esfuerzos", "Temporalidad de las acciones" y "Disponibilidad a pagar".

Adicionalmente, en el flujograma del gráfico 2, se observa la agrupación de los subconjuntos, según la tipología del interés. Aplicando un sistema de asociación de respuestas, se

obtienen tres subgrupos del total de interesados intrínsecos, un subgrupo de interés sobre la RFRNB, otro de interés difuso y otro de interés real. Con este sistema, se inicia la demostración del interés por la RFRNB.

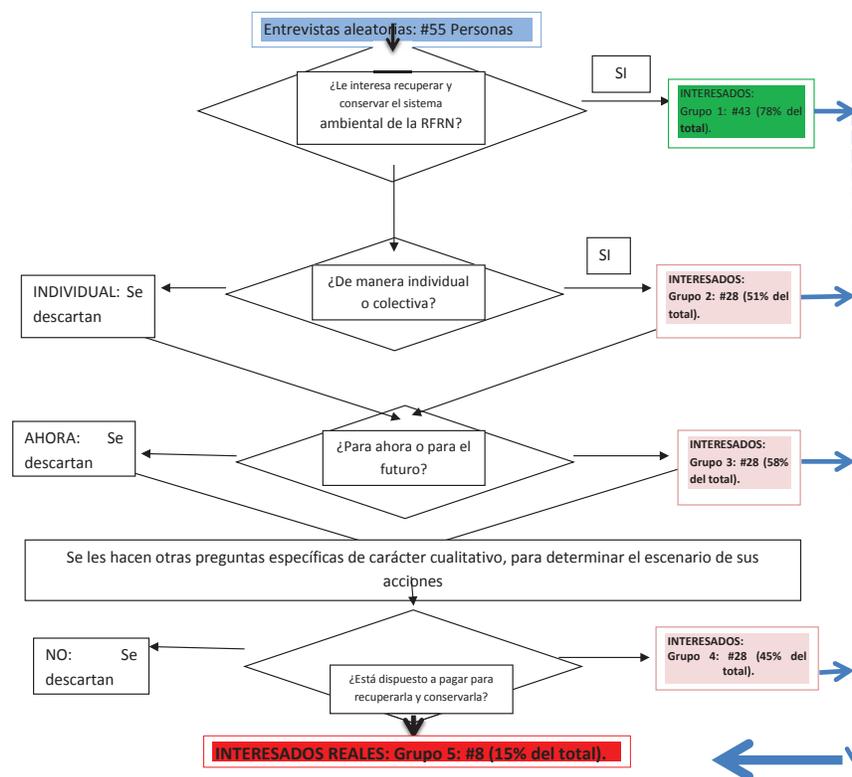


Gráfico 2. Flujograma de conjuntos (difusos y real) de interés en la RFRNB.

El resultado que se observa en el gráfico 3, no es sorprendente; para muchos podría significar que un 15% de interés real en la RFRNB es bajo, pero en realidad es una cifra considerable, pues si se aplicara este mismo ejercicio en otro lugar de Bogotá, de Colombia o del mundo, la cifra podría ser menor, debido a que las personas, en su mayoría, no tienen un interés ambiental claro y real sobre su entorno.

Desde otro ángulo, el hecho de demostrar que un 15% de la población cuenta con un interés real sobre la RFRNB, se interpreta como una ganancia, porque se está evidenciando que en esta zona SÍ existen personas con quienes contar, para tejer un mejor futuro, no solamente para ellos, sino para el colectivo.

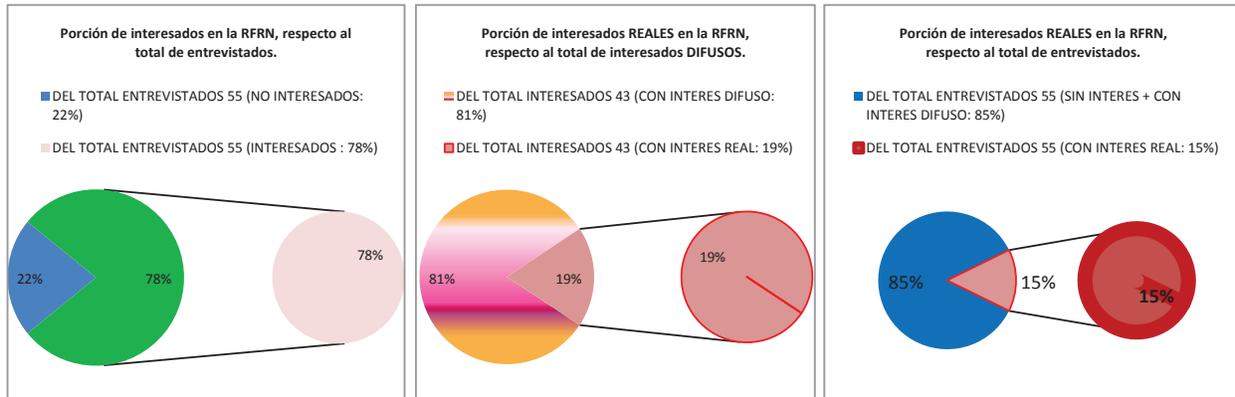


Gráfico 3. Proporciones de los subconjuntos de interesados difusos y reales en la RFRNB.

En el enfoque de Posada Arrubla (2009), el interés existe en la media en que haya conveniencias e inclinaciones; los intereses tienen que ver con la manera de ser, íntima de las personas; tal como piensan y sienten, así son sus intereses; tal como piensa y siente la sociedad, así son sus intereses. Por ello, una sociedad sin formación y sin sentido ambientalista es probable que no tenga algún interés, por lo que está relacionado con el ambiente. La noción de interés, se acerca a lo que se entiende por valor y todo valor surge a partir de un proceso educativo, por ello, lo que se debe entender es la introyección (asimilación) de los valores ambientales de las personas interesadas en el potencial ambiental, de una zona específica.

Al respecto, explica Pérez (2002), que la problemática de los intereses difusos es poder determinar si se trata de una simple suma de intereses individuales o si es una posición de ventaja unitaria o bien, una intermediación entre las dos anteriores. Por ello, la difusión de un interés, se atribuye a un grupo más o menos determinado o indeterminado de sujetos particulares y los intereses son intereses privados de dimensión colectiva.

**Resultados mediante lógica difusa:** Este método es más tolerante que el tradicional, frente a la clasificación de los intereses de las personas para trabajar en pro de una reserva, considerando que cada persona maneja un alto grado de imprecisión respecto a sus intereses particulares y, más incierto, respecto a sus intereses colectivos, es decir, sus intereses

ambientales. Al aplicar la lógica difusa, los grupos o los subconjuntos no se cierran de acuerdo a la mejor posición, sino que se potencia el valor del grupo de interesados, en cuanto a capacidad de aporte. La aplicación de la lógica difusa, en este estudio, se logró en cuatro pasos a saber:

**Paso 1: Definición de la inexactitud del interés ambiental:** Se definieron las tres variables que ya fueron explicadas (UF, TDLA, DAP), como las que mejor pueden representar los atributos difusos, respecto a los intereses ambientales de la RFRNB.

**Paso 2: Asociación de términos lingüísticos:** Se establecieron los conjuntos difusos definiendo, por una parte, los contenidos del rango, dentro del cual, cada variable se expresa con inferencias creíbles y, por otra, los límites extremos de cada variable.

**Paso 3: Fuzzificación:** Para obtener los conjuntos difusos, se asignaron valores numéricos entre 0 y 1 a los atributos de cada variable; luego, se ubicaron las entradas (# de personas de la muestra que respondieron en este sentido) y, de esta manera, se obtuvieron las tres funciones, en donde  $T$  es el conjunto del universo (total de la muestra); UF, TDLA o DAP corresponden en cada caso, al subconjunto que pertenece a  $T$  y  $X$  representa a los elementos de la valoración, que están entre 0 y 1. Cada conjunto difuso UF, TDLA o DAP se definió así:

## 1) FUNCIÓN DE PERTENENCIA DE UF:

$$UF = \{ (x, UF(x)) \mid x \in T \}.$$

## 2) FUNCIÓN PERTENENCIA TDLA:

$$TDLA = \{ (x, TDLA(x)) \mid x \in T \}.$$

## 3) FUNCIÓN DE PERTENENCIA DAP:

$$DAP = \{ (x, DAP(x)) \mid x \in T \}.$$

Los valores asignados a cada función de pertenencia y que fueron incluidos en el sistema computacional utilizado, se presentan en la tabla 2.

**Paso 4: Expresión grafica del interés ambiental para cada variable:** Las tres variables elegidas y sus resultados, se expresan de manera tridimensional, en el gráfico 4. Aquí, se muestra el comportamiento de las diferentes posiciones, sin descartar ningún grupo de interés en la RFRNB. En estos resultados, se observa que todos los interesados difusos están dentro de la función de pertenencia para potenciar la realidad de la RFRNB, pero se destacan los picos generados por:

- Los valores de quienes no saben exactamente con quien trabajar y de quienes quieren trabajar con pocas personas, lo cual, significa que el trabajo en grupo o las acciones colectivas en la RFRNB son bastante difusas.
- Los valores de quienes no definen el tiempo que pueden dedicarle a la RFRNB y sobresale el grupo de personas que están dispuestas a trabajar indefinidamente, lo que

significa que es posible transferir el valor de la Reserva, desde ya, a las futuras generaciones, a través del impulso de quienes manifiestan este tipo de interés.

- El interés por apoyar económicamente a la RFRNB es igual al desinterés por no apoyarla, lo que significa que, en términos de dinero, existen más restricciones y que esta variable es más sensible para demostrar el interés frente a la Reserva.

Con estos resultados, se concluye que para hacer realidad la RFRNB, es necesario que los grupos o el colectivo tengan intereses de hacerlo. Indefectiblemente, los intereses colectivos son intereses difusos, pero no por ello menos importantes, que los intereses individuales reales. Cada grupo de interés tiene un aporte para la RFRNB que debe ser considerado al momento de realizar una gestión socioambiental, como parte del Plan de Manejo Ambiental de la Reserva o de cualquier proyecto ambiental que implique al colectivo social.

En esta vía, Maldonado (2005) reflexiona sobre los intereses difusos y considera que el camino no es fácil y que la construcción social de alternativas aún es posible, considerando que en Colombia se cuenta con un marco jurídico bastante innovador, que considera el derecho-deber de la propiedad, el derecho al ambiente como un derecho colectivo y las plusvalías urbanas.

Adicionalmente, estos resultados obligan a escudriñar en las posibilidades que existen para lograr que la RFRNB sea una

Tabla 2. Valores asignados a cada función de pertenencia, utilizados en el sistema computacional.

VALORES DE LA FUNCIÓN UNIÓN ESFUERZOS (UF)		
ATRIBUTOS UF	VALORES DIFUSOS UF	ENTRADAS UF
No sabe	0	38
Solo	0,2	11
Con pocas personas	0,5	35
Con muchas personas	1	16
VALORES DE LA FUNCIÓN TEMPORALIDAD DE LAS ACCIONES (TDLA)		
ATRIBUTOS TDLA	VALORES DIFUSOS TDLA	ENTRADAS TDLA
No sabe	0	26
Únos meses	0,1	9
Únos años	0,4	7
Siempre	1	58
VALORES DE LA FUNCIÓN DISPONIBILIDAD A PAGAR (DAP)		
ATRIBUTOS DAP	VALORES DIFUSOS DAP	ENTRADAS DAP
No	0	36
No sabe	0,3	18
Sí	1	46

realidad, no solo distrital, sino regional. Estas posibilidades, en primera instancia, están dadas por el potencial de los grupos sociales de querer apoyarla y, otra forma de identificar posibilidades, se encuentra en los instrumentos de planeación del desarrollo territorial, circunscrito al espacio implícado.

Al respecto, Carrizosa (2007) afirma que las variaciones de la complejidad social dependen de las estructuras y de las formas que adopta cada grupo de humanos en un territorio y de las interacciones de esos grupos. Explica que el sistema pasa de ser una muy compleja red de interacciones entre lo rural y lo urbano a un simple objeto del mercado, susceptible de transar por un precio en la ley de oferta y de demanda. En este sentido, se debe buscar, en otros ámbitos, el poder de la RFRNB y, ello se logra, cuando se observa la presión por urbanizarla, no tanto al interior de la zona, sino cuando se evidencia la manera abrupta en que se están urbanizando los municipios de Cota, de Cajicá, de Sopó y de Chía en sus zonas rurales, vecinas a Bogotá y, por ende, vecinas a la RFRNB.

Por otra parte, expresa Maldonado (2009) que, cuando los intereses ambientales ligados al desarrollo urbano se expresan en términos de lógicas rentistas o especulativas, raramente apuntan al interés general, lo cual, hace parte de la esencia de la dimensión ambiental. Por ello, es necesario buscar otras posibilidades de integrar a la declaratoria de la CAR, los instrumentos de la planeación local, con la Distrital y la regional, considerando el eje ambiental como articulador de esta integración. Esta intención institucional, se encuentra en las propuestas que tienen para tal fin la Localidad de Suba (2011), el Distrito Capital de Bogotá (2012), la Gobernación de Cundinamarca (2011) y, en menor medida, pero de gran importancia, los planes de desarrollo y de ordenamiento territorial de los municipios vecinos.

En todo caso, para un análisis de intereses ambientales en una zona de conflicto ambiental, es importante enmarcar las acciones en el pensamiento de Ostrom (2011), quien demuestra cómo en distintos casos, usuarios y propietarios de los bienes comunes han sabido crear instituciones, que permiten el aprovechamiento sustentable. Ella considera que la complejidad de los recursos requiere de sistemas complejos de gobernanza, que involucren la contribución ciudadana de distintas formas. Pero en el caso de la RFRNB, aún el sistema no es visto desde esta perspectiva, la fragmentación de intereses y la red interinstitucional que permite reconstruir el tejido social para, a su vez, proteger el tejido natural, es incipiente.

Para el efecto, Leff (2009) sugiere que la gestión de los recursos naturales implica un proceso de concertación, que permita dirimir conflictos, pero que también abra opciones hacia diferentes estrategias de apropiación y de transformación de la naturaleza, dentro de los principios de racionalidad ambiental. En conclusión, esas estrategias diferentes empiezan por la forma de comprender la situación, que debe ser alternativa a las tradicionales, incluyente y creativa. Objetivo que se cumple, con el hecho de analizar los intereses ambientales, mediante métodos distintos, como la lógica difusa.

**Agradecimiento:** La autora agradece a la U.D.C.A, por financiar la investigación “Análisis de intereses ambientales en la zona de la RFRNB”, que dio origen a este artículo. **Conflicto de Intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado por el autor, quien declara ser el único autor y que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

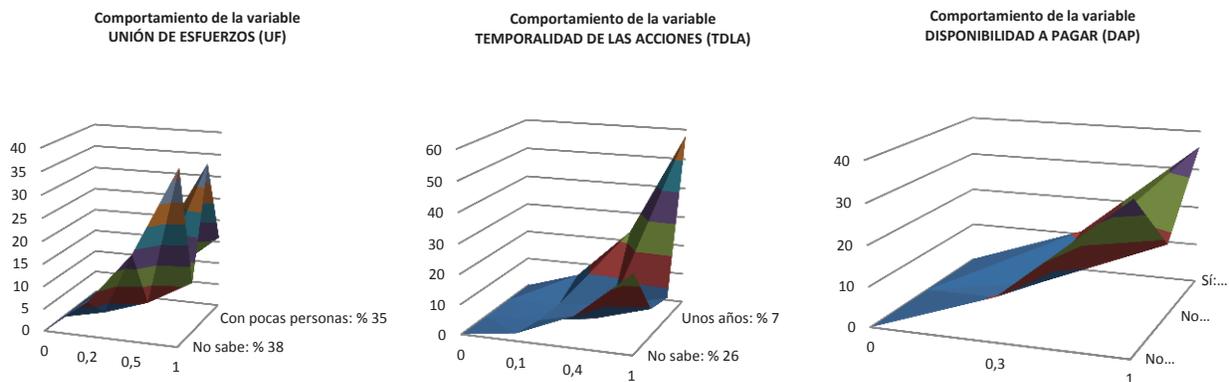


Gráfico 4. Expresión gráfica del interés ambiental en la RFRNB.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ. 2012. Plan de desarrollo económico y social y de obras públicas para Bogotá distrito capital 2012 - 2016: Bogotá humana. Colombia. 48p.
2. ALCALDIA MAYOR DE BOGOTÁ. 2001. Secretaría Distrital de Ambiente. Agenda ambiental localidad 11, Suba. Colombia. 77p.
3. ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ. 2011. Plan de Gestión para el Desarrollo Rural Sostenible, del Distrito de Bogotá. 170p.
4. ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ. 2010. Diagnóstico de la región capital Bogotá-Cundinamarca. Colombia 89p.
5. ACEVEDO, J.; CARRIZOSA, J.; CUERVO, L.M.; RODRÍGUEZ, M.; SAMPER, G.; ALDANA, E.; CORREAL, M.; JARAMILLO, R.; SALMONA, R.; VAN DER HAMMEM, T. 2000. Misión de expertos del Ministerio de Ambiente. La zona norte: riqueza ecológica y paisajística que debe ser recuperada y conservada. Mimeógrafo Univerciudad. 9p.
6. ARDILA, G. 2009. Foro Nacional Ambiental. Reflexiones de la mesa de expertos "Bogotá-sabana ¿Gobernabilidad posible? 16p.
7. AZNAR R., J.; ALARCÓN R., T. 2006. Etimologías grecolatinas. Pearson Education. México. 224p.
8. AZQUETA, D. 1994. Valoración económica de la calidad ambiental. McGraw-Hill, España. 299p.
9. CARRIZOSA, J. 2006. "Desequilibrios Territoriales y Sostenibilidad Local - Conceptos, metodologías y realidades". Colombia. Ed: Unibiblos. Colombia. 174p.
10. CARRIZOSA, J. 2007. Mente, ambiente y paz. Rev. IDEA. 10:43-52.
11. CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE CUNDINAMARCA CAR. 2011. Acuerdo #011 del Consejo Directivo, mediante el cual declara la "Reserva Forestal Regional Productora del Norte de Bogotá DC Thomas Van der Hammen".
12. DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN DNP. 2010. República de Colombia. Plan nacional de desarrollo 2010-2014, "Prosperidad para todos". Tomo I, 541p.
13. DISTRITO BOGOTÁ. 2010. Decreto 043 de enero 29, por el cual se adopta el plan de ordenamiento zonal del norte y se dictan otras disposiciones.
14. D'NEGRI, C.E.; DE VITO, E.L. 2006. Introducción al razonamiento aproximado: lógica difusa. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, - CONICET-. Universidad de Buenos Aires. Rev. Argentina Med. Resp. 4:126-136.
15. DURÁN, M.I. (s/f). Lógica Borrosa. Disponible desde Internet en: <http://www.it.uc3m.es/jvillena/irc/> (con acceso 08/05/12).
16. DIARIO EL TIEMPO. 2012. Clasificados. Casa Editorial, Bogotá, Colombia. Rev. Metro Cuadrado 105:46.
17. GOBERNACIÓN DE CUNDINAMARCA. 2011. Plan de Desarrollo del Departamento de Cundinamarca 2012-2016.
18. INSTITUTO DE ESTUDIOS URBANOS de la Universidad Nacional de Colombia y Corporación Autónoma Regional-CAR- IEU. 2011. Proyecto borde norte de Bogotá Fase II. 592 p.
19. LOCALIDAD DE SUBA, BOGOTÁ. 2011. Diagnóstico Ambiental. 511p.
20. LEFF, E. 2009. Racionalidad ambiental la reapropiación social de la naturaleza. Siglo XXI editores. Segunda edición. México. 509p.
21. MALDONADO C., M.M. 2005. Son posibles las áreas protegidas alrededor de las grandes ciudades? En: Región, ciudad y áreas protegidas. CEREC. p.181-221.
22. MALDONADO C., M.M. 2009. Foro Nacional Ambiental. Reflexiones de la mesa de expertos "Bogotá-sabana ¿Gobernabilidad posible? 16p.
23. MENDIETA L., J.C. 2005. Manual de valoración económica de bienes no mercadeables: Aplicaciones de las técnicas de valoración no mercadeables y el análisis costo beneficio y medio ambiente. Uniandes, CEDE, Colombia. 338p.
24. MORALES L., G. 2002. Introducción a la lógica difusa. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. México.

25. OSTROM, E. 2011. El Gobierno de Los Bienes Comunes: La Evolución de Las Instituciones de Acción Colectiva. Fondo de Cultura Económica México. 2ª ed. 403p.
26. PECHE G., R. 2006. Valoración cualitativa de impactos ambientales mediante lógica borrosa. Rev. Gestión y ambiente. 9(3):99-113.
27. PÉREZ C., L. 2002. La defensa judicial de los intereses ambientales. Ediciones Lex Nova. España. 428p.
28. POSADA L., L.G. 1997. La problemática ambiental y los diversos enfoques de la teoría económica. Rev. Ens. Econ. 7:32-52.
29. POSADA A., A. 2009. Intereses ambientales: reflexiones sobre la aplicación de lo difuso. Rev. Ing. 8(14):11-20.
30. PROCURADURÍA GENERAL DE LA NACIÓN PGN. 2010. Circular #023 de abril 13, sobre el pronunciamiento respecto a la reserva forestal protectora del norte y el plan de ordenamiento zonal del norte.
31. ROMERO, A. 2012. Mapa en SIG del proyecto Análisis de intereses ambientales en la RFRNB, sobre la base cartográfica del proyecto institucional U.D.C.A

Recibido: Agosto 21 de 2012

Aceptado: Octubre 26 de 2012

# INFLUENCIA DE LAS FRACCIONES DE MATERIA ORGÁNICA SOBRE EL DESEMPEÑO DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE UNA INDUSTRIA PAPELERA

## EFFECT OF ORGANIC MATTER FRACTIONS ON THE PERFORMANCE OF A PULP AND PAPER MILL WASTEWATER TREATMENT SYSTEM

Jenny Rodríguez<sup>1</sup>, Tatiana Mañunga<sup>2</sup>, Cristian Cárdenas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ingeniera Sanitaria, M.Sc., Dra. Profesora Asociada, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali, Colombia. jenny.rodriguez@correounivalle.edu.co <sup>2</sup>Ingeniera Sanitaria, M.Sc. Estudiante de Doctorado en Ingeniería, Universidad del Valle, Colombia. tati.anam@yahoo.com <sup>3</sup>Ingeniero Sanitario. Estudiante de Maestría en Ingeniería, Universidad del Valle, Colombia. neo4435@hotmail.com Dirección de correspondencia: Carrera 100 No 13-00 Edificio 336 Oficina 1007. Barrio Meléndez, Cali, Valle del Cauca – Colombia. e-mail: tati.anam@yahoo.com

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 447 - 455, 2012

### RESUMEN

El tipo de materia orgánica presente en el agua residual influye sobre el grado y la complejidad del tratamiento biológico, por lo que el análisis del fraccionamiento de la materia orgánica puede brindar información complementaria para la optimización de los procesos. En esta investigación, se identificaron las fracciones de materia orgánica: biodegradable particulada, biodegradable soluble, no biodegradable particulada y no biodegradable soluble, en el agua residual de una industria papelera y en los efluentes de las unidades que componen la planta de tratamiento de agua residual (clarificador primario, laguna aireada facultativa y laguna de sedimentación). Los resultados mostraron que la fracción no biodegradable representó el 69% de la DQO total del afluente, mientras que la fracción biodegradable significó el 31%. La clarificación primaria desempeñó un papel fundamental en la tratabilidad biológica del agua residual, al reducir significativamente la fracción no biodegradable. La laguna aireada facultativa disminuyó, representativamente, la fracción biodegradable soluble de 44% a 12%, mientras que la laguna de sedimentación desarrolló un efecto de pulimiento sobre el efluente, alterando, principalmente, la fracción particulada. La disminución de la materia orgánica no biodegradable soluble fue especialmente obtenida como resultado de su adsorción sobre la biomasa en la laguna aireada facultativa; la fracción de este tipo de materia orgánica fue adquiriendo mayor protagonismo en el agua residual, a medida que avanzó el grado de tratamiento,

incrementado su valor desde 19%, en el afluente, hasta 45%, en el efluente de la laguna de sedimentación.

Palabras clave: Fraccionamiento de materia orgánica, industria papelera, materia orgánica soluble, materia orgánica particulada.

### SUMMARY

Slowly biodegradable organic matter represents the bulk of organic matter content of pulp and paper mill wastewater which can influence the performance of treatment systems. The organic matter fractionation is a useful tool that generates information for optimize treatment processes of wastewater. Organic matter fractionation study was carried out. Biodegradable soluble, biodegradable particulate, non-biodegradable soluble and non-biodegradable particulate fractions were identifies in effluents of primary clarifier, facultative aerated pond and sedimentation pond. Results of this study show that organic matter non-biodegradable/total organic matter ratios of the influent were 69% while biodegradable fraction was 31%. Primary clarifier removed significantly the non-biodegradable fraction it was key for biological treatment. The biodegradable soluble fraction was mostly removed in facultative aerated pond (44% to 12%). The effluent was polished in the sedimentation pond, mainly particulate organic matter fraction. Only a small percentage of non-biodegradable organic matter was adsorbed by facultative aerated pond biomass, the fraction of this organic

matter accounted for 19% in the influent and increased to 45% in the effluent.

Key words: COD fractions, organic matter, particulate COD, soluble COD, paper mill wastewater.

## INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante en el diseño y la operación de los sistemas de tratamiento biológico, ha sido el reconocimiento de la existencia de diferentes velocidades de degradación de las fracciones de los sustratos (Orhon *et al.* 1997). Esto ha llevado a adoptar el fraccionamiento de la materia orgánica como parte integral de la caracterización del agua residual. La división de sus componentes en fracciones de diferente tamaño, suministra información detallada sobre las características del agua residual y ayuda en el diseño de las tecnologías de tratamiento (Dulekgurgen *et al.* 2006).

La materia orgánica, en virtud de su tamaño, ha sido clasificada en soluble y particulada. Desde la perspectiva bioquímica, se clasifica en biodegradable y no biodegradable (Wentzel *et al.* 1999). La unión de estas dos clasificaciones da origen a cuatro fracciones principales: biodegradable soluble, biodegradable particulada, no biodegradable soluble y no biodegradable particulada (Orhon & Çokgör, 1997; Park *et al.* 1997).

La fracción biodegradable soluble esta relacionada con compuestos que pueden ser directamente adsorbidos para síntesis de nuevo material celular, como ácidos grasos volátiles, carbohidratos simples, aminoácidos, alcoholes, entre otros, por tal motivo es, por lo común, denominada fracción rápidamente biodegradable (Orhon & Çokgör, 1997; Grady *et al.* 1999). La fracción biodegradable particulada esta relacionada con macromoléculas que se deben desglosar en formas más simples, antes de ser aprovechadas por los microorganismos (Mathieu & Etienne, 2000). La ruptura de este tipo de materia orgánica, se realiza a través de un proceso de hidrólisis con enzimas extracelulares. Gujer *et al.* (1995) establecieron que la hidrólisis requiere de dos horas antes de que la materia orgánica biodegradable particulada sea transportada a través de la membrana celular y metabolizada, razón por la cual, a esta fracción, se le denomina lentamente biodegradable; sin embargo, el tiempo para la hidrólisis de este tipo de materia orgánica no es estándar, presentándose diversas velocidades de degradación.

Generalmente, en el agua residual industrial se observan altas fracciones de materia orgánica lentamente biodegradable, por lo tanto, la hidrólisis se constituye en un mecanismo importante y limitante para su tratamiento biológico. Las tasas de hidrólisis pueden ser significativamente menores en comparación con las obtenidas en agua residual doméstica, debido a la presencia de compuestos orgánicos, que no son

totalmente compatibles con el tratamiento biológico (Insel *et al.* 2002).

La fracción no biodegradable o inerte está compuesta por sustancias, como ácidos húmicos o fúlvicos disueltos. También, se ha identificado que los subproductos generados en la actividad microbiológica hacen parte de este tipo de materia orgánica (Dulekgurgen *et al.* 2006).

Levine *et al.* (1985), Orhon *et al.* (1999a), Hu *et al.* (2002), Dulekgurgen *et al.* (2006) coinciden al establecer que los componentes solubles se definen como partículas con una dimensión menor que 1,0nm, mientras que partículas de diámetro superior, se denominan como material particulado, subdividido en coloides (1,0nm – 1,0µm), supracoloidal (1,0 - 100µm) y sedimentable (> 100µm).

Para estimar las fracciones de materia orgánica en el agua residual, se han desarrollado diversos métodos: desde los simples que emplean separación física, hasta métodos más elaborados, involucrando pruebas respirométricas (Mathieu & Etienne, 2000; Lagarde *et al.* 2005) y cromatografía (Guellil *et al.* 2001). Combinar la separación física (filtración) con análisis de laboratorio estandarizados, como DQO y DBO<sub>5</sub>, permite determinar, con un alto grado de precisión y de rapidez, las principales fracciones de materia orgánica en el agua residual. Escoger el tamaño del poro del filtro para distinguir entre la fracción soluble y particulada es un aspecto controversial, varía de un autor a otro y depende de la calidad del agua residual a estudiar. Melcer (2003) sugiere que el término soluble en el contexto del tratamiento del agua residual, se refiere al material que pasa a través de una membrana filtrante con un poro de 0,45µm; Bilgili *et al.* (2008) empleó un filtro de este tamaño para determinar las fracciones de DQO, en un lixiviado.

La industria papelera utiliza grandes cantidades de agua para la generación de pulpa y papel (Pokhrel & Viraraghavan, 2004). Emplea cloro elemental o dióxido de cloro para el blanqueo de la pulpa (Ibarra *et al.* 2006) y, en algunos procesos, soda cáustica, para la cocción de la materia prima (Thompson *et al.* 2001). Una fracción de estos compuestos, junto con otras características de la materia prima hacen parte del agua residual, la cual, se caracteriza por presentar altas concentraciones de DQO, de DBO<sub>5</sub> y de SST (Tsang *et al.* 2007; Sadhasivam *et al.* 2009). La materia orgánica presente en este tipo de agua residual, generalmente, esta compuesta por fibras de celulosa, de carbohidratos, de productos transformados de azúcares, de polisacáridos, de ácidos orgánicos, de resinas ácidas y ligninas y una variedad de derivados clorados que, al reaccionar, pueden generar compuestos organoclorados, lo cuales, son persistentes, bio-acumulables y tóxicos (Fulthorpe *et al.* 1993; Thompson *et al.* 2001).

El objetivo de la investigación fue determinar las fracciones de materia orgánica en el agua residual afluyente y en los efluentes de las unidades que componen el sistema de tratamiento de agua residual de una industria papelerera, para obtener información relacionada con el grado de tratamiento alcanzado, teniendo en cuenta las limitaciones que implica la complejidad de este tipo de agua residual y la particularidad de la industria, ya que emplea bagazo de caña de azúcar para producir pulpa y papel.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las fracciones de materia orgánica fueron determinadas en un agua residual proveniente de una industria productora de pulpa y de papel, que genera un caudal de agua residual de  $400\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ . Los efluentes industriales son conducidos de forma individual hasta un tanque, para posteriormente ser enviados hacia la planta de tratamiento de agua residual (PTAR), compuesta por un clarificador primario ( $\text{TRH}_{\text{diseño}}: 4,0\text{h}$ ), una laguna aireada facultativa -LAF ( $\text{TRH}_{\text{diseño}}: 5\text{d}$ , aireación mecánica) y una laguna de sedimentación-LS ( $\text{TRH}_{\text{diseño}}: 9\text{d}$ ); esta unidad desempeña una función similar a la de un sedimentador secundario y, adicionalmente, almacena y estabiliza el lodo sedimentado (von Sperling & Chernicharo, 2005).

Se realizaron tres jornadas de muestreo, donde se recolectaron muestras puntuales cada dos horas, entre las 7:00 a.m. y 5:00 p.m. Los puntos de muestreo fueron: afluyente al clarificador primario (afluyente), afluyente a la LAF (efluente primario), afluyente a la LS (efluente LAF) y el efluente de la LS (efluente). Las muestras fueron refrigeradas a  $4^{\circ}\text{C}$  y almacenadas de forma individual, durante un periodo inferior a 6h. Se realizaron análisis individuales de DQO, de  $\text{DBO}_5$ , de pH, de Temperatura y de SST, siguiendo las recomendaciones de los Métodos Standard (APHA, 2005).

Las fracciones de materia orgánica, se obtuvieron a partir del promedio de los datos de las muestras recolectadas para cada uno de los afluentes. La materia orgánica total, se cuantificó a través de la DQO total y filtrada, la materia orgánica biodegradable por medio de la  $\text{DBO}_5$  total y filtrada. Las muestras se filtraron a través de una membrana de fibra de vidrio Whatman GF/C de  $0,45\mu\text{m}$ , para determinar la materia orgánica soluble.

**Fraccionamiento de la Materia Orgánica:** La materia orgánica, se fraccionó en virtud de su biodegradabilidad y su tamaño en: biodegradable particulada- BP, biodegradable soluble-BS, no biodegradable particulada- nBP y no biodegradable soluble-nBS.

El contenido de materia orgánica en cada muestra de agua residual correspondió a la DQO total. La materia orgánica

biodegradable fue calculada por medio de la  $\text{DBO}_5$  total. La materia orgánica BS correspondió a la  $\text{DBO}_5$  soluble (filtrada). La materia orgánica BP, se calculó como la diferencia entre la  $\text{DBO}_5$  total y  $\text{DBO}_5$  soluble. La materia orgánica nB o inerte, se calculó como la diferencia entre la DQO total y la  $\text{DBO}_5$  total. La materia orgánica nBS, se determinó como la diferencia entre la DQO soluble y  $\text{DBO}_5$  soluble. La materia orgánica nBP, como la diferencia entre la materia orgánica nB (DQO total -  $\text{DBO}_5$  total) y la materia orgánica nBS (DQO soluble -  $\text{DBO}_5$  soluble).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización del agua residual:** La tabla 1 presenta la caracterización del agua residual afluyente a la PTAR y los efluentes de las unidades que componen el sistema de tratamiento. El contenido de DQO total,  $\text{DBO}_5$  total y SST en el afluyente fue similar al observado en el agua residual de otras industria papeleras (Thompson *et al.* 2001). La temperatura del afluyente, se ubicó en un rango termofílico y a medida que avanzó el tratamiento, disminuyó hasta alcanzar en el efluente un rango mesofílico. El pH afluyente varió entre el rango ácido y rango básico; este comportamiento fue asociado a la presencia de sustancias químicas, como dióxido de cloro y soda cáustica, empleadas en la manufacturación del papel. Al finalizar el tratamiento del agua residual, el efluente presentó valores de pH cercanos a la neutralidad.

La PTAR presentó una eficiencia promedio de reducción de DQO total,  $\text{DBO}_5$  total y SST del 88%, 91% y 89%, respectivamente, niveles similares a los reportados por Suvilampi & Rintala (2003) y Buzzini & Pires (2007), para sistemas de tratamiento de agua residual de la industria papelerera.

**Fraccionamiento de la materia orgánica afluyente:** En la figura 1, donde se presenta la composición de la materia orgánica en el afluyente, se observa que la fracción biodegradable representa menos del 40% de la materia orgánica; bajo estas condiciones, la reducción de la materia orgánica total a través del tratamiento biológico del agua residual resultaría poco efectiva (Xia *et al.* 2008; Dulekgurgen *et al.* 2006; Tchobanoglous *et al.* 2003). Para el caso de estudio y tal como lo sugiere Thompson *et al.* (2001), el tratamiento biológico fue efectivo, debido a que la clarificación primaria permitió que un porcentaje significativo de material no biodegradable fuera removido, tornando viable el tratamiento biológico para el material orgánico restante, pues su contenido tuvo un mayor porcentaje biodegradable.

Con relación al tamaño de las partículas orgánicas, en este tipo de agua residual, el mayor porcentaje que representó la materia orgánica particulada estuvo relacionado con residuos de fibras, de polvillos, de arena, de tierra y de otro tipo de

Tabla 1. Caracterización de los efluentes.

Parámetros	Afluente			Efluente primario			Efluente LAF			Efluente		
	Prom.	$\sigma$	n	Prom.	$\Sigma$	n	Prom.	$\sigma$	n	Prom.	$\sigma$	n
Intervalo de Temperatura (°C)	38,8-43,3	-	8	39,5-43,4	-	8	27,2-32,9	-	8	24,7-31,1	-	8
Intervalo de pH (unidades)	5,4-8,9	-	8	4,9-5,9	-	8	7,6-7,8	-	8	6,3-7,7	-	8
SST (mg.L <sup>-1</sup> )	2449	1434	8	489	209	8	465	110	8	214	126	8
DQO total (mg.L <sup>-1</sup> )	3718	1310	8	1700	131	8	674	165	8	439	114	8
DQO soluble (mg.L <sup>-1</sup> )	1368	245	8	1303	190	8	318	107	8	242	51	8
DBO <sub>5</sub> total (mg.L <sup>-1</sup> )	1108	225	8	829	86	8	137	49	8	83	26	8
DBO <sub>5</sub> soluble (mg.L <sup>-1</sup> )	724	104	8	739	78	8	86	57	7	55	35	7

Prom: Media aritmética  $\sigma$ : Desviación Estándar n: Número de datos

partículas, que en algún momento estuvieron adheridos a la materia prima y durante los procesos de lavado y de cocción, que hacen parte de la fabricación del papel, fueron retirados en el agua residual. La naturaleza floculenta de este tipo de materia orgánica (Tebbutt, 1979), sumada a una alta concentración fueron favorables para que la clarificación primaria incidiera sobre la eliminación de la materia orgánica no biodegradable

Fraccionamiento de la materia orgánica a través del tratamiento del agua residual: En la figura 2, se presentan las fracciones de materia orgánica en los efluentes, a medida que avanzó el tratamiento del agua residual.

Materia Orgánica Biodegradable Soluble – MOBS: La fracción de la MOBS en el afluente representó el 21% de

la materia orgánica, mientras que en el efluente primario esta fracción representó el 44%. El incremento en términos porcentuales de esta fracción, entre el afluente y efluente del clarificador primario, se debe a la reducción de la materia orgánica particulada que, por su tamaño, alcanzó velocidades de sedimentación, suficientes para ser retenida en el clarificador primario.

Comparando la concentración promedio de MOBS (DBO<sub>5</sub> filtrada), entre el afluente (724±104 mg.L<sup>-1</sup>) y efluente primario (739±78 mg.L<sup>-1</sup>), se observa que la clarificación primaria no tuvo influencia sobre este tipo de materia orgánica y la diferencia observada, aunque no es significativa, pudo ser suscitada por el comportamiento hidráulico de la unidad. Un resultado similar fue descrito por Gernaey *et al.* (2001), quienes sugieren que el comportamiento

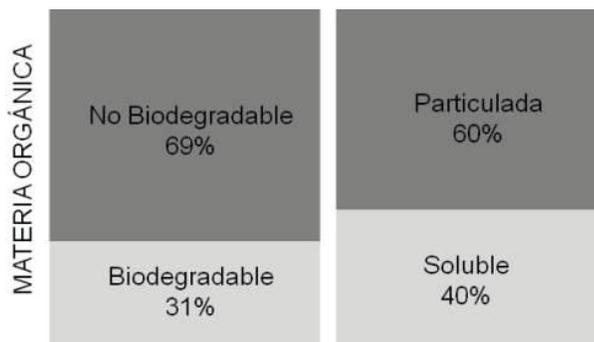


Figura 1. Composición de la materia orgánica en el afluente

de la concentración de la materia orgánica soluble en el efluente primario solamente depende de los cambios en la concentración afluente, cuando no se presentan procesos biológicos inducidos por TRH superiores a 4h.

Para el tratamiento biológico del agua residual es preferible que la materia orgánica este en forma de MOBS, ya que por el tamaño de sus partículas el requerimiento energético para atravesar la pared celular de las bacterias que realizan el procesos de degradación, es mínimo; en ese sentido, para alcanzar una mayor eficiencia en el tratamiento, ese tipo de materia orgánica deberá estar presente en una mayor proporción. En el caso del efluente primario, la fracción biodegradable representó el 49%, de los cuales, el 44% fue BS. El predominio de esta fracción favoreció el desempeño de la LAF, expresado a través de una significativa reducción en su concentración de  $739 \pm 78 \text{mg.L}^{-1}$  a  $86 \pm 57 \text{mg.L}^{-1}$ , correspondiente a una eficiencia de reducción de 88%.

Grady *et al.* (1999) afirman que en la reducción de MOBS predominan mecanismos de absorción, por lo que el comportamiento observado pudo ser causado, principalmente, por este mecanismo, fundamental para que, factores inherentes a la composición del agua residual, como pH ácido y altas temperaturas, que pudieran resultar desfavorables para la actividad biológica, no fueran determinantes para la alta eficiencia que exhibió la LAF. Como resultado de la transformación biológica de la materia orgánica, la fracción BS, en el efluente de la LAF, disminuyó significativamente a un 12%.

La Laguna de Sedimentación (LS) no afectó la fracción BS, ya que esta fracción presentó una disminución poco

significativa (12%) en el efluente, lo cual, es acorde con el comportamiento esperado, que es el de pulir la calidad del agua residual, actuando, principalmente, sobre el componente particulado. La concentración de MOBS afluente y efluente de la LS fue de  $86 \pm 57 \text{mg.L}^{-1}$  y  $55 \pm 35 \text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente; esta diferencia representó una eficiencia de reducción promedio del 36%.

**Materia Orgánica Biodegradable Particulada – MOBP:** La fracción BP representó en el afluente el 10% de la materia orgánica y en el efluente primario el 5%. Las concentraciones relacionadas con estos porcentajes fueron  $384 \pm 170 \text{mg.L}^{-1}$  y  $91 \pm 28 \text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente, lo que significó una reducción promedio del 76%. De acuerdo con Ødegaard (1998), reducciones de materia orgánica biodegradable superiores al 30% en un clarificador primario, como en este caso, son debidas a la reducción de partículas de diámetro cercano a  $0,1 \mu\text{m}$ .

De otro lado, el comportamiento observado es comparable con la eficiencia del clarificador primario en la reducción de SST (74%), lo que indica que una porción significativa de los SST está conformada por MOBP.

Orhon *et al.* (1999b) citan que la reducción de la MOBP en sistemas biológicos sucede por fenómenos de absorción en el lodo y solubilización a sustrato fácilmente biodegradable, por procesos de hidrólisis. La ocurrencia de este proceso favoreció la disminución de la concentración en la LAF; sin embargo, el efecto más importante sobre la fracción BP sucedió durante la clarificación primaria, resultando en un gran beneficio para el desempeño de la LAF, ya que de toda la materia orgánica que ingresó a la LAF, solo el 5%

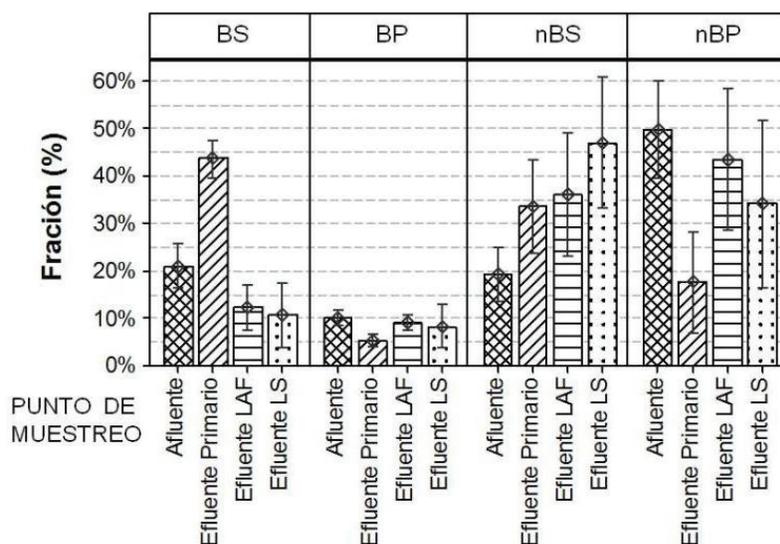


Figura 2. Fracciones de materia orgánica.

representó MOBP, por lo que los procesos de hidrólisis, considerados como un paso limitante que controla los procesos aerobios, debido a que la tasa de hidrólisis de este tipo de materia orgánica es una etapa más lenta comparada con el crecimiento de bacterias heterótrofas (Orhon & Çokgör, 1997; Orhon *et al.* 1999b), probablemente fueron demandados en muy baja proporción, predominando en la LAF los procesos de adsorción sobre la MOBS. La concentración de la MOBP afluente y efluente de la LAF fue  $91 \pm 28 \text{mg.L}^{-1}$  y  $58 \pm 14 \text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente, lo que representó una reducción promedio del 37%.

Una fracción de la biomasa formada en la LAF, producto de la transformación biológica de la MOB (MOBS y MOBP), salió en el efluente, lo que incrementó la fracción BP hasta un valor del 8%. La presencia de MOBP en el efluente de la LAF fue debida a la mezcla que proporcionó la aireación superficial, la cual, creó un efecto similar al que se produce en un tanque de aireación de un sistema de lodos activados, en el que el efluente es una mezcla de biomasa y de agua residual.

En la laguna de sedimentación (LS), la concentración de MOBP afluente y efluente fue  $58 \pm 14 \text{mg.L}^{-1}$  y  $44 \pm 35 \text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente, lo que representó una reducción promedio del 35%. Esta unidad fue diseñada para permitir la separación sólido - líquido del efluente de la LAF, antes de su descarga final, por lo que se infiere que fueron los procesos físicos los que participaron en la reducción de la MOBP en esta unidad. Este comportamiento fue el responsable de que la fracción de la MOBP en el afluente y efluente fuera prácticamente la misma (8% y 7%, respectivamente).

Materia Orgánica No Biodegradable Soluble – MonBS: La concentración de MOnBS afluente y efluente del clarificador primario fue de  $644 \pm 172 \text{mg.L}^{-1}$  y  $564 \pm 181 \text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente, las cuales, equivalen a una eficiencia promedio de reducción del 12,4%. Por el tamaño de las partículas involucradas, no se esperaba una reducción en la concentración de la MOnBS durante la clarificación primaria; sin embargo, es posible que el comportamiento observado haya sido motivado por fenómenos fisicoquímicos, como adsorción o volatilización, tal como lo reportan Grady *et al.* (1999). Las altas temperaturas que caracterizan a este afluente pudieron fomentar un ambiente adecuado para que en el clarificador primario se presentaran algunos procesos de volatilización. La disminución en la concentración de este tipo de materia orgánica, se atribuye también al fenómeno de barrido o arrastre de partículas, propio de la sedimentación floculenta, producida por la aglomeración de partículas, lo que podría ser semejante al fenómeno de adsorción, que describen Grady *et al.* (1999).

En la LAF, se redujo el 59% de la MOnBS, aunque autores

como Orhon *et al.* (1989), Germirli *et al.* (1991) y Sollfrank *et al.* (1992) afirman que, en sistemas biológicos, los compuestos solubles no biodegradables abandonan el sistema sin ser transformados y que, por el contrario, es posible que se generen producto de la actividad microbiológica (Dulekgurgen *et al.* 2006), se considera el fenómeno de adsorción, como el principal responsable de la reducción obtenida.

La fracción de la MOnBS presentó un comportamiento creciente a lo largo del tren de tratamiento, donde en el afluente representó el 19% de la materia orgánica, en el efluente primario fue del 33%, en el efluente de la LAF representó el 36% y en el efluente de LS fue de 45%. Este comportamiento es explicado a través de la reducción de la MOBS y MOBP, dejando en cada efluente mayor proporción de la fracción no biodegradable.

Las concentraciones en el efluente de la LAF y efluente de LS fueron  $232 \pm 73 \text{mg.L}^{-1}$  y  $203 \pm 46 \text{mg.L}^{-1}$ , lo que significó una reducción promedio del 19%. Este comportamiento es acorde con lo esperado, ya que este tipo de sistemas es diseñado para favorecer la separación de material particulado, por lo que los compuestos solubles no biodegradables abandonan el sistema de tratamiento, sin ninguna restricción. Es por esta razón, que autores como Veret *et al.* (2000) sugieren que para efluentes industriales, la sedimentación químicamente asistida contribuiría con la reducción de este tipo de materia orgánica.

Materia Orgánica No Biodegradable Particulada – MonBP: La clarificación primaria ejerció una significativa disminución de la concentración de la MOnBP; en el afluente, su concentración fue de  $1966 \pm 1270 \text{mg.L}^{-1}$ , mientras que en el efluente primario fue  $307 \pm 227 \text{mg.L}^{-1}$ , lo que condujo a una disminución en los valores porcentuales de esta fracción, los cuales, pasaron de 50% a 18%, respectivamente. Este comportamiento ratificó la importancia de la clarificación primaria para el tratamiento global de este tipo de agua residual.

La eficiencia de la clarificación primaria en la reducción de MOnBP fue de 84%, este porcentaje fue cercano al observado en la reducción de SST, lo que sugiere que el material sedimentable, en este tipo de agua residual, esta constituido, principalmente, por materia orgánica biodegradable y no biodegradable.

La fracción de MOnBP, se incrementó entre el efluente primario y efluente de la LAF, que pasó de 18% a 43%. En concentración, estos valores fueron  $307 \pm 227 \text{mg.L}^{-1}$  y  $305 \pm 132 \text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. La similitud entre estos valores podría indicar que la MOnBP atravesó la LAF sin sufrir alguna modificación; sin embargo, es importante

precisar que el tipo de MOnBP que ingresó a la LAF fue diferente a la observada en su efluente. Mientras que en el afluente de la LAF la MOnBP fue asociada con residuos de papel, fibras entre otros materiales, en su efluente este tipo de materia orgánica fue conformada por lodo estabilizado que fue arrastrado como producto de la mezcla, que proporcionó la aireación superficial. La configuración de este tipo de lagunas, considera un volumen adicional para la sedimentación y la acumulación de lodo, que sumados al tiempo de retención celular y las condiciones anaerobias, que son favorecidos en el fondo, fomentaron los procesos de lisis celular y el metabolismo endógeno, los cuales, permiten la estabilización del lodo formado, que al salir en el efluente de la LAF es contabilizado como MOnBP.

En el efluente de la LAF la concentración de MOnBP fue de  $305 \pm 132 \text{ mg.L}^{-1}$  y en el efluente de LS fue  $153 \pm 123 \text{ mg.L}^{-1}$ , lo que significó una reducción promedio del 45%. Para el sistema evaluado, la gran reducción de MOP (biodegradable y no biodegradable) fue debida, principalmente, a los procesos de separación sólido – líquido; autores como Feiden (2001) afirman que este tipo de lagunas conservan su nivel de desempeño, aún cuando se incrementa el TRH de 2,5d a 13d, es decir, que los procesos de transformación biológica de la materia orgánica tienen baja incidencia sobre el desempeño de este tipo de lagunas y, por el contrario, su desempeño depende ampliamente de los procesos de sedimentación o separación de partículas.

La combinación de un clarificador primario seguido de una LAF y LS presentó una eficiencia promedio en la reducción de DQO total, DBO<sub>5</sub> total y SST de 88%, 91% y 89%, respectivamente. Tomando en consideración este resultado y la distribución de fracciones en el efluente de la LS (MOBS 12%, MOBP 8%, MOnBS 47% y MOnBP 34%), se sugiere que para incrementar el grado de tratamiento relacionado con la reducción de materia orgánica, los esfuerzos se deben enfocar en la optimización de los procesos o variables que intervienen en la separación física de la fracción particulada, en este caso, hacia el clarificador primario, cuyo desempeño mostró gran influencia sobre este tipo de MO.

La fracción de nBS en el efluente representó el 47% de la materia orgánica, el cual, es un contenido significativo que no es susceptible de ser disminuido, aún con la optimización de las unidades existentes, por lo que se presume, que la inclusión de procesos químicamente asistidos para el efluente de la LAF podría contribuir con la reducción de este tipo de materia orgánica.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen el apoyo recibido de PROPAL-PLANTA 2 y de la Universidad del Valle, para la realización de este estudio. **Conflictos de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de

todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. APHA. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Editors APHA, American Water Works Assoc. and Water Environment Federation. (Washington, DC). p. 2-55,5-14.
2. BILGILI, M.S.; DEMIR, A.; AKKAYA, E.; OZKAYA, B. 2008. COD fractions of leachate from aerobic and anaerobic pilot scale landfill reactors. *J\_Hazard Mater.* 158:157-163.
3. BUZZINI, A.; PIRES, E. 2007. Evaluation of a upflow anaerobic sludge blanket reactor with partial recirculation of effluent used to treat wastewaters from pulp and paper plants. *Bioresour. Technol.* 98:1838-1848.
4. DÜLEKGÜRGEN, E.; DOGRUEL, S.; KARAHAN, Ö.; ORHON, D. 2006. Size distribution of wastewater COD fractions as an index for biodegradability. *Water Res.* 40:273-282.
5. FEIDEN, A. 2001. Avaliação da eficiência de lagoas de tratamento de resíduos líquidos. En: Cereda, M. ed. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. Ed. Fundação Cargill. (São Paulo). p.191.
6. FULTHORPE, R.; LISS, S.; ALLEN, D. 1993. Characterization of bacteria isolated from a bleached kraft pulp mill wastewater treatment system. *Can. J. Microbiol.* 39:13-24.
7. GERMIRLI, F.; ORHON, D.; ARTAN, N. 1991. Assessment of the initial inert soluble COD in industrial wastewaters. *Wat. Sci. Tech.* 23:4-6.
8. GERNAEY, K.; VANROLLEGHEM, P.; LESSARD, P. 2001. Modeling of a reactive primary clarifier. *Wat. Sci. Tech.* 43:73-82.
9. GRADY, C.; DAIGGER, G.; LIM, H. 1999. Biological wastewater treatment. Ed. Marcel Dekker (New York). p.48, 161.
10. GUELLIL, A.; THOMAS, F.; BLOCK, J.; BERSILLON, J.; GINESTET, P. 2001. Transfer of organic matter between wastewater and activated sludge flocs. *Water Res.* 35:143-150.

11. GÜJER, W.; HENZE, M.; MINO, T.; MATSUO, T.; WENTZEL, M.; MARAIS, G. 1995. The activated sludge model No. 2: Biological phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* 31:1-11.
12. HU, Z.; CHANDRAN, K.; SMETS, B.; GRASSO, D. 2002. Evaluation of a rapid physical-chemical method for the determination of extant soluble COD. *Water Res.* 36:617-624.
13. IBARRA, D.; CAMARERO, S.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. 2006. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *J. Chem. Technol. Biot.* 81:1159-1165.
14. INSEL, G.; GÜL, K.; ORHON, D.; VANROLLEGHEM, P.; HENZE, M. 2002. Important limitations in the modeling of activated sludge: biased calibration of the hydrolysis process. *Wat. Sci. Tech.* 45:23-36.
15. LAGARDE, F.; TUSSEAU-VUILLEMIN, M.; LESSARD, P.; HÉDUIT, A.; DUTROP, F.; MOUCHEL, J. 2005. Variability estimation of urban wastewater biodegradable fractions by respirometry. *Water Res.* 39:4768-4778.
16. LEVINE, A.; TCHOBANOGLOUS, G.; ASANO, T. 1985. Characterization of the Size Distribution of Contaminants in Wastewater: Treatment and Reuse Implications. *Water Pollut Control Fed.* 57:805-816.
17. MATHIEU, S.; ETIENNE, P. 2000. Estimation of wastewater biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various  $S_o/X_o$  ratios. *Water Res.* 34:1233-1246.
18. MELCER, H. 2003. Methods for wastewater characterization in activated sludge modeling. Ed. IWA Publishing (London). p.C-2.
19. ØDEGAARD, H. 1998. Optimised particle separation in the primary step of wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 37:43-53.
20. ORHON, D.; ARTAN, N.; CIMSIT, Y. 1989. The concept of soluble residual product formation in the modelling of Activates Sludge. *Wat. Sci. Tech.* 21:339-350.
21. ORHON, D.; ATES, E.; SÖZEN, S.; ÇOKGÖR, E. 1997. Characterization and COD fractionation of domestic wastewaters. *Environ Pollut.* 95:191-204.
22. ORHON, D.; ÇOKGÖR, E. 1997. COD Fractionation in Wastewater Characterization—The State of the Art. *J. Chem. Technol. Biot.* 68:283-293.
23. ORHON, D.; KARAHAN, Ö.; SÖZEN, S. 1999a. The effect of residual microbial products on the experimental assessment of the particulate inert COD in wastewaters. *Water Res.* 33:3191-3203.
24. ORHON, D.; TAŞLI, R.; SÖZEN, S. 1999b. Experimental basis of activated sludge treatment for industrial wastewaters—the state of the art. *Wat. Sci. Tech.* 40:1-11.
25. PARK, J.K.; WANG, J.; NOVOTNY, G. 1997. Wastewater characterization for evaluation of biological phosphorus removal. Wisconsin Department of Natural Resources, Res. Report 174. p.6.
26. POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater-a review. *Sci. Total Environ.* 333:37-58.
27. SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K. 2009. Deployment of *Trichoderma harzianum* WL1 laccase in pulp bleaching and paper industry effluent treatment. *J. Clean. Product.* 18:799-806.
28. SOLLFRANK, U.; KAPPELER, J.; GÜJER, W. 1992. Temperature effects on wastewater characterization and the release of soluble inert organic material. *Wat. Sci. Tech.* 25:33-41.
29. SIVILAMPI, J.; RINTALA, J. 2003. Thermophilic aerobic wastewater treatment, process performance, biomass characteristics, and effluent quality. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2:35-51.
30. TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F.; STENSEL, H. 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse. Fourth Edition Metcalf and Eddy, Inc. Ed, McGraw-Hill. (Boston). p.96.
31. TEBBUTT, T. 1979. Primary sedimentation of wastewater. *Water Pollut Control Fed.* 51(12):2858-2867.
32. THOMPSON, G.; SWAIN, J.; KAY, M.; FORSTER, C. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Biores. Technol.* 77:275-286.
33. TSANG, Y.; HUA, F.; CHUA, H.; SIN, S.; WANG, Y. 2007. Optimization of biological treatment of paper mill effluent in a sequencing batch reactor. *Biochem. Eng. J.* 34:193-199.

34. VERET, S.; GALISTEO, M.; SENDIC, M. 2000. Evaluación respirométrica de la biodegradabilidad aeróbica de un efluente de curtiembre. En: XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre, 3 – 8 Diciembre 2000. I-184.
35. VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. 2005. Biological wastewater treatment in warm climate regions, Ed. IWA Publishing (London). p.564-572.
36. WENTZEL, M.; MBEWE, A.; LAKAY, M.; EKAMA, G. 1999. Batch test for characterisation of the carbonaceous materials in municipal wastewaters. *Water S. A.* 25:327-336.
37. XIA, W., LI, J.; ZHENG, X. 2008. Biodegradability Assessment of Industrial Wastewater by Warburg Respirometer. En: *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008. ICBBE 2008. The 2nd International Conference on Shanghai, 16-18 Mayo 2008.* 3738-3740.

Recibido: Noviembre 20 de 2011

Aceptado: Agosto 13 de 2012

# LAS FORMAS DE ORIENTACIÓN ESPACIAL DE LOS PESCADORES DE BUENAVENTURA, COLOMBIA

## SPATIAL ORIENTATION FORMS OF FISHERMEN BUENAVENTURA, COLOMBIA

Armando Aroca Araújo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Licenciado en Matemáticas y Física. Magíster en Educación Matemática. Profesor Asistente, Universidad del Valle. aroca@etnomatematica.org

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 457 - 465, 2012

### RESUMEN

Se presentan algunos avances de una próxima publicación de un libro intitulado “Etnografía del saber matemático de los pescadores de Buenaventura. Pacífico colombiano”. Aunque el propósito fundamental es mostrar las formas de ubicación espacial que emplean los pescadores antes y durante de sus faenas de pesca, en el análisis también se indican aproximaciones a otros procesos y pensamientos matemáticos, como el métrico y numérico, que emplea dicha comunidad.

Palabras clave: Orientación espacial, referentes naturales y artificiales de ubicación, configuración marina.

### SUMMARY

Some progress in a forthcoming publication of a book entitled “Ethnography of mathematical knowledge of fishermen from Buenaventura. Colombian Pacific” is presented. Although, the main purpose is to display the forms of spatial location used by fishermen, before and during their fishing operations, the analysis also shows approaches to other processes and mathematical thoughts, as the metric and numerical, which is used by the community.

Key words: Spatial orientation, natural concerning location, artificial concerning location, marine settings.

### INTRODUCCIÓN

Una historia lacónica de la llegada del afro colombiano hasta la creación del oficio de la pesca: La población afro colombiana, según Jaramillo (1969), provino de los pueblos de Guinea de la cuenca del Senegal, del Níger y del Sudán.

Desde allí fueron traídos, principalmente, al puerto de Cartagena, además de los de Santa Marta y de Riohacha. Luego fueron llevados por el río Magdalena, subidos por el río Cauca, hasta llegar a Santiago de Cali y Popayán. Se considera que los primeros africanos esclavizados tenían conocimientos en la metalurgia del hierro, el bronce y ganadería vacuna y no mucho, en la pesca. En el Nuevo Reino de Granada, parte de los pescadores eran los indígenas que habitaban la costa pacífica. Esos habilidosos pescadores, según Palacios (1989), eran pertenecientes a la familia lingüística de los caribes. El negro liberto aprendió no solo la habilidad de los indígenas para pescar, sino también los conceptos y las estrategias del español. Hubo, entonces, un mestizaje procedimental y conceptual.

Adaptando a Aprile-Gnisset (2002), en 1878, las obras portuarias o ferroviarias en Buenaventura crearían la clase trabajadora, conformada por afro colombianos y se configuró un mapa más complejo de oficios, cada uno con formas de analizar, razonar o abstraer diferentes, con técnicas y herramientas diversas. Esto trajo, en aquel tiempo, migraciones y varios se dispersarían en diversos oficios, creándolos a partir del entorno social, cultural o geográfico y optimizarían otros de conocimiento sea personal o comunitario, entre ellos la misma pesca. Interpretando a Lunkes (2004), Machado *et al.* (2004), François & Kerkhove (2010), D'Ambrosio (2011), ésto, implicaría soluciones de problemas, de invención, de fantasía y de imaginación, de adaptación o implementación de herramientas, de procesos de razonamiento y abstracción que las anteceden, de creación de técnicas para hacer el menor esfuerzo y de creación de palabras para acciones o referirse a nuevos sustantivos, nacerían así nuevas etnomatemáticas. La etnomatemática del pescador del pacífico colombiano.

Los pescadores, al tener como reto la captura de diferentes peces marinos y marisco con conchas, codificaron

el mar para este propósito. Pues fue la captura de las diversas especies que les impondría los retos de ubicarse, espacialmente, para no perderse. Entonces, la comunidad paulatinamente codificó el mar y creó su propia realidad, tal como lo plantea Berger (1993). Si las prácticas y saberes individuales o colectivos que iban apareciendo como producto de la resolución de problemas eran óptimas para la comunidad, se instalaban hasta que una mejor técnica o tecnología surgiera.

En el intercambio cultural, habrán aprendido de los indígenas cuáles serían las mejores maderas para elaborar canoas o potrillos y los canaletes o remos. Bastaría que un solo individuo observara, experimentara y luego reprodujera, desarrollando la experticia, que después la comunidad reconocería. Habrán aprendido las primeras formas de pescar y aprovecharían las técnicas, la simulación o adaptación de la tecnología utilizadas por los españoles. Sin duda, un individuo tendría la idea de cuestionar algunos métodos y propondría otros. Al ir progresivamente entrando en las profundidades del mar y en trayectos mayores a un día, harían mechones para ir alumbrando en las noches; entenderían el comportamiento del mar, se darían cuenta que si tiraban la red en cierta profundidad solo atrapaban ciertos peces; que podrían seguir pescando, sin estar presentes, con anzuelos si los dejaban flotando o anclados, o tirando trasmallos que quedarían a merced de la corriente del mar. Verían, cada vez que las nubes lo permitieran, pues estaban en la región más lluviosa del país y una de las principales a nivel mundial, algunas estrellas que salen de tal parte y se mueven hacia cierto sitio y le asignarían, entonces, un referente de orientación, como lo harían con el sol, la luna y las estrellas. Se percatarían que el mar siempre tiene una ola que los empuja hacia las orillas y que cuando la lancha la toma de frente parece como si chocara contra ella cada dos segundos y la proa se levanta, pero que si se coloca a favor sentirían un deslizamiento pausado y tranquilo; sin embargo, también conocerían que es mar afuera esta dirección a veces es caótica y se necesitaría mucha experticia, o sea, la práctica, para poder leer las olas y saber cuál manda a tierra. Advertirían la necesidad de interpretar muy bien los nubarrones que son típicos y únicos de esta parte del mundo. Codificarían, de igual manera, las diversas direcciones del viento. Notarían que la marea cada tantos días se comporta de una manera y que para salir en lancha hacia mar afuera tomarían la séptima ola y tomando así el impulso del mar. Comprenderían, progresivamente, cuatro dimensiones para la orientación. Delimitarían sus rutas de navegación por las redes, los cabos y trasmallos, las boyas, las rutas comerciales, la basura flotante, las luces artificiales y los buques, hasta poder crear un oficio con una diversidad de estrategias, de técnicas, de herramientas y de lenguaje muy ricos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación, se desarrolló en el marco del Seminario de Formación en Etnomatemáticas, que se oferta en la Universidad del Valle, con sedes en Buenaventura y Cali. Fueron en total dos visitas colectivas, en compañía de estudiantes y más de veinte personales, que se realizaron desde el periodo 2010A hasta el 2012A. La investigación tuvo en cuenta, tal como se hizo en Rey & Aroca (2011), en Goetz & LeCompte (1998), más en Deslauriers (2005) y en Campos (1995). Por ello, se empleó una metodología que admitiera la utilización de una pluralidad de instrumentos, como entrevistas, grabaciones, fotos digitales, apuntes de campo, para comprender lo mejor posible las prácticas y los saberes de los pescadores. Fueron más de 30 entrevistas estructuradas. Estas entrevistas constaban de tres categorías de análisis, más las respectivas preguntas asociadas, entre ellas, condiciones socio-económicas de vida, sistema cultural, procesos relacionados con la actividad de la pesca y otras actividades económicas. También, se aplicó la metodología propuesta en Aroca (2008), concerniente a investigaciones desarrolladas en el marco de la descripción y el análisis de una etnomatemática. Por otro lado, se tuvo en cuenta investigaciones cuyos objetos de estudio eran similares o directamente relacionados, como los realizados por Goetzfridt (2008), quien analizó sistemas de numeración, de conteo, de medición, de clasificación, de relaciones espaciales, de simetría y de geometría, entre otros temas, de habitantes de las regiones de la Polinesia, Melanesia y Micronesia; De Vega (2005), quien analizó el sistema de navegación desarrollado por los aborígenes de Polinesia, estos dos últimos autores hicieron sus investigaciones en las costas del pacífico australiano. Chieus (2009), después de un preámbulo teórico significativo, analizó la construcción de redes de pesca de los caiçaras, que habitan la ciudad de Ubatuba, en el litoral norte paulista; Diegues (2004) planteó cómo la actividad de caza a gran escala conlleva a la conformación de comunidades humanas y Campos (1982) analizó algunas prácticas y saberes de los habitantes de la isla de los Búzios; estos tres últimos autores investigaron en costas de Brasil y aportarían para el análisis de los objetos de estudio de esta investigación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pescador tiene en cuenta cuatro dimensiones para orientarse. La figura 1 muestra cómo se encuentra inserto el pescador en esta configuración de su entorno. La dimensión 1, corresponde a la celestial o superior, que es infinita, en donde existen tres referentes universales para la orientación: el movimiento y las fases de la luna, el movimiento de las estrellas y la traslación y la rotación de la tierra en torno al sol; a esto, Campos (1982), lo llamó "relojes" naturales. La dimensión 2, corresponde a la atmosférica, que es local

o regional, pues las nubes, los aguaceros, los rayos y los vientos tienen comportamientos disímiles, según la región del mundo y tienen simbolizaciones contextualizadas, por ejemplo, que el viento del norte viene de tal lugar y conduce a otro. La dimensión 3, corresponde a la superficie del mar, donde se mezclan referentes naturales que son mundiales y otros que son simbólica o comercialmente locales; en esta dimensión, se encuentran las olas, el color del mar que, para el caso de Buenaventura, se pueden encontrar hasta cinco tonos, como marrón, amarillo, verde, azul y “tirando” a negro, como producto de las desembocaduras de ríos; las corrientes, las rutas comerciales, las basuras flotantes, los cabos, los riscos o arrecifes, los trasmallos, las boyas, las orillas, las costas, los referentes costeros naturales o artificiales, como los árboles, las montañas, el faro, las luces de caseríos, los islotes, las bocanas o esteros. La dimensión 4 es la profundidad del mar que también es local, que permite, usando el sondeo, determinar cuán lejos puede estar de la orilla y qué peces puede hallar en ese momento, como también establecer bancos de arena, riscos o pequeños arrecifes y sedimentos o basura que depositan los ríos.

El concepto de distancia: Una percepción tridimensional: El concepto más importante cuando se “marca el rumbo”, para salir a pescar, es el de la distancia. Cuando a los pescadores se les interroga por distancias recorridas ellos hablan de brazas. Un ejemplo, a varios de ellos se les hizo la siguiente pregunta: ¿qué tan lejos ha llegado usted? Y algunas de las respuestas fueron a 3, 5, 10, 15, 30 brazas. Una braza es la longitud que hay de una mano a otra con los

brazos extendidos, algunos consideran que es de dos metros y la mayoría de metro y medio, tal como lo plantean los pescadores de Brasil, descritos en Chieus (2009). Nuestra lógica, haría el cálculo de multiplicar el número de brazas por dos y daría distancias de recorrido muy pequeñas, pero un pescador manifestó que no se trataba de hacerlo así, sino de la profundidad. Aquí hay otra lógica de cálculo. En topología habría una similitud, pues daría la sensación que se trata de la distancia de un punto a un conjunto infinito de puntos, pero en este contexto, no se piensa en la linealidad sino en la profundidad y de manera funcional, porque se trata de capturar ciertos peces o mariscos con concha. En este sentido, la distancia marítima implica:

1. No va de un punto a otro punto. Va de un punto a una región que no es única, es decir, la misma región puede estar en otra parte del mar, debido a la irregularidad del fondo, tal como lo muestra la figura 2a. Pero también dicha región de fondeo podría estar fraccionada, según la figura 2b.
2. Va de un punto que, en general, está en la playa, a infinitas fracciones del mar, pero se tiene en cuenta, fundamentalmente, la profundidad de esta y el pez o marisco con concha, que habita en esa zona. De manera simbólica, sería  $D = f(p, \text{pequeño pez})$ ; donde  $D$  es la distancia recorrida en la superficie del mar,  $p$  la profundidad y  $\text{pequeño pez}$  el pez o marisco con concha que se quiere capturar.
3. El cálculo parte desde la profundidad del mar, va a su superficie que evoca regiones conocidas y, luego, se proyecta a la playa, o viceversa: cálculo en ELE. Pero cuando se está en altamar, el cálculo hasta la playa se

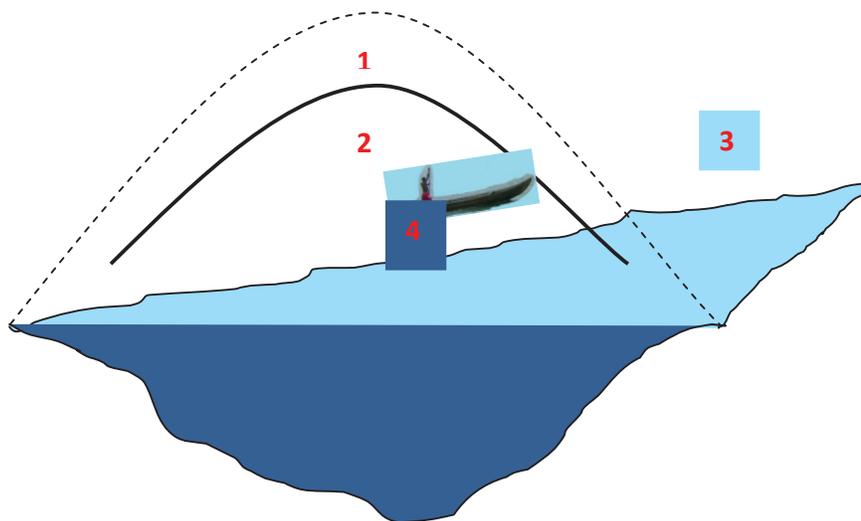


Figura 1. Inserción del pescador en cuatro dimensiones, espaciales y planas, que le sirven para su orientación. 1. **Dimensión celestial** (las estrellas, el sol y la luna); 2. **Dimensión atmosférica** (vientos y nubes, relámpagos, oscurana y tormenta); 3. **Dimensión superficial** (boyas, redes, montañas, color del mar, el sonido de las olas, los puntos de pesca, candelilla, árboles, olas, basuras flotantes, corrientes, pájaros y otros) y 4. **Dimensión profundidad** (las pozas, lo seco y lo hondo, las pegarocas filosas y palos enterrados y bancos de arena que se reflejan en la superficie del mar).

hace en unidades de tiempo, de distancia superficial o por medio de la fuerza del viento.

El sondeo es lo que finaliza la noción de medida playa → mar afuera, si el cálculo se origina desde la playa y, en algunas circunstancias, será el viento si el cálculo se hace mar afuera → playa.

Términos o expresiones que indican concepciones espaciales, métricas o numéricas: En la dimensión de profundidad, la braza es uno de los conceptos más importantes en la pesca. Lo interesante es cómo relacionan las brazas con el tiempo de ruta; por ejemplo, algunos pescadores establecieron que 10 brazas equivalen a 20 minutos. Esta relación se genera por el consumo de gasolina que tienen los motores fuera de borda, de no tener control en esto quedarían a la deriva. Estos casos tendrían implicaciones diferentes a las planteadas en el concepto de distancia, pues se involucra el tiempo. La braza también se relaciona con el sondeo. La sonda es un instrumento artesanal, que sirve para medir el fondo del mar y es basada en una piola de nylon y una plomada amarrada en uno de sus extremos. Sondear, entonces, es tirar la plomada al mar y medir su profundidad recogiendo la piola y midiéndola en brazas. En cuanto a la dimensión atmosférica, el mal tiempo es cuando se avecina un fuerte aguacero, mucho viento que pica al mar y la oscurana o el tiempo duro, consiste en la alta concentración de nubes o un fuerte aguacero, tronamenta y oscurana, que implica

que no se puede observar en ninguna dirección; en estas condiciones cuando cae un rayo, el pescador se encandila y se puede desorientar.

Los siguientes referentes de orientación, naturales [RN] y artificiales [RA], están dispersos en las cuatro dimensiones espaciales o planas. Están distribuidas así: celestial [solo RN], atmosférica [solo RN], superficial [RN y RA] y profundidad [solo RN]. Esto implica que la comunidad de pescadores le dio mayor simbolismo a la superficie que a las otras tres dimensiones, contrario a lo que se podría pensar que fuese la celestial o superior, pues la historia “universal” nos ha educado que los pescadores, fundamentalmente, se orientaban por las estrellas, pero eso, en una de las zonas más lluviosas del mundo, no es así.

**Referentes naturales:**

El sol, traslación de la tierra en torno a él. Movimiento y fases de la luna. Movimiento de las estrellas: La simbología otorgada al sol orienta a los pescadores, porque tiene un punto de “salida” y otro de “llegada”, relativos a lugares conocidos. En Campos (1999), se puede ver más detalles del papel de orientación del astro rey, que le han asignado en diversas culturas, como por ejemplo, lo descrito por Campos (1982), de cómo los habitantes de las Islas de Búzios, en Buenaventura y en toda la región costera del pacífico colombiano toman el comportamiento de la luna y

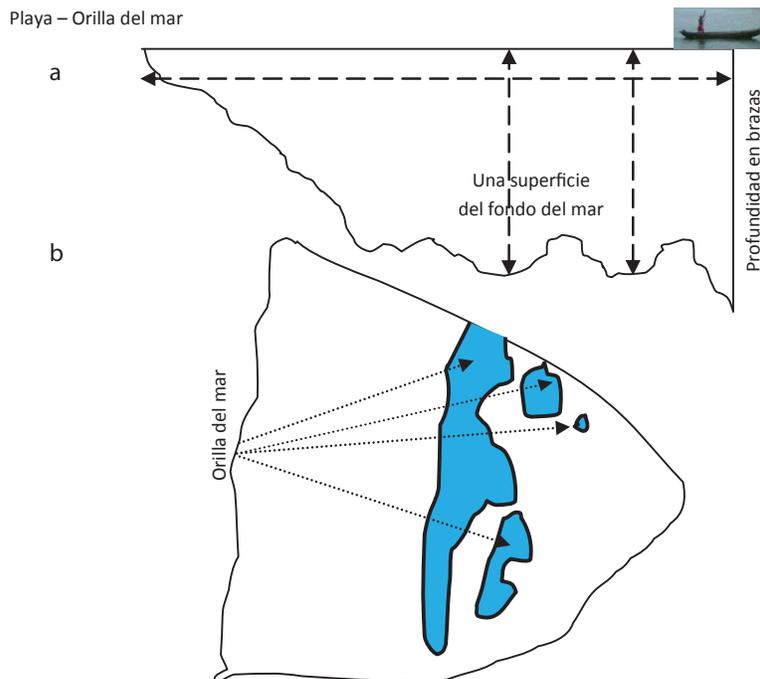


Figura 2: a) Percepción tridimensional del concepto de distancia marítima a partir de las Brazas. b) Ejemplo de varias regiones que podrían representar la misma cantidad de brazas en profundidad.

del sol para iniciar sus faenas de pescas; además de esto, lo esencial es cómo estén los “tiempos” o las “aguas”, que es una mezcla de tipo de mareas subiendo o bajando, número de días en puja o quiebra, lluvias, oscurana, tronamenta, relámpagos y vientos. Es fácil ver, entonces, a un pescador indicando con sus brazos la trayectoria del sol y trazarse un mapa mental que le permite orientarse con respecto a otros corregimientos. Además, que le sirve de reloj para hacer retornos o calado y recogida de trasmallos o cabos.

La luna tiene un comportamiento similar al del sol, solo que ésta juega su papel en determinadas horas, al igual que las estrellas. La luz de la luna ilumina y permite ver formas en las orillas que pueden ser reconocidas. Ver su trayectoria también indica una configuración del cielo, que tiene repercusiones en la construcción de un mapa mental, que se valida en la interpretación de la superficie, es decir, cuando el pescador mira para el cielo, sea a las estrellas, al sol o a la luna, si las nubes o la lluvia se lo permiten y mira sus movimientos o trayectorias está pensando en cómo están ubicados algunos lugares o referentes en la tierra. Mira para el cielo, pero piensa en la tierra. Fundamentalmente, la luz de la luna sirve cuando está en luna llena y cuando es así, permite ver claramente las orillas. Cuando hay menguante, es decir, ausencia de la luna, es mejor para la pesca. La relación que hay de la luna con el mar, es que de ella depende el comportamiento de las mareas y tiene implicaciones en cuanto al zarpe y arribo a diversos lugares.

Las olas o corrientes: Algunos pescadores piensan que para la orientación es más importante la ola que el viento, pero la mayoría piensa lo contrario. El mar tiene un único movimiento que es el mar de leva y él siempre empuja hacia la orilla. Según ellos, la ola de leva se encuentra a unas seis brazas de profundidad. Unos pescadores manifestaron que, en caso tal si se llegasen a desorientar, pues nunca se pierden, entonces apagan los motores y dejan que el mar de leva actúe y gire la lancha, quedando la proa apuntando hacia la orilla, prenden motores y trazan rumbo, que tiende a ser lineal, pues ir haciendo curvas la lancha se podría voltear. “Es mejor de frente, es mejor ir rompiendo la ola”; sin embargo, algunos pescadores hablaron del copeteo de olas, que es cuando no se puede ver la ola de leva y hay desorden de las olas y solo un pescador muy práctico la puede identificar, de lo contrario, se desorientan si solo dependen de esto. Ciertos pescadores salen a faena a pescar por varios días consecutivos cuando la marea está baja, porque se les facilita su salida y retornan cuando la marea está subiendo, así tienen la corriente a su favor. En estos fenómenos de cambio de marea, por ejemplo, en puja, se da cuando sol, luna y tierra están alineados, es decir, crece el nivel del agua. Y si es quiebra sol y luna ejercen fuerzas en direcciones diferentes sobre la tierra, baja el nivel del agua. Estos fenómenos son más visibles en la Costa del Pacífico que en la costa del Caribe colombiano, debido a

su profundidad. En la figura 3a, se muestra una lancha de viento y marea, que quedó encallada en la Bocana cuando bajó la marea y en la figura 3b, se muestran las adaptaciones arquitectónicas para enfrentar el comportamiento de la marea. Ahora, ¿qué relación tiene la puja y la quiebra con la orientación? Según varios pescadores cuando el mar está en puja puede subir alrededor de cinco brazas y, en quiebra, entre dos brazas, entonces, eso les permiten a ellos poder determinar qué tipo de peces pueden salir a buscar y qué sectores quedarían con determinada profundidad. A más de esto existe una clasificación de las aguas, entre buenas y malas, porque los pescadores llevan las cuentas o fechas de la marea, que consiste en lo siguiente. La puja y la quiebra duran, cada una, ocho días y cuando empieza la puja se inicia la pesca, que debe durar la misma cantidad de días hasta el primer día de la quiebra. Si algún pescador no tiene las cuentas, entonces, se la pregunta a otros de su confianza. Otros pescadores consideran que el mejor comportamiento del mar para pescar es la puja pequeña, porque en la puja grande pueden pescar hasta tres días consecutivos, en cambio en la puja pequeña hasta cinco. Cuando la puja es muy fuerte no es conveniente hacerlo porque la corriente submarina es tan fuerte que rompe el nylon de los trasmallos.

#### Los Vientos:

*“Cuando los vientos son para arriba el mar corre para abajo y cuando los vientos son para abajo el mar corre para arriba”.*

#### Palabras de un pescador de Punta Soldado

La mayoría absoluta de los pescadores coinciden en que los vientos son los que los ayudarían a orientarse, en caso tal de perder el rumbo. El viento, además, dependiendo de su intensidad, que se siente en el cuerpo, es relacionado con la distancia que habría desde la embarcación con la orilla; por ejemplo, si el viento pega muy fuerte, entonces, se está muy alejado de la orilla o del pueblo y si pega suave se está relativamente cerca de la costa. Se ha dicho que cuando se les pregunta a los pescadores que es lo más lejos que han llegado, ellos responden con brazas, o sea, la respuesta es con respecto a la profundidad, pero cuando se está en el mar, hablan de distancia superficial y lo que hay es un cálculo subjetivo, a partir de la percepción del comportamiento atmosférico o celestial. Es probable que exista una especie de relación biunívoca entre la intensidad del viento, que va variando con magnitudes de distancias específicas, no estrictamente hablando de una relación uno a uno, sino una relación de percepción-presión en el cuerpo de la intensidad del viento, con distancias superficiales. Aquí, sin duda alguna, la experiencia que ellos llaman la práctica y la memoria son los procesos cognoscitivos que les permite codificar la profundidad y la superficie del mar, su espacio aéreo y su entorno físico-visual y perceptivo.



Figura 3: a) Lanchas que quedaron encalladas cuando el mar entró en quiebra; b) Arquitectura de la Bocana para afrontar los cambios de la marea, sector residencial donde no llegan los turistas.

Algunos pescadores consideran que existen cuatro vientos, otros consideran que ocho y, tal vez, cada grupo tiene la razón, pues es su propia simbología, en este caso no comunitario sino grupal, estos vientos serían el del Norte, el del Sur, el del Este, el del Sureste, el del Suroeste, el del Noreste y el del Noroeste. Todos consideran que el viento del Norte es el que “manda pa’ fuera” y el viento del Sur los “trae pa’ tierra”. En esto no hubo discrepancia, pues otros

pescadores consideran que el viento del Este, al igual que el del Norte, también manda pa’ fuera y que el viento del Oeste también manda pa’ tierra. Consideran que cuando el viento sopla desde el noroeste la “marea está alta” y cuando sopla desde el sur, este o sureste la pesca es permitida, pero se ha dicho que en todo esto hay relatividad, pues estas direcciones también tienen asociaciones simbólicas que dependen del lugar donde está ubicado el caserío o corregimiento. Dado que el viento se opone al movimiento, él puede repercutir

en que el desplazamiento sea más rápido o lento, tanto si la lancha es de canaleta o de motor. Los vientos, según algunos pescadores, influyen en la dirección y en la fuerza de las corrientes y pueden formar la marejada, conllevando esto a que las embarcaciones tomen rumbos distintos. La figura 4 muestra una representación que hizo un pescador de Buenaventura, donde al hacer la representación de la dirección de los vientos no siempre coincide con la realidad.

Las costas o playas: Una playa puede ser sinónimo de caserío o de un sitio turístico, en consecuencia, si se llegaban a desorientar y la embarcación llegase a una playa, entonces, se podía encontrar un lugar de referencia para luego trazar rumbo. Las costas están llenas de accidentes geográficos que permiten ubicarse y reconocer sectores, profundidades y las simbolizaciones de cada estero, bocanas, salientes, cerros o bajos, que es la parte rocosa e inferior de cerros o peñascos, donde las olas chocan y generan particulares sonidos, con los cuales, se orientan en las noches, salientes o cerros.

Se concluye que los pescadores usan cuatro sentidos para orientarse: la vista, por obvias razones; huelen la lluvia, que no es el mismo olor que se siente en tierra, “viene la oscurana o mal tiempo”. Escuchan por las noches los golpes de las olas y cambian el rumbo de navegación o se alejan de dicho sector. Sienten en el cuerpo, en el rostro, en los brazos, en la espalda y en el abdomen la dirección del viento. ¿Los ciudadanos cuántos sentidos usamos para la orientación?

En las costas, se encuentran los esteros, que son la desembocadura de “agua de adentro”, por lo general, agua dulce y cada estero puede tener un referente de una localidad o viviendas. En un recorrido largo, se pueden ver varios esteros y lo que hacen los pescadores es contarlos mentalmente cuando es necesario y saben, entonces, cuántos hay de una localidad a otra, es como pensar cuántas cuadras hay de una casa a otra casa.

En las costas, las montañas definen formas con características singulares que son reconocibles o existe un conjunto de pequeñas montañas o árboles que están en las orillas, que configuran un referente natural de orientación inconfundible. Las montañas, los cerros o algunos árboles son un gran referente en el día, pues se pueden observar desde muy lejos, mientras la curvatura de la tierra lo permita. Sirven también para establecer desvíos, pues dependiendo de los cerros puede haber corrientes fuertes o bancos de arena que son mejor esquivar o pasar con baja velocidad a motor.

El papel de las nubes: Ellas juegan un gran papel, pero en la desorientación, pues cuando se aproxima una oscurana, se pierden los referentes, tantos naturales como artificiales y peor aún, cuando llegan acompañadas de vientos. Salvo el caso que el mal tiempo sea divisado a tiempo y se pueda cambiar el rumbo, pero esto sucede en raras ocasiones. En

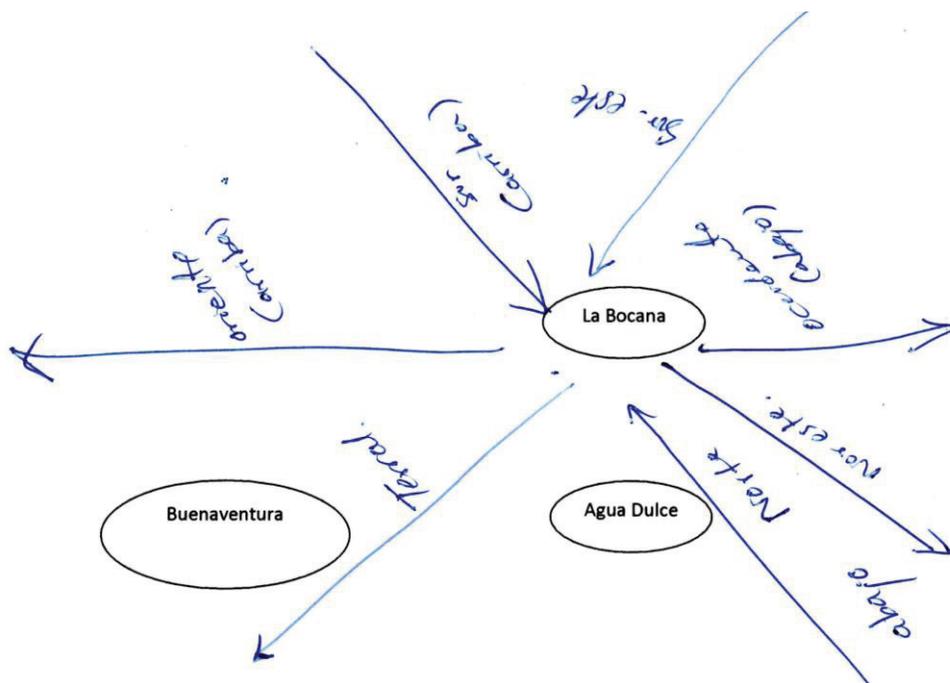


Figura 4. Representación de las direcciones de los vientos según un pescador de Buenaventura.

el pacífico colombiano casi a diario llueve y estos aguaceros no son tan sencillos de esquivar. Estas tempestades pueden generar turbulencias en el mar y pueden llegar a romper los trasmallos; no obstante, en las palabras de un pescador estaría la razón de no poderlos evitar a tiempo: “si pensáramos en el mal tiempo entonces nunca saldríamos a pescar”. En algunos casos de días nublados, no se puede observar hacia los alrededores referentes distintos al mar y las nubes, pues ellas formar una barrera circular de 360°.

El rayo, también juega un papel en la desorientación o desconcentración; cuando cae un rayo en el mar encandila más de lo habitual que si sucediera en tierra, según ellos, el rayo alumbra demasiado, porque el mar lo refleja mucho y la visión se oscurece demasiado, esto implica que mientras la pupila se vuelve a dilatar se puede perder el rumbo, pues si la lancha es a motor, tal vez haga un giro, por la falta de control. El rayo es lo más temido por los pescadores, pues creen que sus cabezas son buscadas por éstos.

#### Referentes artificiales

A algunos objetos o avances tecnológicos, los pescadores le han otorgado simbología o funcionalidad. Entre ellos, se encuentran las luces del Puerto de Buenaventura, de las casas, de los caseríos o de los buques, las cuales, no fueron diseñadas para codificar el mar. En cambio, la luz del faro sí fue concebida para orientar, es decir, tiene funcionalidad directa, al igual que las luces titilantes y nocturnas de las boyas: azules y rojas. También, existen otros artefactos que ayudan, en menor proporción, para que el pescador se oriente, como la brújula, usada por pocos, el radio teléfono o el celular.

Los colores de las boyas le indican tipos de profundidades a las tripulaciones de los barcos comerciales que llegan a Puerto, desde diferentes países, pero los pescadores artesanales también las utilizan para orientarse cuando las pueden ver. Ellos le han asignado representación propia al color de las boyas. La boya azul es mar profundo y su opuesta es la roja, la amarilla indica la entrada al puerto y la verde que se puede pescar tranquilamente. Ciertos pescadores informaron que la boya azul les servía de orientación cuando querían ir “pa arriba”, por ejemplo, a Nuquí o si querían ir “pa abajo”, el sur, para Nariño.

Desde el puerto de Buenaventura zarpan a cada momento lanchas, adscritas a diferentes empresas de transporte de pasajeros, de turistas o mercancía. La cuestión es que estas lanchas, más grandes que las usadas en la pesca artesanal, tienen unas rutas muy concretas, “tienen sus propios caminos”, es decir, contribuyen a la codificación de la superficie del mar, como zona de navegación; esto implica que los pescadores saben que en estos trayectos socio-geográficos no pueden tirar sus trasmallos o cabos o, de

igual manera, quedarse anclados, porque podría suceder un accidente. Esto lo podrían hacer en horas de la noche, cuando cesa esta actividad.

Por lo general, los pescadores dejan por varias horas sus redes en el mar, sea el trasmallo o el cabo y ellas quedan flotando, codificando así la superficie de tránsito.

La sonda es otro referente artificial de orientación, pues en la práctica los pescadores lo que hacen es tirarla y toman la medida, por ejemplo, 20 brazas; luego avanzan y, si es menor la medida o “marca seco”, entonces, según ellos, “van bien”, van para una orilla; pero si la medida es mayor, van para mar afuera. Este mecanismo se usa cuando están en mar abierto sin poder ver nada a su alrededor, solo mar y cielo, acompañado del zumbido intenso del viento o cuando quedan atrapados por una oscurana.

A manera de conclusión, se podrían ver diversas situaciones. La primera que, una vez más, se valida que el pensamiento matemático es cultural y son muchos tipos diferentes de pensamientos matemáticos. En consecuencia, no hay una sola matemática, se podría, incluso, decir que existen tantas matemáticas como grupos culturales o sociales diferenciados existan. La segunda es el análisis de los posibles aportes que hacen este tipo de matemáticas a la educación matemática. Por ejemplo, ¿cuál es la relación del desarrollo del pensamiento métrico y espacial escolar con la cotidianidad de los niños y de las niñas?, ¿cómo la enseñanza del Sistema Métrico Decimal puede dar cuenta de estos conocimientos?, ¿de qué manera el profesor de matemáticas enfrenta este tipo de situaciones a-didácticas, en particular, la relación disyunta que existe entre las formas de ubicación espacial urbana que está dada por calles, por carreras, por avenidas y la forma de ubicación espacial marina, dada por vientos, por sondeos, por movimientos de astros, entre otros?

**Agradecimientos:** A los pescadores de Buenaventura, la Bocana y Punta Soldado y a la Universidad del Valle. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado por el autor, quien declara ser el único autor y que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Financiación:** Los costos personales estuvieron a cargo del autor, mientras que una de las dos visitas colectivas se hizo con ayuda de la Universidad del Valle, la otra fue con recursos propios de los estudiantes, de la sede de Buenaventura.

## BIBLIOGRAFÍA

1. APRILE-GNISET, J. 2002. Génesis de Buenaventura. Universidad del Pacífico – Buenaventura. Artes gráficas del Valle. Cali. 534p.

2. AROCA, A. 2008. Una propuesta metodológica en etnomatemáticas. *Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient.* 11(1):67-76.
3. BERGER, P. 1993. *La construcción social de la realidad.* Ed. Amorrortu editores. (Argentina). 233p.
4. CAMPOS, M. 1999. *SULear vs NORTEar: Representações e apropriações do espaço entre emoção, empiria e ideología.* Programa de Estudos Interdisciplinares de Comunidades e Ecologia Social. EICOS - Instituto de Psicologia - UFRJ/UNESCO. Disponible desde Internet en: <http://www.sulear.com.br/texto03.pdf> (con acceso 14/09/2011)
5. CAMPOS, M. 1995. *Sociedades e Natureza: Da etnociência à etnografia de saberes e técnicas.* Disponible desde internet en <http://www.sulear.com.br/texto04.pdf> (con acceso 15/11/11).
6. CAMPOS, M. 1982. *Saber mágico, Saber Empírico e outros Saberes na Ilhas dos Búzios.* En: A. Eulalio. (Org.). *Caminhos cruzados. Linguagem, Antropologia e Ciências Naturais.* Brasil: Ed. Brasiliense S.A. p.23-32.
7. CHIEUS, G. 2009. *A braça da rede, uma técnica caiçara de medir.* *Rev. Latinoam. Etnomat.* 2(2):4-17.
8. D'AMBROSIO, U. 2011. *Uma Síntese Sociocultural da Historia da Matematica.* Ed. PROEM. (Brasil). 96p.
9. DESLAURIERS, J. 2005. *Investigación cualitativa. Guía práctica.* 2ª Ed. Papiro. (Colombia). 143p.
10. DE VEGA, M. 2005. *El arte de navegar de los polinesios.* Disponible desde internet en: [http://www.wikilearning.com/articulo/el\\_arte\\_de\\_navegar\\_de\\_los\\_polinesios-el\\_arte\\_de\\_navegar\\_de\\_los\\_polinesios/7301-1](http://www.wikilearning.com/articulo/el_arte_de_navegar_de_los_polinesios-el_arte_de_navegar_de_los_polinesios/7301-1) (con acceso 20/10/2011).
11. DIEGUES, C. 2004. *A Pesca Construindo Sociedades* Ed. NUPAUB-USP. (Brasil). 315p.
12. FRANÇOIS, K.; KERKHOVE, B. 2010. *Ethnomathematics and the philosophy of mathematics (education).* En: Löwe, B.; Müller, T. (eds.) *PhiMSAMP. Philosophy of Mathematics: Sociological Aspects and Mathematical Practice.* Ed. College Publications. (London). p.121-154.
13. GOETZ, J.; LeCOMPTE, M. 1998. *Etnografía y Diseño Cualitativo en investigación educativa.* Ed. Morata. (Madrid). 280p.
14. GOETZFRIDT, N. 2008. *Pacific Ethnomathematics. A Bibliographic Study.* Ed. University of Hawaii Press (Honolulu). 319p.
15. JARAMILLO, J. 1969. *La controversia jurídica y filosófica librada en la Nueva Granada en torno a la liberación de los esclavos y la importancia económica-social de la esclavitud en el siglo XVIII.* *Rev. An. Col. Hist. Soc. Cult..* 4:63-86.
16. LUNKES, A. 2004. *Etnomatemáticas: sobre a pluralidade nas significacoes do programa etnomatemática.* En: Machado, J.; Santos, M. Ferreira, R. (eds). *Etnomatemática: Papel, valor e significado.* Ed. Zouk (Sao Paulo). p.75-87.
17. MACHADO, J.; SANTOS, M.; FERREIRA, R. 2004. *Etnomatemática: Papel, valor e significado.* Zouk. (San Pablo). 287p.
18. PALACIOS, J. 1989. *Nueva Historia de Colombia Vol. 1. La esclavitud y la sociedad esclavista.* Ed. Planeta Colombiana Editorial. p.168-170.
19. REY, M.; AROCA, A. 2011. *Medición y estimación de los albañiles, un aporte a la educación matemática.* *Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient.* 14(1):137-147.

Recibido. Enero 15 de 2012

Aceptado: Agosto 28 de 2012

# ION MOBILITY SPECTROMETRY: HISTORY, CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS

## ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA: HISTORIA, CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES

Roberto Fernández-Maestre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Licenciado en Biología y Química, Doctor en Química Analítica, Docente del Programa de Química, Campus de Zaragocilla, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia. rfernandezm@unicartagena.edu.co

Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 467 - 479, 2012

### SUMMARY

Ion mobility spectrometry (IMS) is an analytical technique that separates ions in the gas phase. Ions are separated at atmospheric pressure under the influence of an electric field, according to their size and shape. IMS is the best choice for detection of narcotics, chemical and biological warfare agents and explosives in airports and customs. IMS can detect almost anything that can be ionized and has been applied to the analysis from the lightest elements such as helium to the most complex mixtures such as proteomes, metabolomes and complete organisms such as bacteria, chiral separations, and structure determination. Although since 2000 there have been approximately fifty reviews of IMS, this review is probably the only general valuation of this technique since then.

Key words: Ion mobility spectrometry, gas-phase ions, reduced mobility, ion sources.

### RESUMEN

La espectrometría de movilidad iónica (IMS) es una técnica analítica que separa iones en fase gaseosa. Los iones son separados a presión atmosférica bajo la influencia de un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y forma. IMS es la mejor opción para detectar narcóticos, agentes químicos y biológicos de guerra, y explosivos en aeropuertos y aduanas. IMS puede detectar casi cualquier cosa que pueda ser ionizada y se ha aplicado al análisis de elementos ligeros como el helio, mezclas más complejas como proteomas, metabolomas y organismos completos, tales como bacterias, separaciones quirales, y la determinación de estructuras. Aunque desde el año 2000 se han presentado aproximadamente cincuenta revisiones de la IMS, la presente es probablemente la única en evaluar este tema de manera general desde esa fecha y es probablemente la primera en publicarse en una revista latinoamericana.

Palabras clave: Espectrometría de movilidad iónica, iones gaseosos, movilidad reducida, fuentes de ionización.

### INTRODUCTION

Ion mobility spectrometry (IMS) is an atmospheric pressure technique for trace analysis of gas-phase analytes. IMS separates ions in an electric field in the presence of an inert gas on the basis of their mobilities, a measure of the size-to-charge ratio of an ion. IMS can be used for selective detection of ions after a chromatographic separation, for pre-separation of ions before mass spectrometry or, as a stand-alone instrument. Ions of organic or inorganic compounds, elements, particles and organisms can be detected. IMS is especially sensitive to organic compounds such as illicit drugs, chemical and biological warfare agents and explosives. Analysis can be carried out in a matter of seconds; this is the reason why IMS is the technique of choice to detect these materials at customs and in airports and has a wide use in military applications.

**History:** Ernest Rutherford measured the mobility of ions formed by x-ray ionization (1897) and characterized the ions using ion mobilities (1899). During the first three decades of the 20th century, there was a strong interest in mobility studies and a large body of theory on ion kinetics and experimental data was compiled. In that period, the effect of collisions, attractive forces, temperature, pressure, accelerating voltage, and contamination on mobilities were recognized (Langevin, 1903).

In the 30's and 40's, the interest for ion mobility declined due the introduction of mass spectrometry, which was free of the complicated reactions present at the pressures used for mobility studies. The period 1948-1970 has been mentioned as foundational studies (Eiceman & Karpas, 2005); a number of theoretical studies in ion mobility by Mason & Schamp (1958) and McDaniel (1964) were conducted in this period,

creating the base of modern IMS. In this epoch, there was a renewed interest in mobility studies made known by: a) primitive ion detectors, used by military forces during and after world war II for the detection of fuel from submarines, and other applications (Eiceman & Karpas, 2005); b) an ionization anemometer, invented by Lovelock in 1948, that was sensitive to organic vapors (Lovelock & Wasilewska, 1949) which opened the possibility of using mobility instruments for chemical analysis; and c) the construction of suitable drift tubes, such as that of Albritton and McDaniel, similar to modern drift tubes (Albritton *et al.* 1968).

IMS was introduced as an analytical tool by Cohen & Karasek (1970). In an ion mobility spectrometer, organic molecules are ionized and driven by an electric field against a counterflow of neutral drift gas. In their way to the detector, the ions collide multiple times with the drift gas, which reduce their speed. After each collision, ions are accelerated again by the imposed field. The alternation of accelerations and collisions results in a constant average ion velocity that depends on the ion charge, mass, and collision cross section. This dependence allows the identification of the ions by their arrival time at a downfield detector (St. Louis *et al.* 1989).

The second edition of a book on IMS is available (Eiceman & Karpas, 2005) and several IMS reviews have been published. Márquez-Sillero *et al.* (2011) assessed environmental applications of IMS, the analytical tools developed to solve the limitations regarding selectivity and sensitivity and its coupling to other detection systems; IMS coupled to gas chromatography for the sensitive and selective detection of compounds after chromatographic separation was reviewed by Kanu & Hill (2008); gas chromatography-IMS has proved versatile for the sensitive and selective detection of compounds, especially complex mixtures in difficult matrices; Kanu *et al.* (2008) compared and contrasted several types of ion mobility–mass spectrometers and described their advantages for application to a wide range of analytes; Johnson *et al.* (2007) evaluated IMS potentials in space exploration including IMS in manned space flight, the International Space Station Volatile Organic Analyzer, IMS in robotic space exploration, potential extraterrestrial missions and current/future directions and development. Finally, Weis (2005) reviewed IMS in combination with quantum chemical calculations to determine the structure of cluster ions of metals and semi-metals; they found that clusters of less than 100 atoms show a rich variation in shape as function of the number of atoms. Other review focused on ion sources (Guharay *et al.* 2008) and most others on the study of large macromolecule interactions and structure elucidation.

IMS main advantages and disadvantages are presented in table 1.

**Instrumentation:** The ion mobility spectrometer consists of three basic units kept at atmospheric pressure: an ionization source and an ion drift tube (Figure 1) maintained at either a positive or at a negative uniform electric field gradient, and a detector. Ions produced in the ionization source are accelerated down the electric field where they are separated according to their mobilities in a countercurrent flow of inert gas.

**Ion sources:** Ionization methods to convert molecules into ions to be separated in the drift tube in IMS include  $^{63}\text{Ni}$   $\beta$  ionization (Cohen & Karasek, 1970), photoionization (Baim *et al.* 1983), laser ionization (Lubman & Kronick, 1982a), corona spray ionization (Tabrizchi & Rouholahnejad, 2004), electrospray ionization (McMinn *et al.* 1990), and other sources (Gunzer *et al.* 2010). The most used are  $^{63}\text{Ni}$   $\beta$  and electrospray ion sources.

Vapors of analyte in the ionization region are ionized directly (MALDI, UV, and laser ionization) or by reaction of the analyte with reactant ions produced by the ionization source through a series of charge transfer reactions ( $^{63}\text{Ni}$   $\beta$ , corona discharge, chemical, and electrospray ionization). The reactant ion is  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$  when dry nitrogen (5–10 ppm of  $\text{H}_2\text{O}$ ) is used as the drift gas, where  $n$  is 1–4 depending on the moisture and temperature; when air is used as the drift gas,  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$  and  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{O}_2^-$  or  $(\text{H}_2\text{O})_n(\text{CO}_2)_m\text{O}_2^-$  are the reactant ions for positive and negative ion detection, respectively (Hill & Simpson, 1997).

**Radioactive sources:** The  $^{63}\text{Ni}$  foil, the ion source of the first mobility spectrometers, is a secondary ionization source analogous to that found in an electron capture detector. Ionization in this source is produced by the emission of electrons from the radioactive source with average energies of 19 keV. These electrons collide with neutral molecules of analyte or drift gas and ionize them by a series of charge transfer reactions.  $^{63}\text{Ni}$  response is nonlinear, and like other charge transfer ionization sources (corona discharge and chemical ionization), reactant ions can undergo interfering reactions with contaminating compounds. These contaminating compounds include chromatographic column bleed compounds and components in the sample mixture. As reactant ions are depleted by these competing reactions, response to the compound of interest becomes erratic or is eliminated (Baim *et al.* 1983). Other radioactive isotope less frequently used is  $^{241}\text{Am}$ , that emits more energetic electrons that can exceed 5 MeV (Guharay *et al.* 2008). An advantage of radioactive sources is that they do not require a power supply and, consequently, are suitable for portable instruments. Disadvantages are radioactive contamination due to wrong manipulation, the need to supply the samples in vapor phase, and bureaucratic complications due to governmental regulations.

Table 1: Advantages and disadvantages of IMS.

Advantage/ characteristic	Disadvantages	Comment
Atmospheric pressure operation	Contamination by atmospheric vapors	Simple and inexpensive due to the absence of vacuum pumps
Efficient ionization vapor-phase organic or inorganic molecules, atoms, or particles	Complex spectra and interferences due to widespread ionization	Almost a universal technique
Selectivity based on proton affinity or ionization potential of analytes	Low proton affinity or ionization potential compounds are hard to detect	Many available sources allow ionization of different analytes
Gas-phase ion separation	Not suitable for non- volatile analytes	
Separation based on collision cross sections	Size and shape are not specific qualities	A second dimension of separation for techniques such as mass spectrometry
Portability, miniaturization and mechanical robustness		Field and harsh environments applications
Fast and sensitive analyses (in the millisecond time range)	Fast electronics are required	Monitoring of reactions, production and detection of explosives, drugs and the like in airports and customs
Low cost of acquisition and operation		A bench-top mobility spectrometer costs five times less or more than a chromatography instrument
IMS protects the MS interface		Noise is reduced by limiting the material that enters the mass spectrometer
	Limited linear range	Sample size must be carefully managed to avoid saturation
Possibility to increase sensitivity by use of Fourier transform IMS	Short duty cycle due to pulsing ions into the drift tube, 1% or less of the analysis time	Sensitivity could be higher without pulsing
Overlapping analytes can be separated changing the buffer gas/ solvent	Different responses with various buffer gases and with sample solvents (St. Louis <i>et al.</i> 1990)	Experimental conditions must be carefully reproduced to repeat experiments
	Reproducibility of reduced mobilities within 1-2 %	

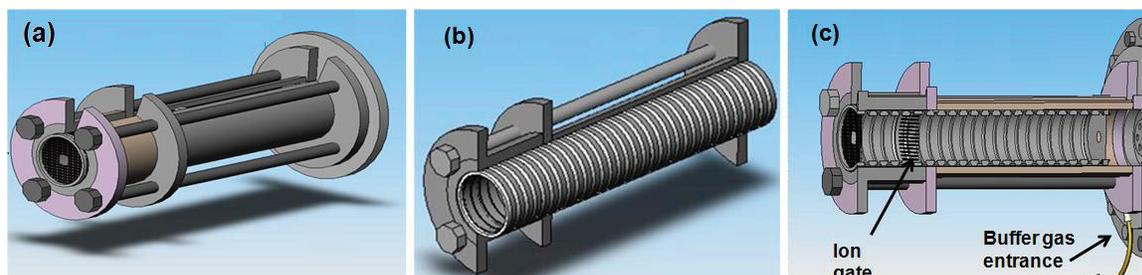


Figure 1. (a) drift tube of an Ion mobility spectrometer; (b) guard rings inside the drift tube; c) section view.

**Electrospray Ionization:** The development of electrospray ionization (ESI) was successfully introduced to IMS by Hill and greatly expanded the range of compounds that could be analyzed by IMS (Hallen *et al.* 1989). In the ESI process, a high electric potential is applied to the needle of the sample injection syringe, which creates electric charges. Electrospray occurs when the sample liquid is drawn by a coulombic force from the needle toward the target electrode (target screen, Figure 2) that is held at a lower voltage ( $\sim 3.5$  kV). As it travels toward the target electrode, solvent evaporates leaving increasingly charged droplets that 'explode' due to coulombic repulsion. This process produces droplets of increasingly smaller radius, ideally culminating in molecular ions (De Hoffmann & Stroobant, 2001). Electrospray sources are ideal for liquid samples and non-volatile high molecular weight analytes. Electrospray is a soft ionization source that yields simple spectra with no fragmentation where the molecular weight can be easily determined when coupling IMS to mass spectrometry. The use of electrospray IMS as a separation and detection device has been demonstrated for explosives (Asbury *et al.* 2000), chemical warfare degradation products (Rearden & Harrington, 2005), and biological mixtures (Valentine *et al.* 1998).

**Secondary electrospray ionization:** (SESI) was first introduced to IMS by Hill in 2000 (Wu *et al.* 2000). In SESI, a usual ESI device produces solvent ions that, acting as reactant ions, ionize liquid or gaseous analytes. SESI-IMS-MS has been applied to the detection of illicit drugs, where it was found to be more sensitive than ESI-IMS-MS (Wu *et al.* 2000). SESI allows easy and fast sampling by applying jets of ions with a probe and picking up the secondary ions with a second probe to specific sites on a surface; therefore, SESI can sample difficult-to-access surfaces, organelles on a cell and map and image surfaces. SESI also allows semi non-

destructive analysis to evaluate valuable objects since the jet of ions exerts negligible damage to sampled objects.

**Corona-spray and corona-discharge ionization:** In corona ionization, a high electric field is applied to the electrospray needle tip and the bath gas surrounding the needle ionizes. These ions react with neutral molecules, which may evaporate from the liquid at the needle tip. Applications of corona ionization include  $O_2$  generation (Sabo & Matejcik, 2011) and detection of volatile organic compound (Boggio *et al.* 2011). Corona -spray and corona discharge are alternatives to conventional radioactive ionization; the high power consumption of DC corona discharge becomes one of the limits to usefulness in portable IMS systems for which a short pulsed corona discharge source has been developed (Yuan *et al.* 2005).

**Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI):** MALDI was first coupled to IMS by 1990 (Wytenbach *et al.* 1996). In MALDI, macromolecules such as proteins or DNA strands are dissolved in a solution of a small organic molecule (matrix). The solution is dried on a target and a laser pulse is applied. The matrix absorbs the laser pulse and sublimates carrying some analyte. Singly charged protonated molecules are produced during the sublimation or in the gas phase, making the analysis simpler and potentially more sensitive (De Hoffmann & Stroobant, 2001). MALDI is ideal for the determination of molecular weights and analysis of macromolecules since it does not fragment analytes.

**Photoionization sources:** These sources use photoionization lamps and lasers. Photoionization is achieved through the use of a short wavelength UV lamp and is an inexpensive, practical alternative to laser sources for use in an ion mobility GC detector for aromatic and other unsaturated organic

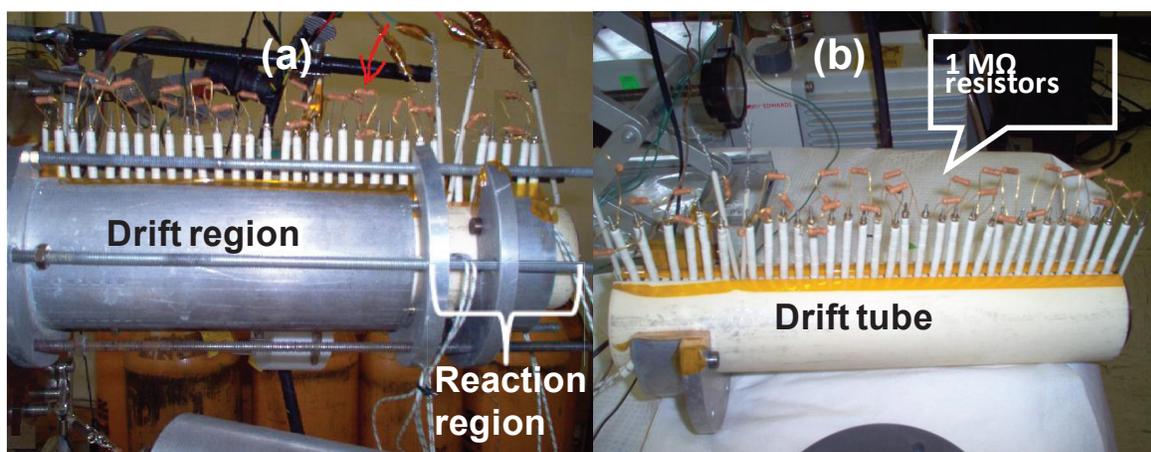


Figure 2. Mobility spectrometer showing the heating case and the drift tube inside. The electric contacts of the rings emerge from the drift tube lineal aperture on top.

compounds; their major advantage is that, by adjusting the wavelength, the analyst can selectively ionize predetermined compounds; other advantages includes the lack of reactant ions enabling the use of the entire Ion mobility spectrum from 0 to 20m for observation of analyte ions (Baim *et al.* 1983). Ultraviolet light from a NdYAG pulsed and ArF excimer lasers was used by Lubman & Kronick (1982b) at atmospheric pressure as ionization sources in an ion mobility spectrometer; they found advantages such as the production of only one peak, the molecular ion or  $MH^+$ , reducing the problem of multiple peaks occurring in IMS, great sensitivity, i.e., at least down to 1 ppb for benzene, and additional means of discrimination by the use of a particular wavelength. Disadvantages of UV lamps are the moderate energies supplied that limit the ionization and the types of compounds analyzed.

**Drift tube:** In the drift tube, ions are separated by an electric field before entering the detector. The following description corresponds to a traditional drift tube: the drift tube is usually made of a series of stainless-steel guard rings between insulating quartz, glass, or ceramic rings (99.5%  $Al_2O_3$ ), stacked on top of one another to form a completely enclosed tube (Figure 1). Each guard ring is connected to the next one in series through 1-M $\Omega$  or 0.5 M $\Omega$  resistors (Figure 2). A high electrical potential ( $\sim 12$  kV) is placed on the first guard ring, the target screen, to produce a 200-400 V/cm field throughout the drift tube (Fernández-Maestre *et al.* 2010a); alteration of the length of the ion separation region by addition or removal of stainless steel rings is possible. The rings are held inside a ceramic tube (Figure 2b) that has an aperture all along its length to introduce the electric contacts of the rings; this ceramic tube is housed inside an aluminum oven for heating (Figure 2a). Previous IMS designs used round insulator beads, which produced large apertures between the guard rings; this open design allowed undesired neutral species or radicals in the tube; the introduction of the close design.

**Ion gates:** Once the gas-phase ions are formed in the ionization source, they are directed by the electric field down the drift tube toward the detector. On their way, they encounter sets of parallel wires that prevent the ions from continuing their migration through the spectrometer. These sets of parallel wires are called ion gates. The entrance ion gate is placed at the beginning of the drift region and is electronically opened for a few tenths of a millisecond to permit a pulse of analyte ions to enter this region; typical pulses are 0.2m long. The gate is open (all ions pass) when each gate wire is at the potential of the drift field at that place in the drift tube and is closed (ions are stopped) when a potential higher than the drift voltage is placed between each pair of adjacent wires. After passing the gate, the ions drift with the electric field, some faster and some slower

according to their individual ion mobilities, and arrive at the collector electrode at different times. Before arriving to the detector, ions can find a second gate placed just in front of it. The purpose of this aperture grid is to shield some detectors from the inductive effects of the incoming ion cloud. With no aperture grid, a collector electrode responds to the ion cloud before the cloud arrives at the electrode, producing a broadened ion peak (Hill & Simpson, 1997). The aperture grid can be opened at progressively larger intervals after the entrance gate to create an ion mobility spectrum or can be opened at fixed intervals after that gate to monitor only ions of a given mobility (Baim & Hill, 1982). The use of ion gates decrease the sensitivity since they are open only a fraction of the analysis time; to increase sensitivity, Fourier Transform IMS (FTIMS) and pulsed sources have been used; in FTIMS, a second ion gate is placed close to the collector, and synchronized with the entrance gate at a rate that is continuously varied from low to high frequency. As ions migrating through the drift region of the spectrometer go in and out of phase with the oscillating gates, the ion current at the collector increases and decreases producing an interferogram; signal to noise ratio increase in FTIMS because he gates are open 50% of the time (Hill & Simpson, 1997; Eatherton *et al.* 1988).

**Drift gases:** A countercurrent of dry neutral gas is used in IMS as a clean and inert matrix through which ions drift. The drift gas also serves to keep the spectrometer drift tube clean by keeping neutral compounds, introduced with the sample or coming from the atmosphere, from passing into the drift region (Hill & Simpson, 1997). The drift gas, usually nitrogen or air, enters the bottom of the spectrometer with flow rates on the order of 0.5-1.5L/min, passes through the drift tube and exits through the ionization region (Figure 1, buffer gas entrance). Helium, carbon dioxide, and argon also have been used as drift gases; when drift gases are changed, sensitivity and resolving power change; helium was by far the most sensitive, giving nearly nine times more peak area than that seen in nitrogen; fast ions have lower resolving powers due to increased contributions from the ion pulse width ( $\sim 0,2m$ ) to the overall peak width, whereas for slower drifting ions, diffusion becomes the main band-spreading mechanism; when the effect of the starting pulse width was removed, the drift gases all performed nearly identically, which indicates that drift gases produce similar resolving powers (Asbury & Hill, 2000).

Carbon dioxide has been used as a drift gas when coupling IMS to supercritical fluid chromatography (SFC). Use of carbon dioxide as a drift gas was difficult in earlier IMS experiments because it formed such large clusters with ions that the mobility of the ion cluster was independent of the core ion species (Ellis *et al.* 1976); however, when analyzing large molecules or using temperatures higher than 220°C this

situation changes; it was demonstrated that the patterns of the ion mobility spectra were similar to those for nitrogen while ion drift times were considerably longer in CO<sub>2</sub>; unfortunately, these longer drift times lead to broadening by diffusion and reduced sensitivity (Rokushika *et al.* 1987); also, when using unidirectional flow FTIMS as a detector for SFC and nitrogen as a drift gas, there were no differences in the mobilities of the reactant ions caused by CO<sub>2</sub> contamination, indicating that the identities of the reactant ions were unaffected by CO<sub>2</sub> flow (Eatherton *et al.* 1988) maybe because the high temperature of the IMS tube did not allow clustering with CO<sub>2</sub>; for flows above 40mL/min, the signal for reactant ions decreased and eventually disappeared, which makes necessary to split the chromatographic flow for packed columns (Morrissey & Widmer, 1991).

**Doping agents:** Doping agents (reagent gases) added to the drift gas control ionization and increase selectivity in IMS. When using methylene chloride as a doping agent for the detection of explosives, the negative ion Cl<sub>2</sub> selectively attaches these electronegative molecules and sensitivity increase (Lawrence & Neudorfl, 1988). In the positive ion mode, low proton affinities compounds such as normal hydrocarbons are unresponsive. To observe hydrocarbon signal, water must be purged from sample and drift gas, and a dopant agent must be added to the drift gas or a metastable helium ionization source must be used; in this source, an inert gas in the presence of a strong electric field can be excited to a metastable state through collisions with electrons from a  $\beta$ -source; this excited molecules can then ionize molecules with high ionization potentials (Kojiro *et al.* 1991). The addition of doping agents to ion mobility spectrometers to selectively ionize compounds was first applied by Kim *et al.* (1978) who added ammonia to the N<sub>2</sub> buffer gas to ionize amines. When using a very high affinity compound like NH<sub>3</sub> as a doping agent, the selectivity increases since fewer compounds compete with ammonia for proton and only very strong gas-phase bases are detected, for example amines and drugs (Kim *et al.* 1978). Other doping agents used to ease analysis are carbon tetrachloride for explosives (Spangler *et al.* 1985) and dichloromethane, dibromomethane, methyl iodide, acetic acid, dimethyl sulfide and acetonitrile for explosives (Proctor & Todd, 1984).

During the analysis of high proton affinity vapor analytes with IMS in air, a high number of interferences arises due to the small proton affinity of water; one way to circumvent this is to add the drift gas with small quantities of ketones, which allows the formation of dimers with a higher stability than that of water clusters. The spectra will simplify because only compounds whose proton affinities are above that of the acetone dimers are detected (Hill & Simpson, 1997). Other examples of the addition of doping agents to the buffer gas are acetone and dimethylsulfoxide added to mixtures of volatile

organic and organophosphorus compounds (Eiceman *et al.* 1995); acetone, water, and dimethylsulfoxide added to volatile organic compounds (Meng *et al.* 1995); acetone and 5-nonanone added to hydrazine and monomethylhydrazine to skip the interference of ammonia (Eiceman *et al.* 1993); 4-heptanone added to alkanolamines in the presence of interferences of ammonia, Freon 22, and diesel fuel (Gan & Corino, 2000), and ketones added to hydrazines to avoid ammonia interference (Bollan *et al.* 2007). The use of doping agents in IMS was reviewed by Puton *et al.* (2008). All these researchers introduced the doping agents to the buffer gas in the reaction region of the mobility spectrometer to selectively change ion mobilities but only to avoid interferences.

The application of these selective changes in ion mobilities due to addition of a doping agent to the buffer gas had been applied to separate interferences but not to separate analytes with similar K<sub>0</sub> values. Doping agents that are introduced by the end of the drift region, and not with the analyte in the reaction region, are called buffer gas modifiers. Separation is achieved because selective clustering of the modifiers with the analytes occur which change analyte mobilities depending on the size and steric hindrance on the charge of the analyte ions. Sugar, drug and amino acids enantiomers were separated using (S)-2-butanol (Dwivedi *et al.* 2006); however, these authors only used the differences between enantiomers and did not take advantage of the differences in compounds mobilities. Fernández-Maestre *et al.* (2010b) did so by separating overlapping  $\alpha$ -amino acids using 2-butanol and demonstrated the formation of analyte-modifier clusters; the authors also observed a decrease on cluster formation with temperature increase. The formation, or the lack of formation, of clusters analyte-modifiers was also demonstrated for 2,4-lutidine, 2,6-di-tert-butyl pyridine, tetraalkylammonium ions, and  $\alpha$ -amino acids using water, methyl 2-chloropropionate, and trifluoromethyl benzyl alcohol as modifiers (Fernández-Maestre *et al.* 2010a). The formation of gas-phase intramolecular bridges in diamines such as arginine, histidine, and lysine and the drug atenolol was demonstrated by Fernández-Maestre *et al.* (2012) introducing modifiers in the buffer gas on a mobility spectrometer. The diamines mobilities were unaffected when modifiers were introduced into the buffer gas due to the formation of intramolecular bridges that hindered the attachment of modifier molecules to the positive charge of ions and delocalized the charge, which deterred clustering; ethyl lactate, nitrobenzene, 2-butanol, and tetrahydro-furan-2-carbonitrile were used as modifiers. Separations with the addition of buffer gas modifiers opens up prospects for extending the application of IMS to the determination of complex mixtures.

**Detection methods:** In IMS, the most common and simple detection device to measure the ion intensity is a collector

plate that works as a Faraday cup. In many instruments, a biased aperture gate placed close to this cup serves either as a detector or to increment the efficiency of the Faraday cup. This gate prevents the buildup of an ion charge on the collector plate, imparts energy to the ions to increase collection efficiency and filters out artifact signals coming from the opening and closing of the entrance gate (Eiceman & Karpas, 2005). Faraday cups can be replaced by detectors such as mass spectrometers that introduce additional identification capabilities to IMS.

**Ion Mobility-mass spectrometry (IMS-MS).** A common detection technique for IMS is mass spectrometry (MS). Coupling MS to IMS allows the determination of molecular weights, fragmentations, clustering and other type of reactions in the drift tube. All kinds of MS instruments have been interfaced to IMS systems including quadrupole (Clowers & Hill, 2005), time of flight (Ugarov *et al.* 2004), Fourier-transform ion cyclotron resonance, FTICR (Bluhm *et al.* 2000), sectors (McDaniel *et al.* 1962) and ion trap (Clowers & Hill, 2005). The coupling of these detectors to IMS adds an identification dimension to the detection of ions. When coupling IMS to MS, there are several possible modes of operation. In the IMS only mode, MS serves as a detection technique for IMS and no scan is performed: all ions reach the detector without scanning and the resulting spectra are similar to those in IMS alone operation; the drift time change is negligible because, although the distance the ions travel inside the MS instrument is similar to that in IMS, in MS the ions travel much faster due to the absence of drift gas in the vacuum conditions. In the MS mode, both gates are open (in the case of quadrupoles) and all ions pass continuously and directly to the mass spectrometer and are mass analyzed; the mass spectrum is obtained in this mode. In the case of IMS-tof-MS, the ions are sent by pulses to the MS. In the IMS-MS mode, all peaks of the IMS spectrum are mass analyzed continuously; this is possible because one mass spectrum can be acquired in less than one millisecond, so several MS spectra can be taken for every mobility peak; therefore, separation of all the ions with different masses and the same mobilities can be separated. In Selected Ion Monitoring mode, the MS instrument is set to detect one determined mass-to-charge value; the result is an ion mobility spectrum of all ions with the specified mass.

**IMS analysis: Sample introduction:** Samples can be introduced in the IMS tube directly if they are in a vapor form. Liquid samples or solutions can be introduced by means of ESI, SESI, and corona spray ionization sources, or through a chromatographic instrument, and solid samples may use MALDI and thermal or laser desorption. Direct injection of laboratory air considerably changes the identity of the reactant ions observed in IMS, complicating the analysis (St. Louis *et al.* 1990); water and ammonia clusters from

the environment and chloride and nitrate ions limit the capability of IMS to analyze compounds with low proton or electron affinities and introduce other unwanted reactions. Membrane inlets allow sample introduction that keep reactive molecules such as water and ammonia out of the reaction region; membranes are common when non-purified air is used as the buffer gas such as in field measurements. Spangler & Carrico (1983) tested two membranes for sample introduction: MEM-100 dimethylsilicone and Celgard 2400 (microporous polypropylene film); non-porous membranes as dimethylsilicone were capable of reducing significantly all atmospheric contaminants except CO<sub>2</sub>; polypropylene membranes were less effective to diminish intake of reactive molecules from sampled air.

Introducing the sample using a chromatographic technique gives a second dimension for easy resolving complex mixtures. Gas chromatography (GC) was first coupled to IMS by Karasek (1970) and later was liquid chromatography, SFC, and capillary electrophoresis (Hallen *et al.* 1989). SFC-IMS has been applied to the determination of nicotine in tobacco (Wu *et al.* 1998), GC-MS for the analysis of bacteria by pyrolysis (Dworzanski *et al.* 2005), and liquid chromatography for analysis of carbohydrates (Lee *et al.* 1998).

**Spectra:** Spectra are graphs of intensity of the ion peaks (ion current) *vs.* drift time on the x axis. The zero drift time is taken as the time the entrance gate is open (in occasions when the gate is closed) to let the ions enter the drift tube. Most of the ions are neutralized in the aperture gate, which is open only about 1% of the duty cycle. Signals are very noisy and it is necessary to average as many as 250 spectra to obtain a clean spectrum. However, the total analysis time is less than one minute, faster than most other separation techniques (Eiceman & Karpas, 2005). Figure 3a shows a typical ion mobility spectrum of the positive reactant ions in nitrogen, in this case, the water reactant ion, (H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H<sup>+</sup>. IMS spectra can show drift times of 10m for small molecules to more than 100 ms for macromolecules like proteins and nucleic acids, being the most common about 20–25m (Hill & Simpson, 1997). Figure 3b shows a loratadine IMS spectrum with a drift time of 35m. In 2-D mode, the drift time is displayed in the y axis of the spectrum *vs.* m/z in the x axis. This mode is useful to study complicated spectra such as proteomes (McLean *et al.* 2005) and metabolomes (Dwivedi *et al.* 2010).

**Reduced mobility:** Ion mobility spectrometry separates compounds on the basis of their different gas-phase velocities, commonly in nitrogen or air, giving mobility constants (K), defined as:

$$K = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Where  $v$  is the velocity of the ion in cm/s and  $E$  is the electric field in the drift region of the spectrometer in V/cm. If weak-field conditions exist (i.e. less than 500 V/cm),  $v$  should be a linear function of  $E$ . Mobility constants are more easily calculated by measuring the time an ion travels down the drift tube. Mobilities can then be found by replacing  $E = V/L$  and  $v = t_d/L$  in eq. 1

$$K = \frac{L^2}{V \cdot t_d} \quad (2)$$

Where  $L$  is the distance the ion travels to reach the detector in centimeters,  $V$  is the total voltage drop in the drift tube that forces the ions through the drift tube in volts, and  $t_d$  is the time in seconds the ion takes to travel down the drift tube till the detector. To compare ion mobilities in different experimental conditions mobilities must be normalized to standard conditions obtaining the reduced mobility (in  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ):

$$K_0 = K \frac{P}{101.3} \frac{273.16}{T} \quad (3)$$

Where  $P$  is the pressure in kPa and  $T$  the temperature in  $K$ . Factors affecting ion mobilities at atmospheric pressure comprise mass, size, and charge (Revercomb & Mason, 1975). Reduced mobilities exhibit a mass-related temperature dependence for homologous series of compounds e.g.,

alcohols, carbohydrates, amines; for amines, this temperature dependence is positive (i.e., mobility increases with increasing temperature) for low molecular mass ions, almost constant for intermediate masses (90-180 Da) ions, and negative for heavy ions (Berant & Karpas, 1989). Reduced mobility values are reproducible to within 1-2% in different laboratories (Eiceman & Karpas, 2005); a compilation of these values has been published (Shumate *et al.* 1986).

**Calibration:** To calibrate the IMS instrument, the fact that under certain conditions the product  $K_0 t$  is constant can be used. This means that the reduced mobility of different analyte ions may be calculated from that of a calibrant,  $K_{0c}$ :

$$K_0 = K_{0c} \left[ \frac{t_c}{t_d} \right] \quad (4)$$

where  $t_c$  is the drift time of the calibrant at the specific conditions of the experiment and  $t_d$  is the drift time of the analyte at the same conditions (Eiceman *et al.* 2003). 2,4-lutidine is the compound commonly chosen as calibrant (Berant & Karpas, 1989). This method skips the reading of barometers and eliminates the errors due to wrong measurements of the parameters in eq. 3 but can introduce errors due to contamination of the drift tube which can produce clustering that change ion mobilities.

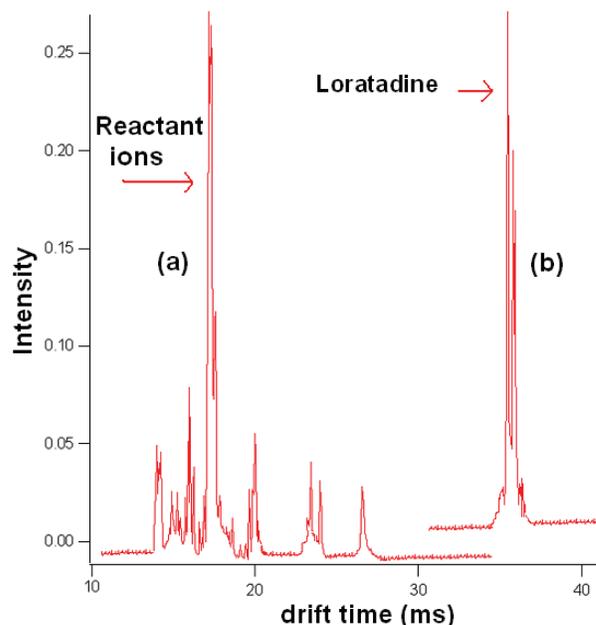


Figure 3. Typical IMS spectra of (a) positive reactant ions from the ESI solution and (b) IMS-Selected Ion Monitoring spectrum of loratadine analyte (See Detection Methods for further explanation).

Tetraalkylammonium ions, 2-4, lutidine, and di-tert-butylpyridine are good standards for IMS because they produce a single peak and a very sensitive signal. Fernandez-Maestre *et al.* (2010a) addressed issues such as errors produced by contamination and demonstrated that 2,4-lutidine or the single use of one calibration standard could lead to errors when contamination was present; they proposed the use of a standard with a mobility affected by temperature or contamination, such as 2-4, lutidine, to detect contamination, followed by a standard unaffected by temperature or contamination (due to its low clustering tendency, such as a tetraalkylammonium salt), to be used in eq. 4. Linear calibration in IMS ranges from 10 to 1,000  $\mu\text{M}$ . The reactant ions are consumed proportionally to the analyte concentration and their signal decrease and that of the analyte ions increase with the concentration of the analyte. At high concentrations, analyte dimers appear and the analyte eventually consumes all available reactant ions and its signal reaches a maximum; this situation should be avoided because the quantitation characteristics of the instrument are lost; therefore, reactants ions should be always visible in the spectra (Eiceman & Karpas, 2005).

**Collision cross sections:** Kinetic theory yields a form for the mobility at standard temperature and pressure conditions (Mason & Schamp, 1958):

$$K_0 = \frac{3q}{16N_0} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu kT}} \frac{1+\alpha}{\Omega} \frac{P}{760} \frac{273.16}{T} \quad (5)$$

In this equation, (the Mason–Shamp equation),  $P$  is the pressure in Torr.,  $T$  the temperature in  $^{\circ}\text{C}$ ,  $q$  the charge of the ion,  $N_0$  the gas number density at standard temperature and pressure conditions ( $N_0 = P/kT$ ),  $\mu$  the reduced mass of an ion-drift gas pair,  $k$  the Boltzmann constant,  $\Omega$  the ion-neutral collision cross section and  $\alpha$  a small correction term with a magnitude of less than 0.02, when the ion mass is larger than the mass of the drift gas molecule. The reduced mass is defined as  $mM/(m + M)$  where  $m$  and  $M$  are the molecular mass of the analyte and the drift gas, respectively; this equation is useful for calculating collision cross sections of molecules, especially important for macromolecules like proteins that can adopt different conformations, which are closely related to their biological activity.

**Applications of IMS:** Only in this decade, commercial bench top IMS analyzers were available after decades of absence from the market. The GA-2100 Electrospray IMS is commercialized by Excellims Corporation (2011) as being “faster than HPLC... perfect for rapidly and sensitively analyzing liquid samples... Pharmaceutical Cleaning Validation, process monitoring,

and many other types of analysis”. IMS has had dissimilar applications such as the detection of contaminants in food (Bota & Harrington, 2006), analysis of protein structures (Myung *et al.* 2006), determination of illegal drugs in human hair (Sheibania *et al.* 2011), detection of moulds (Tiebe *et al.* 2010), identification of wood species (Lawrence *et al.* 1991) and detection of emissions from surfaces (Vautz *et al.* 2006), and has been proposed as an analytical separation tool for searching the chemical signatures of life during exploration of solar system bodies (Johnson *et al.* 2007).

In biology, IMS has been applied to the determination of bacteria by enzyme substrate reactions. A method add (o-nitrophenyl) galactopyranoside to cell cultures where bacterial enzymes cleave it to o-nitrophenol; this relatively high vapor pressure product can be detected by IMS sampling the headspace of the sample (Snyder *et al.* 1991). Applications in medicine include the detection of drugs in breath of patients (Carstens *et al.* 2010), determination of methanol and ethanol in human saliva (Bocos-Bintintan *et al.* 2010), and volatile metabolites to diagnose chronic obstructive pulmonary disease (Bessa *et al.* 2011), bronchial carcinoma (Finthammer *et al.* 2010), and other diseases (Bunkowski *et al.* 2010). IMS has also been applied to the detection of acetaminophen, aspartame, bisacodyl, caffeine, dextromethorphan, diphenhydramine, famotidine, glucosamine, guaifenesin, loratadine, niacin, phenylephrine, pyridoxine, thiamin, and tetrahydrozoline in over-the-counter drugs and aspartame and caffeine in beverages (Fernandez-Maestre & Hill, 2009). These applications could be of interest in third-world countries due to the low cost of this technique, especially for countries like Colombia where cheap and sensitive methods of medical diagnostic are required.

Not only are organic compounds detected by IMS but airborne molecular contamination (Shupp *et al.* 2007) and many inorganic species can be monitored continuously; these inorganic species include as  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HI}$ ,  $\text{HBr}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{BF}_3$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{F}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{I}_2$  and  $\text{Cl}_2$  (Bacon *et al.* 1991); this is important for the detection of dangerous leakages in industrial factories.

Ion mobility spectrometry is an analytical technique with a promising future due to increased terrorism and drug trafficking since it is the technique of choice for rapid and low cost detection of illicit drugs and explosives. IMS portability and easy operation make it an essential tool for military, police and security personnel.

Conflicts of interest: The manuscript was prepared and revised by the author, who declares the absence of any conflict which can put the validity of the presented review in risk.

**BIBLIOGRAPHY**

1. ALBRITTON, D.L.; MILLER, T.M.; MARTIN, D.W.; MCDANIEL, E.W. 1968. Mobilities of mass-identified  $H^{3+}$  and  $H^+$  ions in hydrogen. *Phys. Rev.* 171(1):94-102.
2. ASBURY, G.R.; KLASMEIER, J.; HILL, Jr. H.H. 2000. Analysis of explosives using electrospray ionization/ion mobility spectrometry (ESI/IMS). *Talanta.* 50(6):1291-1298.
3. ASBURY, G.R.; HILL, Jr. H.H. 2000. Using different drift gases to change separation factors ( $\alpha$ ) in ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 72(3):580-584.
4. BACON, A.T.; GETZ, R.; REATEGUI, J. 1991. Ion-mobility spectrometry tackles tough process monitoring. *J. Chem. Eng. Program.* 87(6):61-64.
5. BAIM, M.A.; HILL, Jr. H.H. 1982. Tunable selective detection for capillary gas chromatography by ion mobility monitoring. *Anal. Chem.* 54(1):38-43.
6. BAIM, M.A.; EATHERTON, R.L.; HILL, Jr. H.H. 1983. Ion mobility detector for gas chromatography with a direct photoionization source. *Anal. Chem.* 55(11):1761-1766.
7. BERANT, Z.; KARPAS, Z. 1989. Mass-mobility correlation of ions in view of new mobility data. *J. Am. Chem. Soc.* 111(11):3819-3824.
8. BESSA, V.; DARWICHE, K.; TESCHLER, H.; SOMMERWERCK, U.; RABIS, T.; BAUMBACH, J.I.; FREITAG, L. 2011. Detection of volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 14(1):7-13.
9. BLUHM, B.K.; GILLIG, K.J.; RUSSELL, D.H. 2000. Development of a Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer-ion mobility spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.* 71(11):4078-4086.
10. BOCOS-BINTINTAN, V.; MOLL, V.H.; FLANAGAN, R.J.; THOMAS, C.L.P. 2010. Rapid determination of alcohols in human saliva by gas chromatography differential mobility spectrometry following selective membrane extraction. *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 13(2):55-63.
11. BOGGIO, N.G.; PIERPAULI, K.; RINALDI, C.A.; LAMAGNA, A. 2011. Detection of volatile organic compound with an ion mobility spectrometry cell type device with a corona discharge ionization source. *Sensor Lett.* 9(2):866-868.
12. BOLLAN, H.R.; STONE, J.A.; BROKENSHIRE, J.L.; RODRIGUEZ, M.R.; EICEMAN, G.A. 2007. Mobility resolution and mass analysis of ions from ammonia and hydrazine complexes with ketones formed in air at ambient pressure. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18(5):940-951.
13. BOTA, G.M.; HARRINGTON, P.B. 2006. Direct detection of trimethylamine in meat food products using ion mobility spectrometry. *Talanta* 68(3):629-635.
14. BUNKOWSKI, A.; MADDALA, S.; DAVIES, A.N.; WESTHOFF, M.; LITTERST, P.; BÖDEKER, B.; BAUMBACH, J.I. 2010. One year time series of investigations of analytes within human breath using ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 13(3-4):141-148.
15. CARSTENS, E.T.H.; HIRN, A.; QUINTEL, M.; NOLTE, J.; JÜNGER, M.; PERL, T.; VAUTZ, W. 2010. On-line determination of serum propofol concentrations by expired air analysis. *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 13(1):37-40.
16. CLOWERS, B.H.; HILL, H.H. 2005. Mass analysis of mobility-selected ion populations using dual gate, ion mobility, quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77(18):5877-5885.
17. COHEN, M.J.; KARASEK, F.W. 1970. Plasma chromatography — a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 8(6):330-337.
18. DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. 2001. *Mass spectrometry: principles and applications.* 3<sup>rd</sup> edition. John Wiley and Sons. 493p.
19. DWIVEDI, P.; WU, C.; MATZ, L.M.; CLOWERS, B.H.; SIEMS, W.F.; HILL, Jr. H.H. 2006. Chiral separation by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 78(24):8200-8206.
20. DWIVEDI, P.; PUZON, G.; TAM, M.; LANGLAIS, D.; JACKSON, S.; KAPLAN, K.; SIEMS, W.F.; HILL, H.H. 2010. Metabolic profiling of *Escherichia coli* by ion mobility-mass spectrometry with MALDI ion source. *J. Mass Spectrom.* 45(12):1383-1393.

21. DWORZANSKI, J.P.; TRIPATHI, A.; SNYDER, A.P.; MASWDEH, W.M.; WICK, C.H. 2005. Novel biomarkers for Gram-type differentiation of bacteria by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 73(1):29-38.
22. EATHERTON, R.L.; MORRISSEY, M.A.; HILL, H.H. 1988. Comparison of ion mobility constants of selected drugs after capillary gas chromatography and capillary supercritical fluid chromatography. *Anal. Chem.* 60(20):2240-2243.
23. EICEMAN, G.A.; SALAZAR, M.R.; RODRIGUEZ, M.R.; LIMERO, T.F.; BECK, S.W.; CROSS, J.H.; YOUNG, R.; JAMES, J.T. 1993. Ion mobility spectrometry of hydrazine, monomethylhydrazine, and ammonia in air with 5-nonanone reagent gas. *Anal. Chem.* 65(13):1696-1702.
24. EICEMAN, G.A.; WANG, Y.F.; GARCIA-GONZALEZ, L.; HARDEN, C.S.; SHOFF, D.B. 1995. Enhanced selectivity in ion mobility spectrometry analysis of complex mixtures by alternate reagent gas chemistry. *Anal. Chim. Acta* 306(1):21-33.
25. EICEMAN, G.A.; NAZAROV, E.G.; STONE, J.A. 2003. Chemical standards in ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 493(2):185-194.
26. EICEMAN, G.A.; KARPAS, Z. 2005. Ion mobility spectrometry. 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton: FL.CRC Press. 350p.
27. ELLIS, H.W.; PAI, R.Y.; GATLAND, I.R.; MCDANIEL, E.W.; WERNLUND, R.; COHEN, M.J. 1976. Ion identity and transport properties in CO<sub>2</sub> over a wide pressure range. *J. Chem. Phys.* 64(10):3935-3941.
28. EXCELLIMS CORPORATION. 2011. Available in internet in: <http://www.excellims.com> Accessed on 12/2/2011.
29. FERNÁNDEZ-MAESTRE, R.; HILL Jr., H.H. 2009. Ion mobility spectrometry for the rapid analysis of over-the-counter drugs and beverages. *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 12(1):3-14.
30. FERNÁNDEZ-MAESTRE, R.; HARDEN, C.S.; EWING, R.G.; CRAWFORD, C.L.; HILL Jr., H.H. 2010a. Chemical standards in ion mobility spectrometry. *Analyst* 135(6):1433-1442.
31. FERNÁNDEZ-MAESTRE, R.; WU, C.; HILL, H.H. 2010b. Using a buffer gas modifier to change separation selectivity in ion mobility spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 298(1-3):2-9.
32. FERNÁNDEZ-MAESTRE, R.; WU, C.; HILL Jr., H.H. 2012. Buffer gas modifiers effect resolution in ion mobility spectrometry through selective ion-molecule clustering reactions. *Rap. Comm. Mass Spectrom.* Accepted.
33. FINTHAMMER, M.; BEIERLE, C.; FISSELER, J.; KERN-ISBERNER, G.; BAUMBACH, J.I. 2010. Using probabilistic relational learning to support bronchial carcinoma diagnosis based on ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 13(2):83-93.
34. GAN, T.H.; CORINO, G.T. 2000. Selective detection of alkanolamine vapors by ion mobility spectrometry with ketone reagent gases. *Anal. Chem.* 72(4):807-815.
35. GUHARAY, S.K.; DWIVEDI, P.; HILL, H.H. 2008. Ion mobility spectrometry: ion source development and applications in physical and biological sciences. *IEEE T. Plasma Sci.* 36(4):1458-1470.
36. GUNZER, F.; ULRICH, A.; BAETHER, W. 2010. A novel non-radioactive electron source for ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 13(1):9-16.
37. HALLEN, R.W.; SHUMATE, C.B.; SIEMS, W.F.; TSUDA, T.; HILL, H.H. 1989. Preliminary investigation of ion mobility spectrometry after capillary electrophoretic introduction. *J. Chromatogr. A.* 480:233-245.
38. HILL, Jr., H.H.; SIMPSON, G. 1997. Capabilities and limitations of ion mobility spectrometry for field screening applications. *J. Field Anal. Chem. Technol.* 1(3):119-134.
39. JOHNSON, P.V.; BEEGLE, L.W.; KIM, H.I.; EICEMAN, G.A.; KANIK, I. 2007. Ion mobility spectrometry in space exploration. *Int. J. Mass Spectrom.* 262(1-2):1-15.
40. KANQ, A.B.; HILL Jr., H.H. 2008. Ion mobility spectrometry detection for gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1177(1):12-27.
41. KANQ, A.B.; DWIVEDI, P.; TAM, M.; MATZ, L.; HILL, H.H. Jr. 2008. Ion mobility-mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 43(1):1-22.

42. KARASEK, F.W. 1970. Drift-mass spectrometer. *Res. Develop.* 21(12):25 (cited in KARASEK F.W. 1972. Trace analysis and fundamental studies by plasma chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 21(12):157-166.
43. KIM, S.H.; KARASEK, F.W.; ROKUSHIKA, S. 1978. Plasma chromatography with ammonium reactant ions. *Anal. Chem.* 50(1):152-155.
44. KOJIRO, D.R.; COHEN, M.J.; STIMAC, R.M.; WERNLUND, R.F.; HUMPHRY, D.E.; NORISHIGE, T. 1991. Determination of C1-C4 alkanes by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 63(20):2295-2300.
45. LANGEVIN, P. 1903. L'ionization des gaz. *Ann. Chim. Phys.* 28:289-384.
46. LAWRENCE, A.H.; NEUDORFL, P. 1988. Detection of ethylene glycol dinitrate vapors by ion mobility spectrometry using chloride reagent ions. *Anal. Chem.* 60(2):104-109.
47. LAWRENCE, A.H.; BARBOUR, R.J.; SUTCLIFFE, R. 1991. Identification of wood species by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 63(13):1217-1221.
48. LEE, D-S.; WU, C.; HILL Jr., H.H. 1998. Detection of carbohydrates by electrospray ionization - ion mobility spectrometry following microbore high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 822(1):1-9.
49. LOVELOCK, J.E.; WASILEWSKA, E.M. 1949. An ionisation anemometer. *J. Sci. Instr.* 26(11):367-370.
50. LUBMAN, D.M.; KRONICK, M.N. 1982a. Plasma chromatography with laser-produced ions. *Anal. Chem.* 54(9):1546-1551.
51. LUBMAN, D.M.; KRONICK, M.N. 1982b. Discrimination of isomers of xylene by resonance enhanced two-photon ionization. *Anal. Chem.* 54(13):2289-2291.
52. MÁRQUEZ-SILLERO, I.; AGUILERA-HERRADOR, E.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. 2011. Ion-mobility spectrometry for environmental analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30(5):677.
53. MASON, E.A.; SCHAMP, Jr. H.W. 1958. Mobility of gaseous ions in weak electric fields. *Ann. Phys.* 4(3):233-270.
54. McDANIEL, E.W.; MARTIN, D.W.; BARNES, W.S. 1962. Drift-tube mass spectrometer for studies of low-energy ion-molecule reactions. *Rev. Sci. Instr.* 33(1):2-7.
55. McDANIEL, E.W. 1964. Collisional phenomena in ionized gases, New York: Wiley. 242p.
56. McLEAN, J.A.; RUOTOLO, B.T.; GILLIG, K.J.; RUSSELL, D.H. 2005. Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics. *Int. J. Mass Spectrom.* 240(3):301-315.
57. McMINN, D.G.; KINZER, J.A.; SHUMATE, C.B.; SIEMS, W.F.; HILL Jr., H.H. 1990. Ion mobility detection following liquid chromatographic separation. *J. Microcolumn Sep.* 2(4):188-192.
58. MENG, Q.; KARPAS, Z.; EICEMAN, G.A. 1995. Monitoring indoor ambient atmospheres for volatile organic compounds using an ion mobility analyzer array with selective chemical ionization. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 61(2):81-94.
59. MORRISSEY, M.A.; WIDMER, H.M. 1991. Ion-mobility spectrometry as a detection method for packed-column supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr.* 552:551-561.
60. MYUNG, S.; WISEMAN, J.M.; VALENTINE, S.J.; TAKATS, Z.; COOKS, R.G.; CLEMMER, D.E. 2006. Coupling desorption electrospray ionization with ion mobility / mass spectrometry for analysis of protein structure: evidence for desorption of folded and denatured states. *J. Phys. Chem. B.* 110(10):5045-5051.
61. PROCTOR, C.J.; TODD, J.F.J. 1984. Alternative reagent ions for plasma chromatography. *Anal. Chem.* 56(11):1794-1797.
62. PUTON, J.; NOUSIAINEN, M.; SILLANPAA, M. 2008. Ion mobility spectrometers with doped gases. *Talanta* 76(5):978-987.
63. REARDEN, P.; HARRINGTON, P.B. 2005. Rapid screening of precursor and degradation products of chemical warfare agents in soil by solid-phase microextraction ion mobility spectrometry (SPME-IMS). *Anal. Chim. Acta* 545(1):13-20.
64. REVERCOMB, H.E.; MASON, E.A. 1975. Theory of plasma chromatography/ gaseous electrophoresis. *Anal. Chem. Rev.* 47(7):970-983.

65. ROKUSHIKA, S.; HATANO, H.; HILL Jr., H.H. 1987. Ion mobility spectrometry after supercritical fluid chromatography. *Anal. Chem.* 59(1):8-12.
66. RUTHERFORD, E. 1897. The velocity and rate of recombination of the ions of gases exposed to Rontgen radiation. *Phil. Mag.* 44(270):422-440.
67. RUTHERFORD, E. 1899. Uranium radiation and the electrical conduction produced by it. *Phil. Mag.* 47(284):109-163.
68. SABO, M.; MATEJCIK, S. 2011. Ion mobility spectrometry for monitoring high-purity oxygen. *Anal. Chem.* 83(6):1985-1989.
69. SHEIBANIA, A.; TABRIZCHI, M.; GHAZIASKAR, H.S. 2011. Determination of methadone in human hair by headspace extraction and ion mobility spectrometry. *Anal. Lett.* 44(4):667-675.
70. SHUMATE, C.B.; ST. LOUIS, R.H.; HILL Jr., H.H. 1986. Table of reduced mobility values from ambient pressure ion mobility spectrometry. *J. Chromatogr.* 373:141-173.
71. SHUPP, A.M.; RODIER, D.; ROWLEY, S. 2007. Monitoring airborne molecular contamination: a quantitative and qualitative comparison of real-time and grab-sampling techniques. *Proc. SPIE, the International Society for Optical Engineering* 6518, 65183Z. doi:10.1117/12.707776.
72. SNYDER, A.P.; SHOFF, D.B.; EICEMAN, G.A.; BLYTH, D.A.; PARSONS, J.A. 1991. Detection of bacteria by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 63(5):526-529.
73. SPANGLER, G.E.; CARRICO, J.P. 1983. Membrane inlet for ion mobility spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 52(2-3):267-287.
74. SPANGLER, G.E.; CAMPBELL, D.N.; CARRICO, J.P. 1985. Recent Advances in ion mobility spectrometry for explosives vapor detection. *J. Test Eval.* 13(3):234-241.
75. ST. LOUIS, R.H.; SIEMS, W.F.; HILL Jr., H.H. 1989. Evaluation of direct axial sample introduction for ion mobility detection after capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 479(2):221-231.
76. ST. LOUIS, R.H.; HILL, Jr.; H.H.; EICEMAN, G.A. 1990. Ion mobility spectrometry in analytical chemistry. *CRC Cr. Rev. Anal. Chem.* 21(5):321-355.
77. TABRIZCHI, M.; ROUHOLAHNEJAD, F. 2004. Corona discharge ion mobility spectrometry at reduced pressures. *Rev. Sci. Instr.* 75(11):4656-4662.
78. TIEBE, C.; HÜBERT, T.; KOCH, B.; RITTER, U.; STEPHAN, I. 2010. Investigation of gaseous metabolites from moulds by ion mobility spectrometry (IMS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Int. J. Ion Mob. Spectrom.* 13(1):17-24.
79. UGAROV, M.V.; EGAN, T.; KHABASHESKIU, D.V.; SCHULTZ, J.A.; PENG, H.; KHABASHESKIU, V.N.; FURUTANI, H.; PRATHER, K.S.; WANG, J.H.W.; JACKSON, S.N.; WOODS, A.S. 2004. MALDI matrices for biomolecular analysis based on functionalized carbon nanomaterials. *Anal. Chem.* 76(22):6734-6742.
80. VALENTINE, S.J.; COUNTERMAN, A.E.; HOAGLUND, C.S.; REILLY, J.P.; CLEMMER, D.E. 1998. Gas-phase separations of protease digests. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9(11):1213-1216.
81. VAUTZ, W.; BAUMBACH, J.I.; UHDE, E. 2006. Detection of emissions from surfaces using ion mobility spectrometry. *Anal. BioAnal. Chem.* 384(4):980-986.
82. WEIS, P. 2005. Structure determination of gaseous metal and semi-metal cluster ions by ion mobility spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 245(1-3):1-13.
83. WU, C.; SIEMS, W.F.; HILL Jr., H.H.; HANNAN, R.M. 1998. Analytical determination of nicotine in tobacco by supercritical fluid chromatography-ion mobility detection. *J. Chromatogr. A.* 811(1-2):157-161.
84. WU, C.; SIEMS, W.F.; HILL Jr., H.H. 2000. Secondary electrospray ionization ion mobility spectrometry/mass spectrometry of illicit drugs. *Anal. Chem.* 72(2):396-403.
85. WYTENBACHT.; VONHELDENG.; BOWERS M.T. 1996. Gas-phase conformation of biological molecules: bradykinin. *J. Am. Chem. Soc.* 118(35):8355-8364
86. YUAN, A.; ALIAGA-ROSSEL, R.; CHOI, P.; GILLES, J.P. 2005. Development of a short pulsed corona discharge ionization source for ion mobility spectrometry. *Rev. Sci. Instr.* 76(8):085105-085105-6.

Recibido: Septiembre 26 de 2011  
Aceptado: Julio 19 de 2012

# ESTUDIO DE LA INTERCALACIÓN DE POLIANILINA EN MINERALES DE ARCILLA PARA FORMAR MATERIALES MICRO-COMPUESTOS

## STUDYING THE INTERCALATION OF POLYANILINE IN CLAY MINERALS TO MAKE MICRO-COMPOSITES MATERIALS

J. G. Carriazo\*<sup>1</sup>, J. A. Torres<sup>2</sup>, A. E. Ensuncho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dr. Sc.-Química. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria, Carrera 30 No. 45-03. Bogotá, D.C. E-mail: jcarriazog@unal.edu.co; <sup>2</sup>Químico, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Ciudad Universitaria, Carrera 30 No. 45-03. Bogotá, D.C. E-mail: jatorreslu@unal.edu.co. <sup>3</sup>M.Sc.- Química. Departamento de Química, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Córdoba. Montería-Colombia. E-mail: aensuncho@sinu.unicordoba.edu.co.

Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient. 15(2): 481 - 489, 2012

### RESUMEN

El presente trabajo muestra el estudio de la intercalación de especies de polianilina en dos minerales de arcilla para formar materiales micro-compuestos, con propiedades en el transporte de electrones. Los sólidos fueron preparados mediante la síntesis “*in situ*” de polianilina en matrices, de dos arcillas colombianas tipo montmorillonita. Los materiales fueron evaluados por microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX) y medidas de resistencia eléctrica. Los resultados de SEM destacan la morfología granular e irregular de los materiales compuestos y la DRX verifica intercalación y delaminación. Las medidas de resistencia eléctrica permitieron confirmar la potencialidad de algunos materiales como sólidos conductores de corriente y proporcionaron información adicional sobre la posible distribución y configuración de las fases componentes de los materiales compuestos de polianilina/montmorillonita.

Palabras clave: Material compuesto, nanocompuesto, polianilina, arcilla.

### SUMMARY

This paper reports a study of the polyaniline-species intercalation into two clay minerals to form micro-composite materials with properties for electron transport. The solids were prepared by “*in situ*” synthesis of polyaniline into the matrix of two Colombian montmorillonite-clay types. The materials were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and electrical resistance measurements. An irregular grain morphology for composite materials was observed by SEM, and the intercalated/

delaminated structures were verified by XRD analyses. The potential performance of some of the solids to be current conductors was confirmed by electrical resistance measurements, which also gave additional information on the possible distribution and configuration of the constituting phases of polyaniline/montmorillonite composites.

Key words: Composite material, nanocomposite, polyaniline, clay.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años es notable el avance creciente en el diseño de nuevos materiales que, finalmente, logran ser incorporados de manera exitosa en los procesos de manufactura involucrados en las cadenas productivas de alta tecnología (Dobrzanski, 2006). En esta vía, se ha logrado obtener materiales poliméricos con propiedades conductoras, semiconductoras, con propiedades importantes de óxido-reducción y, algunas veces, con propiedades anticorrosivas (Lu *et al.* 2011; Dai *et al.* 2010; Bajpai *et al.* 2006; Campbell, 2002; Min, 1999), en todos los casos, con múltiples aplicaciones industriales.

Aunque los polímeros conductores poseen enormes ventajas por sus propiedades en diferentes eventos que implican el transporte de electrones, al tiempo que conservan características de materiales plásticos: bajo costo, flexibilidad, facilidad de sintetizar y de moldear, entre otras, es evidente su desventaja en términos de resistencia mecánica y térmica (Ayatollahi *et al.* 2011; Dai *et al.* 2010; Bur *et al.* 2005). En consecuencia, para mejorar estas propiedades se han generado diversos procedimientos que conducen

a la preparación de “materiales compuestos”, resultantes de la incorporación controlada de materiales cerámicos apropiados, como dióxido de titanio, nanotubos de carbono y aluminosilicatos, entre otros (Su & Gan, 2012; Ayatollahi *et al.* 2011; Deka & Kumar, 2011; Ballav & Biswas, 2006).

Por definición, un material compuesto es una mezcla de materiales diferentes que aportan sus propiedades individuales para potencializar ciertas características deseadas en el sólido final (Smith & Hashemi, 2006). Desde este punto de vista, el uso de minerales de arcilla, preferiblemente, los conocidos como montmorillonitas o esmectitas, son bastante utilizados, como matrices cerámicas, en la conformación de materiales compuestos, complementados con fases poliméricas. Múltiples publicaciones indican las ventajas estructurales en el diseño de materiales compuestos basados en polímeros con minerales de arcilla (Malwela & Ray, 2011; Deka & Kumar, 2010; Franco & Maspoch, 2009; Rodríguez *et al.* 2008; do Nascimento *et al.* 2006; Yeh *et al.* 2002). La incorporación de montmorillonitas en sistemas poliméricos permite fortalecer la resistencia mecánica, mejorar la resistencia térmica y controlar la conductividad eléctrica de los plásticos iniciales (Deka & Kumar, 2010; Franco & Maspoch, 2009).

Las esmectitas o montmorillonitas son aluminosilicatos

laminares con estructura tipo T:O:T o 2:1 (Figura 1a), formados por redes octaédricas, en las que un catión  $Al^{3+}$  está rodeado por seis grupos OH o átomos de oxígeno, en medio de dos láminas tetraédricas de  $SiO_4$  (Carriazo *et al.* 2007). Entre las láminas T:O:T, se encuentran cationes de compensación ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), que pueden ser intercambiados para lograr la inserción de especies voluminosas, que permiten incrementar, apreciablemente, el espaciado basal  $d_{001}$  original (Carriazo *et al.* 2009).

Variadas fases poliméricas se han empleado en el diseño de materiales tipo micro y nano-compuestos, dependiendo de las propiedades deseadas y las aplicaciones requeridas. Una estructura polimérica empleada con frecuencia por sus propiedades conductoras de electricidad es la polianilina (Bekri-Abbes & Srasra, 2010; Narayanan *et al.* 2010; Rodríguez *et al.* 2008; do Nascimento *et al.* 2006; Yeh *et al.* 2001), un polímero orgánico conjugado, producto de la polimerización oxidativa de la anilina en medio ácido que, generalmente, presenta conductividad, debido a la deslocalización de carga en su estructura y de acuerdo a su nivel de oxidación (Figura 1b).

El objetivo del presente trabajo es obtener información complementaria sobre la organización estructural real de los componentes de un conjunto de materiales micro-

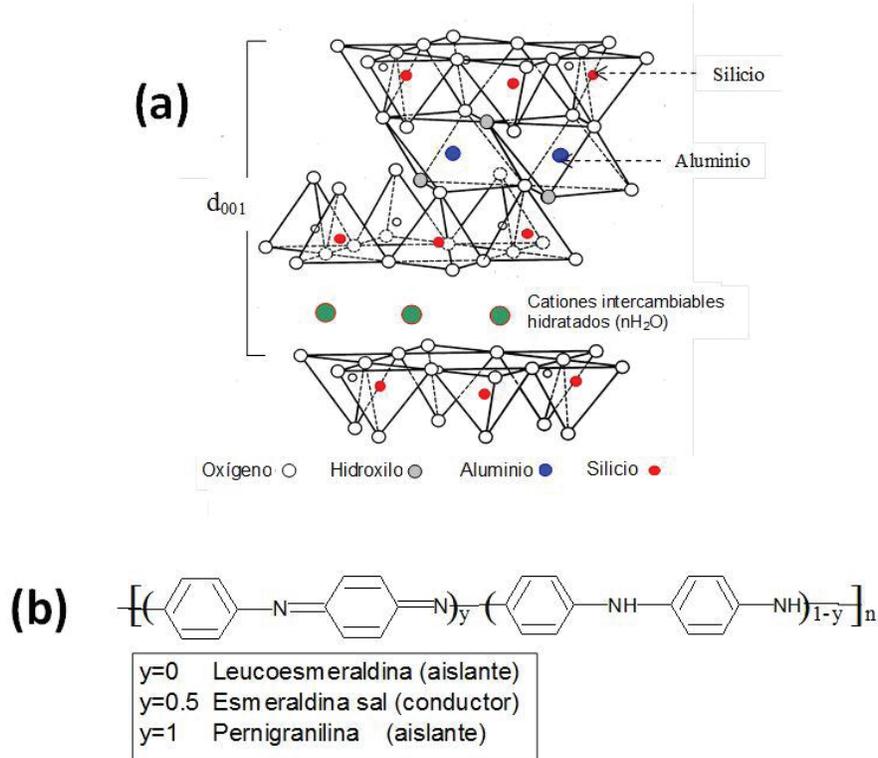


Figura 1. a) Estructura de un mineral de arcilla 2:1 (esmectita); b) Estructura general de una cadena de polianilina para tres niveles de oxidación (tres formas del polímero).

compuestos de polianilina/montmorillonita, con la participación de dos arcillas explotadas en Colombia, cuya preparación ya ha sido publicada (Rodríguez *et al.* 2008) y cuyo interés radica en sus propiedades en el transporte de electrones. Este trabajo involucra la verificación de un modelo de organización de las fases componentes de los materiales, lo que permitirá avanzar en la optimización de estos sólidos, para futuras aplicaciones en sistemas de alta tecnología.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La síntesis de los sólidos, se encuentra descrita de manera detallada en un trabajo anterior (Rodríguez *et al.* 2008). Para ello, se emplearon dos arcillas tipo esmectita: una bentonita del Valle del Cauca (BVC) y una montmorillonita proveniente del centro del país, denominada en adelante M64. Ambas arcillas, se saturaron previamente con iones  $\text{Na}^+$ , obteniéndose los sólidos BVC/Na y M64/Na, para luego, proceder con la síntesis de la polianilina en el interior de las láminas de cada mineral, vía intercalación con iones alquilamonio, a partir de una sal de amonio cuaternaria (bromuro de hexadeciltrimetilamonio ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ )), como se describe en literatura (Rodríguez *et al.* 2008).

Las arcillas intercaladas con cationes alquilamonio (BVC/Alqm y M64/Alqm), se sometieron a procedimientos posteriores de adición de anilina y persulfato de amonio, para obtener el polímero (polianilina) intercalado en los minerales, en dos formas principales: esmeraldina protonada (PANI-H), conocida como esmeraldina sal (conductora de electricidad) y esmeraldina base (PANI-B, no conductora de electricidad). Los materiales compuestos que se obtuvieron, se denotan como BVC/PANI-H, BVC/PANI-B, M64/PANI-H y M64/PANI-B.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), se tomaron en un microscopio FEI QUANTA 200 y los difractogramas de rayos X, en un equipo X Pert Pro MPD PANalitical, con ánodo de Cu (radiación  $\text{K}\alpha$ ,  $\lambda = 1,54056\text{\AA}$ ), mediante la técnica de polvo forzado, a temperatura ambiente, con tamaño de paso de  $0,05^\circ 2\theta$  y tiempo de paso 2 s.

Para las medidas de resistencia eléctrica, se construyeron probetas delgadas de 13 mm de diámetro (Tabla 1 y Figura 2a), mediante compresión de las muestras en un pastillador de acero inoxidable, teniendo control estricto de las masas, en una balanza Sartorius Research R200D, de cinco cifras decimales. Las medidas de diámetro y de altura de las probetas (Tabla 1), se hicieron con un calibrador digital marca DISCOVER®.

Para medir la resistencia, a través del tiempo, se construyeron electrodos de Cu de alta pureza ( $>99,99\%$ ), de diámetro igual a las probetas, sometidos a abrasión y limpieza antes de cada medida y sujetos a la probeta bajo presión. Las medidas, se hicieron en función del tiempo para observar la estabilidad de los materiales frente a posibles fenómenos de oxidación-reducción. Los datos continuos de resistencia, se tomaron usando un multímetro UT60E RS232C y un sistema computarizado (software UT60E Interface Program, ver 2.02). La temperatura, se registró fijando una termocupla de 1,0 mm de diámetro junto a las muestras. Cada muestra y la termocupla fueron envueltas en lana de vidrio (aislante térmico), para evitar las fugas térmicas.

Adicionalmente, se realizaron medidas sobre probetas, de igual masa y diámetro que las anteriores, compuestas

Tabla 1. Masa y dimensiones de cada una de las probetas diseñadas.

Sólidos	Masa (g)	Presión (psi)	Diámetro (mm)	Altura (mm)
BVC/Na	0,16333	22,0	13,0	0,64
BVC/Alqm	0,16330	22,0	13,0	0,79
BVC/PANI-H	0,16331	22,0	13,0	1,00
BVC/PANI-B	0,16334	22,0	13,0	0,95
M64/Na	0,16336	22,0	13,0	0,71
M64/Alqm	0,16338	22,0	13,0	0,81
M64/PANI-H	0,16333	22,0	13,0	0,92
M64/PANI-B	0,16331	22,0	13,0	0,97

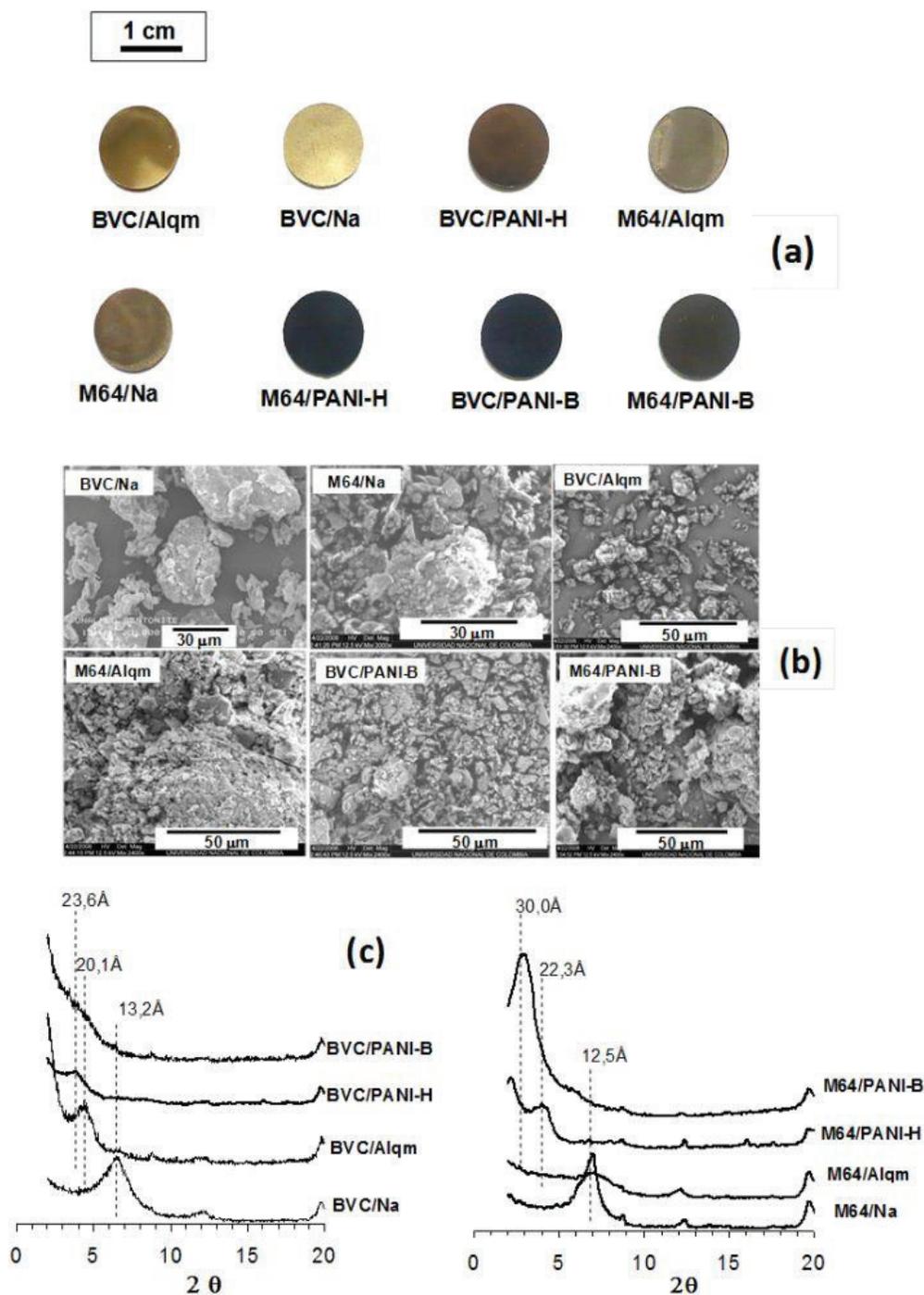


Figura 2. a) Fotografías de las probetas elaboradas con los diferentes materiales para medir sus propiedades eléctricas. b) Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras en polvo, c) Difractogramas de rayos X de las arcillas naturales y de materiales micro-compuestos.

de la mezcla de bentonita y polvo de grafito, con el objeto de observar el comportamiento eléctrico del material, con diferentes cargas de un conductor granular reconocido (grafito en polvo). Se obtuvieron probetas con 1%, 5%, 7%, 9%, de grafito en bentonita y 100%, de grafito. En cada caso, se adicionaron las cantidades requeridas y la mezcla (o el material único) se trituró en un mortero de ágata, hasta homogeneizarla.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las imágenes obtenidas por SEM (Figura 2b) confirman la morfología granular e irregular a nivel microscópico en todas las muestras, tanto en las arcillas sódicas como en los materiales compuestos. El material compuesto, se presenta de manera muy discreta, mediante la formación de granos muy pequeños, los cuales, luego de ejercer presión en la construcción de las probetas, deben generar límites de grano o de brechas entre partículas, lo que puede llegar a ser importante al momento de la conducción de electrones.

Los difractogramas obtenidos (Figura 2c) confirman la intercalación de las especies poliméricas sintetizadas, en los espacios interlaminares de los minerales de arcilla. El desplazamiento de la señal correspondiente al espaciado basal  $d_{001}$  (con valores de 12,5 Å y 13,2 Å para M64/Na y BVC/Na, respectivamente) hacia ángulos menores, es decir, hacia valores mayores de espaciado interlaminar, verifica la introducción efectiva de las especies de polianilina, entre láminas de arcilla. Además, se observa un desplazamiento efectivo de esta señal en el sólido BVC/Alqm y no en M64/Alqm, lo que indica la posible intercalación de cantidades mayores de los cationes alquilamonio, en la bentonita y una intercalación incipiente, en la arcilla M64.

Evidentemente, este paso tiene fuerte influencia en la síntesis posterior "*in situ*" de las especies de polianilina, lo que se verifica en los difractogramas de los sólidos M64/PANI-B y BVC/PANI-B. Para el material M64/PANI-B, se observa la señal típica de intercalación con espaciado basal  $d_{001}=30,0$  Å, pero para el sólido BVC/PANI-B, se percibe el perfil de difracción típico de un material delaminado o exfoliado. Este resultado muestra diferencias estructurales en los materiales compuestos obtenidos, lo cual, se origina por las variaciones fisicoquímicas que existen entre los minerales de partida, que se reflejan en su capacidad expansiva.

La figura 3 muestra las medidas de resistencia eléctrica de los materiales estudiados. Los sólidos BVC/PANI-B y M64/PANI-B no se incluyen, debido a que sus valores de resistencia son muy elevados y superaron los límites de medida. De hecho, la forma de polianilina incorporada en estos sólidos (PANI-B), conocida como esmeraldina base, es no conductora y empleada, frecuentemente, como protectora

contra la corrosión en metales. Las arcillas sódicas (VBC/Na y M64/Na) presentan valores de resistencia eléctrica bastante elevados; sin embargo, no son totalmente aislantes, como se esperaba; se observan ciertos valores de conductancia de corriente, como consecuencia de la humedad de estos materiales y la presencia de iones sodio, fundamentalmente.

En general, se observa, como tendencia, la disminución de la resistencia eléctrica, en la medida en que se incorporan las especies poliméricas (PANI-H) o los iones alquilamonio; no obstante, en el caso del sólido M64/Alqm, no hay una disminución considerable de la resistencia eléctrica con respecto a las mediciones sobre el material de partida (M64/Na).

La diferencia en conductancia (el inverso multiplicativo de la resistencia eléctrica) entre los sólidos M64/Alqm y BVC/Alqm, se puede explicar a partir de la incorporación incipiente de iones alquilamonio en la arcilla M64, lo cual, se verifica en sus perfiles de difracción de rayos X (Figura 2c) y también justifica el comportamiento eléctrico parecido al de su correspondiente arcilla sódica. Adicionalmente, los sólidos tienden a aumentar su resistencia con el tiempo, en especial, para los materiales con mayores valores de resistencia eléctrica, lo que muy probablemente está relacionado con el aumento de temperatura de estas muestras, donde se registraron elevaciones de temperatura hasta de 15°C, para las arcillas sódicas. Para estos materiales de resistencia elevada, gran parte de la corriente se transforma en calor, lo que genera mayor dificultad para que un conductor eléctrico permita el paso de electrones.

Para verificar las observaciones anteriores, se diseñaron experimentos con un conductor eléctrico reconocido (grafito en polvo) en la matriz arcillosa (bentonita sódica), en diferentes proporciones (Figura 4), encontrándose que, efectivamente, al aumentar las cantidades de grafito en la bentonita, la resistencia de los materiales tiende a cero y en los materiales con menor contenido de grafito (1 y 5%), la resistencia eléctrica tiende a elevarse con el tiempo, como consecuencia del calentamiento de las muestras.

De otro lado, en todos los materiales intercalados (arcillas con alquilamonio y polianilina conductora), se observaron caídas súbitas en la resistencia eléctrica (Figura 3), indicando una elevación repentina en el paso de corriente, aumento súbito y breve de la conductancia. Este comportamiento sugiere el paso forzado de micro-barreras dieléctricas después de la acumulación de ciertos valores de carga eléctrica y, en conjunto, con los resultados de difracción de rayos X, los cuales, indicaron intercalación o delaminación de las arcillas, permite considerar que, a nivel microscópico, parte de la población de las láminas del mineral de arcilla están desorientadas y obstaculizando la conexión efectiva entre las

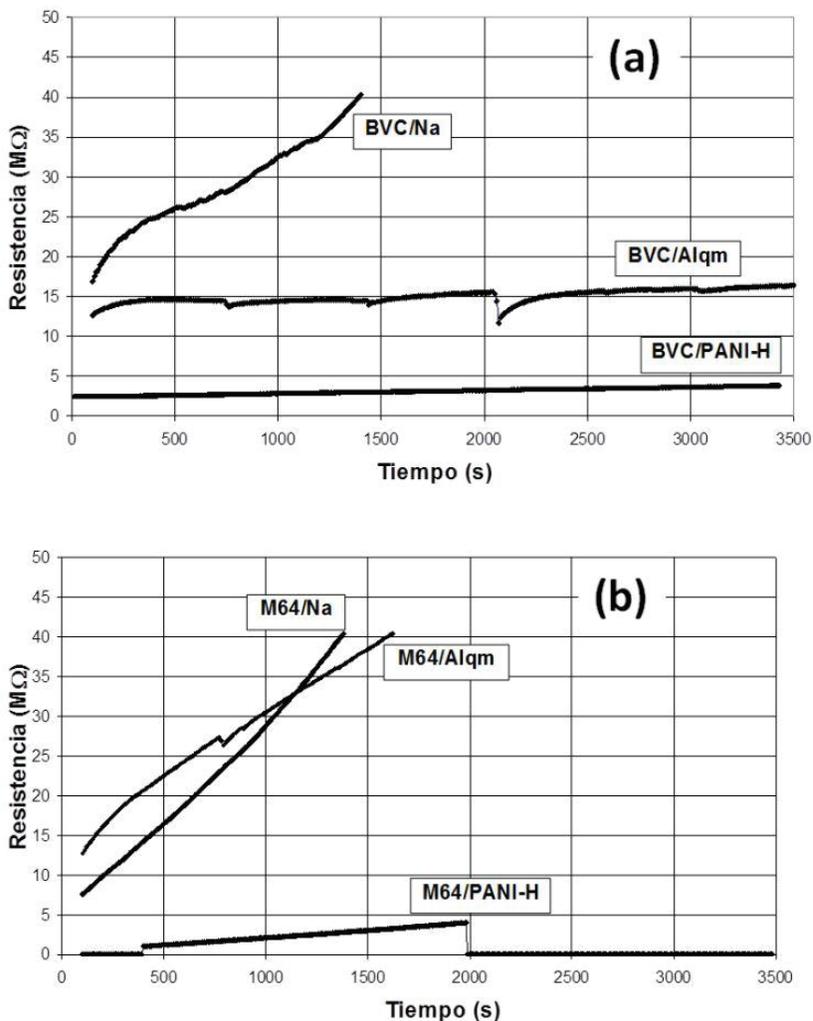


Figura 3. Variación de la resistencia eléctrica con el tiempo, en las arcillas sódicas (BVC/Na y M64/Na), en las arcillas intercaladas con iones alquilamonio (BVC/Alqm y M64/Alqm) y en los materiales compuestos de arcilla con polianilina en su forma conductora (BVC/PANI-H y M64/PANI-H).

macromoléculas de polianilina conductora (Figura 5).

Las figuras 5a y 5b indican la posible disposición de láminas de arcilla que interfieren en el flujo de corriente eléctrica (micro-barreras dieléctricas). Las figuras 5c y 5d representan la intercalación ideal (ordenada) de las macromoléculas de polianilina en el mineral de arcilla; sin embargo, un conjunto de apilamientos de láminas (“clay layer stacking”), se puede situar frente a otro con diferente orientación, generando interrupciones de conectividad. Este modelo de intercalación de polianilina conduce a la reflexión sobre nuevos métodos de preparación de este tipo de materiales, en el que, probablemente, será necesario conceder mayor importancia al grado de polimerización de la polianilina, es decir, lograr macromoléculas de mayor tamaño, para favorecer la conectividad entre las mismas, sin el sacrificio

excesivo de las propiedades mecánicas de los materiales. Adicionalmente, el modelo enseña la necesidad de recurrir a minerales de arcilla con tamaños de partícula muy pequeños y mineralógicamente bastante puros, toda vez que la presencia de partículas de otros minerales no expandibles podrían estar interfiriendo, tanto en el proceso de síntesis como en el paso de corriente sobre los sólidos.

En conclusión, la intercalación de especies conductoras de polianilina (esmeraldina sal) mediante su síntesis “*in situ*” en los espacios interlaminares de dos arcillas tipo montmorillonita, de origen mineralógico colombiano, conduce a la obtención de materiales micro-compuestos con propiedades eléctricas muy importantes, convirtiendo a los minerales de partida en sólidos conductores de electricidad,

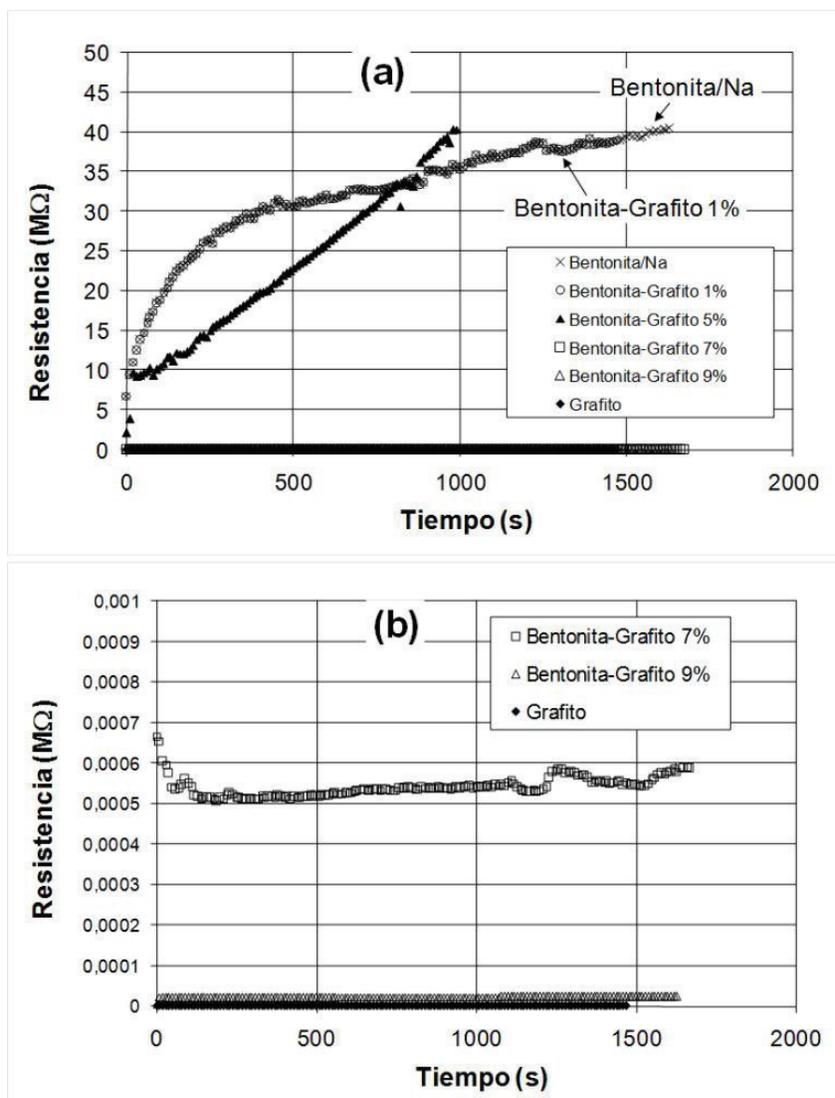


Figura 4. Medidas de resistencia eléctrica para materiales compuestos preparados mediante la mezcla de grafito/bentonita. a) Bentonita sódica, diferentes cargas de grafito y grafito puro; b) Ampliación de la escala para las curvas cercanas a cero.

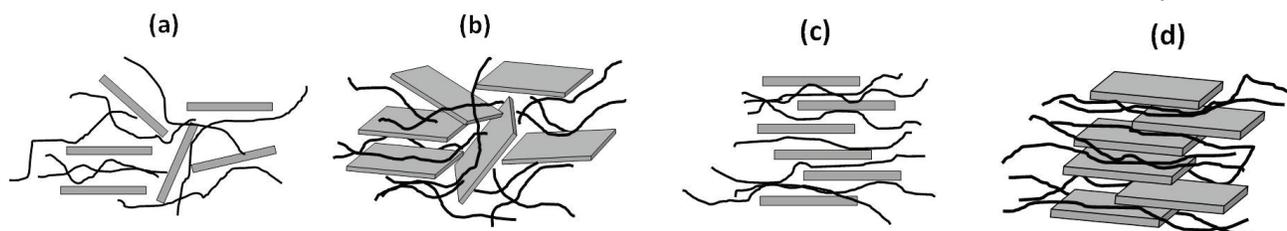


Figura 5. Modelo de la posible organización estructural de los componentes de los materiales micro-compuestos de polianilina/arcilla. a) y c) representan vistas laterales, b) y d) representan vistas en perspectiva.

con el aporte de las propiedades de matrices cerámicas. Los resultados de difracción de rayos X confirmaron la intercalación de las especies poliméricas y ponen en evidencia la influencia de la naturaleza mineralógica de las arcillas iniciales en la formación de materiales exfoliados. Las medidas de conducción eléctrica, además de revelar la potencialidad de los sólidos conductores, proporcionaron información adicional sobre la posible distribución y configuración de las fases componentes en los materiales compuestos de polianilina/montmorillonita.

**Agradecimientos:** Los autores ofrecen sus agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo logístico.

**Conflicto de intereses:** El presente trabajo fue preparado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados o la voluntad de publicación de los mismos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AYATOLLAHI, M.R.; SHADLOU, S.; SHOKRIEH, M.M.; CHITSAZZADEH, M. 2011. Effect of multi-walled carbon nanotube aspect ratio on mechanical and electrical properties of epoxy-based nanocomposites. *Polymer Testing*. 30:548-556.
2. BALLAV, N.; BISWAS, M. 2006. Conductive composites of polyaniline and polypyrrole with MoO<sub>3</sub>. *Materials Letters*. 60:514-517.
3. BEKRI-ABBES, I.; SRASRA, E. 2010. Characterization and AC conductivity of polyaniline-montmorillonite nanocomposites synthesized by mechanical/chemical reaction. *Reactive & Functional Polymers*. 70:11-18.
4. BUR, A.J.; LEE, Y.H.; ROTH, S.C.; START, P.R. 2005. Measuring the extent of exfoliation in polymer/clay nanocomposites using real-time process monitoring methods. *Polymer*. 46:10908-10918.
5. BAJPAI, V.; HE, P.; GOETTLER, L.; DONG, J.H.; DAI, L. 2006. Controlled syntheses of conducting polymer micro- and nano-structures for potential applications. *Synthetic Metals*. 156:466-469.
6. CAMPBELL, D.K. 2002. Conducting polymers and relativistic field theories. *Synthetic Metals*. 125:117-128.
7. CARRIAZO, J.G.; SAAVEDRA, M.J.; MOLINA, M.F. 2009. Estudio por DRX de la intercalación-pilarización de un mineral de arcilla tipo 2:1 con especies polioxocatónicas de aluminio. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 8(3):299-305.
8. CARRIAZO, J.; MOLINA, R.; MORENO, S. 2007. Caracterización estructural y textural de una bentonita colombiana. *Rev. Col. Quím.* 36(2):213-225.
9. DAI, T.; SHI, Z.; SHEN, C.; WANG, J.; LU Y. 2010. Self-strengthened conducting polymer hydrogels. *Synthetic Metals*. 160:1101-1106.
10. DEKA, M.; KUMAR, A. 2011. Electrical and electrochemical studies of poly(vinylidene fluoride)-clay nanocomposite gel polymer electrolytes for Li-ion batteries. *J. Power Source*. 196:1358-1364.
11. DEKA, M.; KUMAR, A. 2010. Enhanced electrical and electrochemical properties of PMMA-clay nanocomposite gel polymer electrolytes. *Electrochim. Acta*. 55:1836-1842.
12. DOBRZANSKI, L.A. 2006. Significance of materials science for the future development of societies. *J. Mat. Proces. Techn.* 175:133-148.
13. DO NASCIMENTO, G.M.; CONSTANTINO, V.R.L.; LANDERS, R.; TEMPERINI, M.L.A. 2006. Spectroscopic characterization of polyaniline formed in the presence of montmorillonite clay. *Polymer*. 47:6131-6139.
14. FRANCO, E.A.; MASPOCH, M.L. 2009. Estructura general de las arcillas utilizadas en la preparación de nanocompuestos poliméricos. *Ingenierías*. 12(44):35-41.
15. LU, X.; ZHANG, W.; WANG, C.; WEN, T.C.; WEI, Y. 2011. One-dimensional conducting polymer nanocomposites: Synthesis, properties and applications. *Progr. Polymer Sci.* 36:671-712.
16. MALWELA, T.; RAY, S.S. 2011. Unique morphology of dispersed clay particles in a polymer nanocomposite. *Polymer*. 52:1297-1301.
17. MIN, G. 1999. Conducting polymers and their applications in the film industry. *Polyaniline/Polyimide Blended Films*. *Synthetic Metals*. 102:1163-1166.
18. NARAYANAN, B.N.; KOODATHIL, R.; GANGADHARAN, T.; YAAKOB, Z.; SAIDU, F.K.; CHANDRALAYAM, S.

2010. Preparation and characterization of exfoliated polyaniline/montmorillonite nanocomposites. *Mat. Sci. Engineer. B.* 168:242-244.
19. RODRÍGUEZ, J.; CARRIAZO, J.; CORREDOR, P.; MOLINA, F.; MORENO, S. 2008. Síntesis de materiales microcompuestos de polianilina/arcilla: caracterización y evaluación de su actividad como agentes anticorrosivos. *Rev. Col. Quím.* 37(3):337-353.
20. SMITH, W.F.; HASHEMI, J. 2006. *Fundamentos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales*. Ed. MacGraw-Hill (México, D. F.). 1032p.
21. SU, L.; GAN, Y.X. 2012. Experimental study on synthesizing TiO<sub>2</sub> nanotube/polyaniline (PANI) nanocomposites and their thermoelectric and photosensitive property characterization. *Composites: Part B.* 43:170-182.
22. YEH, J-M.; LIOU, S-J.; LIN, C-Y.; CHENG, C-Y.; CHANG, Y-W.; LEE, K-R. 2002. Anticorrosively enhanced PMMA-clay nanocomposite materials with quaternary alkylphosphonium salt as an intercalating agent. *Chem. Materials.* 14:154-161.
23. YEH, J-M.; LIOU, S.-J.; LAI, C.-Y.; WU, P.-C.; TSAI, T.-Y. 2001. Enhancement of Corrosion Protection Effect in Polyaniline via the Formation of Polyaniline-Clay Nanocomposite Materials. *Chem. Materials.* 13:1131-1136.

Recibido: Marzo 2 de 2012

Aceptado: Agosto 26 de 2012