

# CIENCIA

## UNEMI

Revista de la Universidad Estatal de Milagro  
Milagro, Ecuador,

UNIVERSIDAD  
ESTATAL DE MILAGRO  
**UNEMI**

*Evolución Académica*



Indexada en:



En Catálogo



Dialnet

REDIB



# CIENCIA

UNEMI

UNIVERSIDAD  
ESTATAL DE MILAGRO  
UNEMI

*Evolución Académica*

## Departamento de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación

### Rector

Ing. Fabricio Guevara Viejo, MAE.

### Vicerrectora Académica y de Investigación

LSI. Jesennia Cárdenas Cobo, MSc.

### Vicerrector Administrativo

Ing. Washington Guevara Piedra, MSc.

### Secretaria General

Lcda. Diana Pincay Cantillo

### Director del Departamento de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Ing. Richard Ramírez Anormaliza, MSc.

### Vigésimo Número

ISSN 1390-4272 Impreso

ISSN 2528-7737 Electrónico

Indexada en: Latindex, Folio 19258

Dialnet, Código 23546

REDIB, CREI-OEI, Research Bib

Actualidad Iberoamericana, MIAR

Emerging Sources Citation Index (ESCI)

Tiraje: 1000 ejemplares

Septiembre, 2016

Milagro – Ecuador

La revista Ciencia UNEMI es una revista científica indizada y arbitrada, de publicación cuatrimestral. Dirigida a la población universitaria, que difunde los trabajos de investigación científica y reflexiones teóricas relacionadas con las áreas: Industrial; Tecnología, Informática y Comunicación; Administración y Gerencia; Salud Pública y Educación y Cultura. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos, siempre y cuando se cite su procedencia. Las opiniones de los autores son de su exclusiva responsabilidad y la revista no se solidariza con doctrinas, ideas o pensamientos expresados en ellos.

Solicitudes, comentarios y sugerencias favor dirigirse a: Universidad Estatal de Milagro, Departamento de Investigación, Revista Ciencia UNEMI. km 1.5, vía Milagro a Parroquia Virgen de Fátima. O comunicarse por + 593 04 2715081 Ext. 3115 -3212. Dirección electrónica: ciencia\_unemi@unemi.edu.ec

### Portada:

Algunas especies vegetales constituyen una fuente promisoriosa de compuestos químicos antimicrobianos de gran valor farmacológico. Al respecto, Azuero, Jaramillo, San Martín y D'Armas (2016) realizaron un estudio del efecto antimicrobiano de doce plantas usadas tradicionalmente en la medicina popular de Ecuador, el cual es de gran utilidad desde el punto de vista farmacológico para valorar su uso como agentes terapéuticos.

Imagen: pixabay



### Revista Ciencia UNEMI

Dra. Mayra D'Armas Regnault

**Directora (E) Revista Ciencia UNEMI**

Arq. Patricia Gavilanes Yanes

**Revisor de Estilo**

Lcdo. Miguel Astudillo Quiñones, MSc.

**Revisor de Traducción**

Lcdo. José Adrián Flores Moran

**Arte y Diagramación**

Ing. Freddy Bravo Duarte, MGTI

**Gestor Técnico**

Lcda. Michela Andrade Vásquez

**Departamento Relaciones Públicas UNEMI**

## Contenido

Vol. 9, N° 20, Septiembre 2016 Suplemento en Tecnologías Convergentes ISSN 1390-4272 Impreso ISSN 2528-7737 Digital

<b>Editorial</b>	<b>007</b>
<b>Preámbulo</b>	<b>008</b>
<b>BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, AMBIENTAL Y SALUD HUMANA</b>	
<b>Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador</b> Andrea Azuero, Carmita Jaramillo Jaramillo, Diana San Martín, Haydelba D'Armas	<b>011</b>
<b>Bioactividad de las esponjas marinas <i>Cliona varians</i> y <i>Cinachyrella kuekenthali</i> provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela</b> Lino Guevara, María Amaro, Milagros Fariñas, Ricauter López Bermúdez, Haydelba D'Armas	<b>019</b>
<b>Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales</b> Ana Echavarría, Haydelba D'Armas, Nubia Lisbeth Matute L., Carmita Jaramillo, Luisa Rojas de Astudillo, Ricardo Benítez	<b>029</b>
<b>Monitor Cardíaco Portátil con Interfaz Bluetooth "CARDIO UEES"</b> Pablo Jácome Ruiz, Cristian Baquerizo Cárdenas	<b>036</b>
<b>Queratina a partir de la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo, utilizando queratinasas producidas por <i>Bacillus subtilis</i></b> Geanina Machuca Loja, Braulio Madrid Celi, Diana Sanmartín Galván, Jhonny Pérez Rodríguez	<b>050</b>
<b>Prueba serológica para el virus del Nilo Occidental en los caballos de Los Ríos, Ecuador</b> Roberto Coello Peralta, Aslam Díaz Castillo, Rosario Zambrano Bonilla, Betty Pazmiño Gómez, Lizán Ayol Pérez	<b>059</b>
<b>Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por <i>Cryptococcus spp</i></b> Valeria Barcia Castilla, Sunny Sánchez Giler	<b>063</b>
<b>Comportamiento de variedades cubanas y venezolanas de frijol común, cultivados en condiciones de sequía</b> Amalia Domínguez Suárez, Yordany Martínez Dávalo, Yunel Pérez Hernández, Leticia Fuentes Alfonso, Rodolfo Darias Rodríguez, Maryla Sosa del Castillo, Ramón Rea Suárez, Daynet Sosa del Castillo	<b>068</b>
<b>CIENCIA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS</b>	
<b>Caracterización fisicoquímica de miel de angelita <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811) producida en Esmeraldas, Ecuador</b> Patricia Vit, Isbelia González, Lita Sorroza, Silvia R.M. Pedro	<b>077</b>
<b>Efecto de la adición de ácido ascórbico en la degradación de nitratos y nitritos en mortadela</b> Humberto Ayala Armijos, Carlos García González, Raquel Sánchez Prado, Yiceth Jirón Vélez, Washington Espinoza Ramón	<b>085</b>
<b>Efecto de la nisina sobre la conservación del helado tipo italiano</b> Efraín Romero Machado, Eduardo Héctor Ardisana	<b>093</b>
<b>Procesamiento del Té Verde, enriquecido con Vitamina C y Superóxido Dismutasa para la obtención de una bebida funcional antioxidante</b> Carlos Rivera Loja, María Carrillo Rodríguez, Nibia Novillo Luzuriaga, Roddy Peñafiel León, Fernando Landines Vera	<b>100</b>
<b>INGENIERÍA AMBIENTAL</b>	
<b>Calidad del agua destinada al consumo humano en un cantón de Ecuador</b> Renato Baque Mite, Luis Simba Ochoa, Betty Beatriz González Ozorio, Pedro Suatunce, Eduardo Díaz Ocampo, Lorena Cadme Arévalo	<b>109</b>
<b>Técnicas analíticas para el control de la contaminación ambiental</b> Carmen Hernández Domínguez, Patricio Álvarez Muñoz, Juliana Zapa Cedeño	<b>118</b>
<b>Normas de Publicación</b>	<b>132</b>

## Content

Vol. 9, N° 20, September 2016 Additional Issue on Converging Technologies SSN 1390-4272 Printed ISSN 2528-7737 Electronic

<b>Editorial</b>	<b>007</b>
<b>Preamble</b>	<b>008</b>
<b>PLANT BIOTECHNOLOGY, ENVIRONMENTAL AND HUMAN HEALTH</b>	
<b>Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador</b> Andrea Azuero, Carmita Jaramillo Jaramillo, Diana San Martín, Haydelba D'Armas	<b>011</b>
<b>Bioactivity of <i>Cliona varians</i> and <i>Cinachyrella kuekenthali</i> marine sponges from Isla Larga, Mochima Bay, Sucre state, Venezuela</b> Lino Guevara, María Amaro, Milagros Fariñas, Ricauter López Bermúdez, Haydelba D'Armas	<b>019</b>
<b>Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen</b> Ana Echavarría, Haydelba D'Armas, Nubia Lisbeth Matute L., Carmita Jaramillo, Luisa Rojas de Astudillo, Ricardo Benítez	<b>029</b>
<b>Portable Heart Monitor with a Bluetooth Interface "CARDIO UEES"</b> Pablo Jácome Ruiz, Cristiam Baquerizo Cárdenas	<b>036</b>
<b>Getting keratin from feather meal using keratinases produced by <i>Bacillus subtilis</i></b> Geanina Machuca Loja, Braulio Madrid Celi, Diana Sanmartín Galván, Jhonny Pérez Rodríguez	<b>050</b>
<b>Serological test for West Nile virus in horses of Los Ríos, Ecuador</b> Roberto Coello Peralta, Aslam Díaz Castillo, Rosario Zambrano Bonilla, Betty Pazmiño Gómez, Lizán Ayol Pérez	<b>059</b>
<b>Utility of indian ink as screening for meningitis by <i>Cryptococcus</i> spp</b> Valeria Barcia Castilla, Sunny Sánchez Giler	<b>063</b>
<b>Yield of Cubans and Venezuelan genotypes of common bean, grown in drought conditions</b> Amalia Domínguez Suárez, Yordany Martínez Dávalo, Yunel Pérez Hernández, Leticia Fuentes Alfonso, Rodolfo Darias Rodríguez, Maryla Sosa del Castillo, Ramón Rea Suárez, Daynet Sosa del Castillo	<b>068</b>
<b>SCIENCE AND FOOD ENGINEERING</b>	
<b>Physicochemical characterization of "angelita" <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811) honey produced in Esmeraldas, Ecuador</b> Patricia Vit, Isbelia González, Lita Sorroza, Silvia R.M. Pedro	<b>077</b>
<b>Effect of addition of ascorbic acid in the degradation of nitrate and nitrite in mortadella</b> Humberto Ayala Armijos, Carlos García González, Raquel Sánchez Prado, Yiceth Jirón Vélez, Washington Espinoza Ramón	<b>085</b>
<b>Effects of nisin on the preservation of italian style ice cream</b> Efraín Romero Machado, Eduardo Héctor Ardisana	<b>093</b>
<b>Processing of Green Tea, enriched with Vitamin C and Superoxide dismutase for the obtainment of an antioxidant functional Drink</b> Carlos Rivera Loja, María Carrillo Rodríguez, Nibia Novillo Luzuriaga, Roddy Peñafiel León, Fernando Landines Vera	<b>100</b>
<b>ENVIRONMENTAL ENGINEERING</b>	
<b>Quality of water intended for human consumption in a canton of Ecuador</b> Renato Baque Mite, Luis Simba Ochoa, Betty Beatriz González Ozorio, Pedro Suatunce, Eduardo Díaz Ocampo, Lorena Cadme Arévalo	<b>109</b>
<b>Analytical techniques for environmental pollution control</b> Carmen Hernández Domínguez, Patricio Álvarez Muñoz, Juliana Zapa Cedeño	<b>118</b>
<b>Guidelines for Publishing</b>	<b>132</b>

## Comité Editorial

### **Máster Richard Iván Ramírez**

Anormaliza  
Universidad Estatal de Milagro, UNEMI  
rramiraza@unemi.edu.ec  
Milagro, Ecuador

### **Dra. Mayra D'Armas Regnault**

Universidad Politécnica Antonio José de Sucre, UNEXPO  
mdarmas@unexpo.edu.ve  
Puerto Ordaz, Venezuela

### **Dr. Ángel Barrasa Notario**

Universidad de Zaragoza  
abarrasa@unizar.es  
Zaragoza, España

### **Dr. Simón Pérez Martínez**

Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA  
simonpm2006@gmail.com  
Caracas, Venezuela

### **Dra. Carmen Hernández Domínguez**

Universidad Estatal de Milagro, UNEMI  
chernandez.d@unemi.edu.ec  
Milagro, Ecuador

### **Dr. Mario Pérez-Montoro Gutiérrez**

Universidad de Barcelona  
perez-montoro@ub.edu  
Barcelona, España

### **Dr. Vicenc Fernández**

Universidad Politécnica de Cataluña  
vicenc.fernandez@upc.edu  
Barcelona, España

### **Dr. Thiago Duarte Pimentel**

Universidade Federal de Juiz de Fora  
thiagodpimentel@gmail.com  
Minas Gerais, Brazil

### **Dr. David Benavides Cuevas**

Universidad de Sevilla  
benavides@us.es  
Sevilla, España

### **Dr. Amr R. A. Radwan**

Universidad de El Cairo  
amrradwan2010@yahoo.com  
El Cairo, Egipto

### **Dr. Iván Esparragoza**

Universidad de Pensilvania  
iee1@psu.edu  
Filadelfia, USA

### **Dr. Humberto R. Álvarez A.**

Universidad Tecnológica de Panamá  
humberto.alvarez@utp.ac.pa  
Panamá, Panamá

### **Dr. Islam Hassouneh**

Palestine Polytechnic University (PPU).  
islamh@ppu.edu  
Hebrón, Palestina

### **Dr. Ahmed Yanguí**

Field Crop Regional Research Center  
ahmed.yanguí@yahoo.fr  
Beja, Tunisia

### **Dr. Rodrigo Romo Muñoz**

Universidad del Bio-Bio  
rromo@ubiobio.cl  
Concepción, Chile

### **Máster Ángela Laguna Caicedo**

Universidad Tecnológica de Panamá  
angela.laguna@utp.ac.pa  
Panamá, Panamá

### **Dr. Fernando Guilherme Tenório**

Escola Brasileira de Administração Pública y de Empresas de la Fundación Getulio Vargas  
fernando.tenorio@fgv.br  
Rio de Janeiro, Brazil

### **Máster Alexandra Anormaliza**

Director Affinity Group Field Support Center at NYC  
Department of Education  
aanorma@schools.nyc.gov  
New York, USA

## Comité de Evaluadores Externos

### **Master José Alió Mingo**

Máster en Biología Marina  
Docente investigador  
Instituto Tecnológico Superior Luis Arboleda Martínez  
josealio@hotmail.com  
Manta, Ecuador

### **Dra. Gina Álvarez Reyes**

Máster en Administración Ambiental  
Jefe Laboratorio Análisis del Agua  
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
galvarez101@yahoo.es  
Riobamba, Ecuador

### **Dra. Carolina Bañol Pérez**

Doctora en Ecología Terrestre  
Máster en Ciencias Ambientales  
Docente e investigadora  
Universidad Estatal Amazónica  
carolina.banol@gmail.com  
Puyo, Ecuador

### **Dr. Julio Andrés Bonilla Jaime**

Doctor en Biotecnología  
Docente – investigador  
Facultad Ciencias de la Vida  
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)  
mailto:jabonill@espol.edu.ec  
Guayaquil, Ecuador

### **Dr. Juan Manuel Cevallos Cevallos**

Doctor en Ciencias de Alimentos  
Docente – investigador  
Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)  
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)  
juan\_ma81@hotmail.com  
Guayaquil, Ecuador

### **Máster Javier Alcázar Espinoza**

Máster en Ingeniería Ambiental  
Docente investigador  
Universidad Estatal de Milagro  
javier\_alcazar73@hotmail.com  
Milagro, Ecuador

**Dra. Marisel De Lucca Osorio**

Doctora en Genética Humana  
Docente investigadora  
Universidad Técnica de Ambato  
mariselalpenes@hotmail.com  
Ambato, Ecuador

**Dra. Nardy Diez García**

Doctora en Biología  
Prometeo-ESPOL  
Docente investigadora  
Escuela Superior Politécnica del Litoral  
nardydiez@gmail.com  
Guayaquil, Ecuador

**Dr. Romel Guzmán Álvarez**

Doctor en Ciencia y Tecnología de  
alimentos  
Docente investigador  
Universidad Central de Venezuela  
Instituto de Ciencia y Tecnología de  
Alimentos  
romelguzman@gmail.com  
Caracas, Venezuela

**Máster Ángel Oswaldo  
González López**

Universidad Nacional Abierta  
ingenieria236@yahoo.com  
San Fernando de Apure, Venezuela

**Dra. María Luz Macho Eiras**

Directora del Laboratorio de Medio  
Ambiente  
Galicia (Xunta de Galicia)  
maria.luz.macho.eiras@xunta.es  
Galicia, España

**Dra. Migdalia Miranda  
Martínez**

Doctora en Ciencia Químicas  
Docente investigador  
Universidad de Guayaquil  
migdaliarandamiranda@hotmail.com  
Guayaquil, Ecuador

**Dra. Ana Paola Echavarría  
Vélez**

Doctora en Ingeniería de Alimentos  
Docente investigador  
Universidad del Cauca-Popayán  
ana08nov@gmail.com  
Cauca, Popayán

**Máster Fernando Molina  
Granja**

Máster en Informática Aplicada  
Máster en Educación a Distancia  
Docente investigador  
Universidad Nacional de Chimborazo  
femolinag@yahoo.es  
Riobamba, Ecuador

**Dr. Diego Fernando Quito  
Ávila**

PhD Plant Pathology (Virology),  
Centro de Investigaciones  
Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)  
Escuela Superior Politécnica del Litoral  
(ESPOL)  
diego.quito.avila@gmail.com  
Guayaquil, Ecuador

**Dra. Haydelba D'Armas  
Regnault**

Doctora en Química  
Máster en Ciencias Marinas  
Docente investigadora  
Universidad de Oriente  
haydelba@yahoo.com  
Cumaná, Venezuela

**Dr. Washington Sandoval Erazo**

Doctor en Ciencias Técnicas  
Docente investigador  
Escuela Superior Politécnica del Ejército  
wsandoval@espe.edu.ec  
Quito, Ecuador

**Dra. Fanny Solórzano Torres**

Máster en Nutrición Clínica  
Docente investigadora  
Universidad Espíritu Santo  
fsolorzano@uees.edu.ec  
Guayaquil, Ecuador

**Dr. Luis Troccoli Ghinaglia**

Doctor en Ciencias  
Especialidad Ciencias Marinas  
Universidad de Oriente  
luis.troccoli@gmail.com  
Nueva Esparta, Venezuela

**Dr. José Álvarez Barreto**

Doctor en Ingeniería Química, Biológica  
y de Materiales  
Universidad San Francisco de Quito  
jalvarreto@gmail.com  
Quito, Ecuador

# Análisis multivariante, paso importante para buenos resultados de investigación

**A**l momento de diseñar una investigación, factor clave a considerar es la metodología que sigue su desarrollo, en este caso, la técnica utilizada en el tratamiento de los datos; para el efecto las técnicas de análisis multivariante, son las que mejores opciones ofrecen al momento de obtener los resultados.

Al momento de diseñar una investigación, factor clave a considerar es la metodología que sigue su desarrollo, en este caso, la técnica utilizada en el tratamiento de los datos; para el efecto las técnicas de análisis multivariante, son las que mejores opciones ofrecen al momento de obtener los resultados.

La familia de las técnicas multivariante, denominadas así por el número de variables involucradas en el estudio, son populares, porque permiten crear conocimiento y con ello mejorar la toma de decisiones; analizan simultáneamente múltiples medidas con distintos individuos u objetos bajo una investigación. Por lo tanto, cualquier observación simultánea de dos o más variables puede ser considerado como análisis multivariante (Joseph F Hair, Black, Babin, & Anderson, 2010).

Para elegir la técnica multivariante el investigador debe plantearse tres interrogantes sobre el objetivo de la investigación y la naturaleza de los datos: 1) ¿Pueden las variables dividirse en categorías independientes y dependientes en base a alguna teoría?; 2) Si es posible lo del punto 1, ¿cuántas variables se tratan como dependiente en un solo análisis?; y, 3) ¿Cómo son medidas las variables, tanto dependientes como independientes?

Al responder las interrogantes planteadas en el párrafo anterior, el investigador tiene dos grandes

grupos de técnicas multivariante a utilizar: el primero lo constituye las técnicas con independencia: modelo de ecuaciones estructurales, análisis de correlación canónica, análisis multivariante de variables, análisis de correlación canónica con variables ficticias, regresión múltiple, análisis conjunto y análisis discriminante múltiple; el segundo grupo, las de interdependencia, que son: análisis factorial, análisis de conglomerados, análisis multidimensional y análisis de correspondencias.

Una técnica de dependencia se puede definir como una herramienta de análisis en la que una variable o conjunto de variables puede ser identificada como la variable dependiente que se predice o explica por otras variables conocidas como variables independientes. Un ejemplo de una técnica de dependencia es el análisis de regresión múltiple. Por el contrario, en una técnica de la interdependencia ninguna variable individual o grupo de variables se define como independiente o dependiente. El procedimiento consiste en el análisis simultáneo de todas las variables en el conjunto. El análisis factorial es un ejemplo de una técnica de interdependencia.

Por lo expuesto es muy importante que las universidades de Ecuador capaciten a sus profesores e investigadores en el uso de las técnicas de análisis multivariante y sus herramientas. En la Universidad Estatal de Milagro se desarrollan cursos y seminarios para capacitar a su personal académico. Es así que varios de sus profesores, principalmente los que cursan estudios doctorales realizan sus investigaciones con la aplicación de las técnicas referidas.

**T**enemos el gusto de presentar a la comunidad científica la Revista Ciencia UNEMI número 20, a través de la cual compartimos la excelente noticia de la inclusión en la base de datos Emerging Sources Citation Index (ESCI), la cual contiene aquellas revistas que están en proceso de evaluación/consideración para ser indexadas en las bases de datos de la Colección de Web of Science (WOS): “Science Citation Index”, “Social Science Citation Index” o “Arts & Humanities Citation Index”. Este logro se debe al esfuerzo del equipo de gestión y edición de la revista, al apoyo de las autoridades y sobre todo al aporte de los investigadores quienes han confiado a Ciencia UNEMI la divulgación de sus artículos científicos. El trabajo de mejorar e impulsar el ingreso a nuevos índices continúa y requiere de importantes esfuerzos de todos los que colaboramos en su realización.

El presente número de Ciencia UNEMI es un Suplemento en Tecnologías Convergentes e incluye catorce interesantes manuscritos relacionados con las áreas Ingeniería Ambiental, Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología Vegetal, Ambiental y Salud Humana, los cuales se describen a continuación.

En el área Biotecnología Vegetal, Ambiental y Salud Humana, Azuero et al analizan el efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador, comúnmente conocidas como: cedrón, altamisa, diente de león, mastrante, guaviduca, borraja, cilantro, toronjil, hierba luisa, ajeno, achochilla y moringa. Guevara et al presentan un estudio sobre la actividad biológica (toxicidad, antibacteriana y antifúngica) de dos especies de esponjas marinas que habitan en las costas venezolanas. Echavarría et al evalúan la presencia de metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante de dieciséis plantas de uso ancestral y medicinal cultivadas en Ecuador. Jácome y Baquerizo dan cuenta del desarrollo e implementación de un monitor cardíaco con Interfaz Bluetooth “CARDIO UEES” con características de portabilidad, facilidad de uso y tiempo prolongado de operación. Machuca et al investigan la obtención de queratina a partir de la hidrólisis enzimática de plumas de pollo,

utilizando queratinasas producidas por *Bacillus subtilis*. Coello et al estudian la presencia del virus del Nilo Occidental en los caballos de los humedales “Abrás de Mantequilla”, Los Ríos, Ecuador, a través de la detección de anticuerpos IgG e IgM en el suero sanguíneo de los caballos. Barcia y Sánchez evalúan si la prueba de tinta china es una eficiente prueba de tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp.* Domínguez et al estudian los indicadores productivos de variedades cubanas y venezolanas de frijol común, cultivados en condiciones de sequía.

En el área Ciencia e Ingeniería de Alimentos, Vit et al caracterizan diez indicadores de calidad físicoquímica en cuatro mieles ecuatorianas de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), recolectadas en la provincia de Esmeraldas. Ayala et al evalúan el efecto que produce la adición de ácido ascórbico en la reducción de la concentración de nitritos y nitratos en la mortadela. Romero y Héctor estudian el efecto de la nisina en el control de microorganismos y las propiedades organolépticas del helado tipo italiano, con vistas a su posible uso como conservante de este alimento. Rivera et al presentan los resultados de la elaboración de una bebida funcional a base de té verde, a la cual se añadió Superóxido Dismutasa y Vitamina C, con el fin de determinar el efecto antioxidante.

En el área Ingeniería Ambiental, Baque et al estudian los parámetros físicos, químicos y microbiológicos del agua destinada al consumo humano en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, Ecuador. Hernández et al realizan una revisión de las técnicas de análisis más importantes para el control de la contaminación medioambiental en función del tipo de muestra, orgánica o inorgánica, y del estado físico en que se encuentra.

Esperamos que esta variada colección de artículos sea de utilidad para los investigadores en las áreas presentadas. Reciban todos los autores nuestro sincero agradecimiento por escoger Ciencia UNEMI para la divulgación, así como también a los evaluadores que participaron en la revisión de los artículos y a nuestros lectores la gratitud de siempre por su solidaridad.

**Dra. Mayra D’Armas Regnault**

Directora (E) Revista Ciencia UNEMI

# CONVOCATORIA

## REVISTA CIENCIA UNEMI VOLUMEN 10, N° 23

TENEMOS EL GUSTO DE CONVOCAR A INVESTIGADORES, PROFESORES Y ESTUDIANTES A PRESENTAR SUS ARTÍCULOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN O DE APLICACIÓN PRÁCTICA PARA SER EVALUADOS Y SU POSTERIOR PUBLICACIÓN EN LA REVISTA CIENCIA UNEMI.



### FECHAS IMPORTANTES

Convocatoria  
Abierta

Fecha límite para la recepción de  
artículos  
30 de abril de 2017

Revisión interna, evaluación externa  
y corrección de los artículos  
Del 2 de mayo al 14 de julio de 2017

Notificación de artículos aceptados  
17 de julio de 2017

Diagramación de la revista  
17 de julio al 18 de agosto de 2017

31 de agosto de 2017:  
Publicación de la Revista Ciencia  
UNEMI, Volumen 10, N° 23,  
mayo-agosto 2017

### LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

1. Administración y Gerencia
2. Educación y Cultura
3. Industrial
4. Salud Pública
5. Tecnología, Informática y Comunicación

Los trabajos deben ser enviados en formato digital a la siguiente dirección electrónica: [ciencia\\_unemi@unemi.edu.ec](mailto:ciencia_unemi@unemi.edu.ec); o a través de la página web <http://ojs.unemi.edu.ec>

**Nota:** Puede descargar las Normas para la Publicación de artículos y criterios de evaluación de los mismos en la dirección:

<http://ojs.unemi.edu.ec/archivos/normas.pdf>

# CIENCIA

UNEMI

## Biotecnología Vegetal, Ambiental y Salud Humana

//////  
Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de  
uso ancestral en Ecuador

//////  
Bioactividad de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella  
kuekenthali* provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado  
Sucre, Venezuela

//////  
Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de  
extractos de dieciséis plantas medicinales

//////  
Monitor Cardíaco Portátil con Interfaz Bluetooth “CARDIO UEES”

//////  
Queratina a partir de la hidrólisis enzimática de harina de plumas de  
pollo, utilizando queratinasas producidas por *Bacillus subtilis*

//////  
Prueba serológica para el virus del *Nilo Occidental* en los caballos de  
Los Ríos, Ecuador

//////  
Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis  
por *Cryptococcus spp*

//////  
Comportamiento de variedades cubanas y venezolanas de frijol  
común, cultivados en condiciones de sequía

//////

# Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador

Andrea, Azuero<sup>1</sup>; Carmita, Jaramillo-Jaramillo<sup>1</sup>; Diana, San Martín<sup>1</sup>; Haydelba, D'Armas<sup>1,2\*</sup>

## Resumen

Los ejemplares de las especies vegetales *Lippia citriodora* K (cedrón), *Ambrosia artemisifolia* L (altamisa), *Taraxacum officinale* Weber (diente de león), *Ageratum conyzoides* L (mastrante), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (guaviduca), *Borago officinalis* L (borraja), *Coriandrum sativum* L (cilantro), *Melissa officinalis* L (toronjil), *Cymbopogon citratus* S (hierba luisa), *Artemisia absinthium* L (ajenjo), *Momordica charantia* L (achochilla) y *Moringa oleífera* Lam (moringa) se recolectaron al azar en las localidades de Machala y Santa Rosa, Ecuador. Las hojas fueron lavadas, secadas, molidas y extraídas por maceración con metanol; los filtrados concentrados por evaporación a presión reducida. Para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos obtenidos, se utilizó la técnica de difusión en agar, mediante la cual éstos se probaron frente a cepas de bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativa (*Escherichia coli* y *P. aeruginosa*), y una cepa del hongo (*Candida albicans*). Todos los extractos analizados, a excepción de los de *L. citriodora* y *A. conyzoides*, exhibieron una acción bactericida contra todas las cepas bacterianas ensayadas, lo cual refleja la importancia de estas especies en la producción de fitofármacos antibióticos. *T. officinale* y *P. carpunya* presentaron un efecto antibacteriano alto contra *E. coli*; sin embargo, *S. aureus* no presentó sensibilidad frente los extractos de *L. citriodora* y *P. carpunya*. El bioensayo de actividad antifúngica realizado a los extractos de las especies estudiadas contra *C. albicans*, mostró que todos tienen acción fungicida alta, a excepción de *T. officinale* con un menor efecto inhibitorio del crecimiento fúngico. Se puede inferir que estas plantas constituyen una fuente promisorio de compuestos químicos antimicrobianos de gran valor farmacológico.

**Palabras Clave:** actividad antibacteriana; actividad antifúngica; bioactividad; plantas medicinales.

## Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador

### Abstract

The specimens of plant species *Lippia citriodora* K (cedrón), *Ambrosia artemisifolia* L (altamisa), *Taraxacum officinale* Weber (diente de león), *Ageratum conyzoides* L (mastrante), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (guaviduca), *Borago officinalis* L (borraja), *Coriandrum sativum* L (cilantro), *Melissa officinalis* L (toronjil), *Cymbopogon citratus* S (hierba luisa), *Artemisia absinthium* L (ajenjo), *Momordica charantia* L (achochilla) y *Moringa oleífera* Lam (moringa) were collected randomly in the towns of Santa Rosa and Machala, Ecuador. The leaves were washed, dried, ground and extracted by maceration with methanol; the filtrates concentrated by evaporation under reduced pressure. A diffusion technique in agar was used to determine the antimicrobial activity of the obtained methanolic extracts, by which they were tested against strains of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *P. aeruginosa*), and a strain of fungus (*Candida albicans*). All extracts analyzed, except for those of *L. citriodora* and *A. conyzoides* showed a bactericidal action against all bacterial strains tested, reflecting the importance of these species in the production of herbal medicines antibiotics. *T. officinale* and *P. carpunya* showed a high antibacterial effect against *E. coli*; however, *S. aureus* did not show sensitivity to *P. carpunya* and *L. citriodora* extracts. The antifungal activity bioassay conducted to studied extracts against *C. albicans*, showed that all have high fungicidal action, except for *T. officinale* with less inhibitory effect of fungal growth. It can be inferred that these plants are a promising source of antimicrobial components of high pharmacological value.

**Keywords:** antibacterial activity; antifungal activity; bioactivity; medicinal plants.

**Recibido:** 13 de mayo de 2016

**Aceptado:** 3 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Ecuador. E-mails: hdamasr@unemi.edu.ec; htrinidad86@hotmail.com

## I. INTRODUCCIÓN

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado (Domingo y López-Brea, 2003). Después de un período en que la industria farmacéutica se dedicó exclusivamente a la fabricación de fármacos de síntesis, dejando atrás las antiguas medicinas que tenían como base los extractos de plantas medicinales, hay un cambio cualitativo en los programas industriales con dedicación a la búsqueda de nuevos medicamentos de origen herbario (Ruiz y Roque, 2009).

Un número creciente de personas recurren a sus propiedades curativas basándose en su uso tradicional. No obstante, ciertas plantas medicinales no han mostrado las propiedades que les atribuye la medicina popular, e incluso han resultado peligrosas (Hernández, 2006). Existen reportes en la literatura de que numerosas investigaciones están encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, mientras otras están destinadas a verificar las propiedades que se les atribuyen (Avellaneda, 2005).

El estudio científico de las plantas medicinales es una fuente relevante para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan, pero también permite un conocimiento más profundo de los vegetales que conduce a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos de síntesis (Vivot et al, 2012). Actualmente, uno de los problemas más comunes es que existen plantas medicinales que tienen una actividad antimicrobiana conocida por la población, sin embargo no han sido analizadas a fondo, para determinar cuáles son sus beneficios, pasando muchas veces desapercibidas.

En la actualidad existen una gran variedad de plantas medicinales que crecen y son recolectadas en Ecuador, ya que éstas contienen metabolitos secundarios que presentan actividad biológica, sin embargo a la mayoría de las plantas que crecen en el país, no se les ha realizado un estudio profundo para conocer las grandes propiedades curativas que poseen. Algunas de estas plantas son utilizadas por las personas, otras lastimosamente no son consumidas

por no ser reconocidas por la población.

El control de diferentes patologías, ya sean causadas por hongos o bacterias, utilizando extractos metanólicos de una gran variedad de plantas medicinales cultivadas en Ecuador, es algo que aún no ha sido probado. La mayoría de estas plantas sometidas a estudio han demostrado poseer efectos antibacterianos y antifúngicos, muy aparte de que poseen otras propiedades curativas además de las mencionadas; las cuales podrían estar relacionadas con la biosíntesis de metabolitos biológicamente activos, según el hábitat donde crecen las plantas.

La extracción de los metabolitos secundarios de las hojas de las especies *Lippia citriodora* K (cedrón), *Ambrosia artemisifolia* L (altamisa), *Taraxacum officinale* Weber (diente de león), *Ageratum conyzoides* L (mastrante), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (guaviduca), *Borago officinalis* L (borraja), *Coriandrum sativum* L (cilantro), *Melissa officinalis* L (toronjil), *Cymbopogon citratus* S (hierba luisa), *Artemisia absinthium* L (ajenjo), *Momordica charantia* L (achochilla) y *Moringa oleífera* Lam (moringa), y el estudio del efecto antibacteriano y antifúngico de las hojas de dichas plantas medicinales, constituye el objetivo de esta investigación. Los resultados obtenidos constituirán un aporte al conocimiento de la bioactividad de estas especies vegetales diseminadas en latitudes ecuatorianas, y por ende se conocerán los beneficios que éstas brindan a la población del país.

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

Recolección de las muestras: los ejemplares de las especies vegetales *Lippia citriodora* K (cedrón; Verbenaceae), *Ambrosia artemisifolia* L (altamisa; Asteraceae), *Taraxacum officinale* Weber (diente de león; Asteraceae), *Ageratum conyzoides* L (mastrante; Asteraceae), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (guaviduca; Piperaceae), *Borago officinalis* L (borraja; Boraginaceae), *Coriandrum sativum* L (cilantro; Apiaceae), *Melissa officinalis* L (toronjil; Lamiaceae), *Cymbopogon citratus* S (hierba luisa; Opaceae), *Artemisia absinthium* L (ajenjo; Asteraceae), *Momordica charantia* L (achochilla; Cucurbitaceae) y *Moringa oleífera* Lam (moringa; Moringaceae) fueron recolectados al azar en ecosistemas naturales de las localidades de Machala y Santa Rosa (Provincia

del Oro: 65-85 % de humedad relativa y temperatura promedio de 26 °C), Ecuador, en julio y agosto de 2014; siendo procesados en el laboratorio, sin almacenamiento previo. La identificación de las especies fue realizada por el Botánico Jesús Inca del Herbario de Quito, Ecuador.

**Obtención de los extractos:** de cada planta se utilizaron sólo las hojas, éstas se lavaron con agua destilada y fueron secadas a temperatura ambiente por 24 horas y posteriormente en una estufa (MEMMERT SNB 400 con flujo de aire) a 37 °C por 24 horas. Luego, se pulverizaron con un molino (Lab. Mill serial No. 56969, Type AR400 Erweka®, Germany) y se pesaron. Los extractos se obtuvieron por maceración del polvo de las hojas con metanol 100% puro por 72 horas, para la extracción de los compuestos polares como los no polares, ya que se quería averiguar la sensibilidad microbiana ante una gama amplia de metabolitos secundarios. Los extractos fluidos se filtraron y el residuo se reextrajo con metanol por 48h; los filtrados combinados fueron concentrados a presión reducida (aprox. 11 mbar) y 40 °C en un rotaevaporador marca Hidolph, obteniéndose el extracto metanólico crudo para cada especie. Se determinó la masa de cada uno de los extractos de las plantas estudiadas.

**Actividad antimicrobiana:** para determinar la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en agar, según la metodología descrita por Bauer et al. (1966), empleándose cepas de bacterias certificadas: una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y dos Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La misma consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro con 10 µl de una solución preparada (40 mg/ml) del extracto a analizar. Estos discos se colocaron dentro de cajas de Petri que contenían agar Mueller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1x10<sup>8</sup> bacterias/ml), preparada por comparación con un patrón comercial estándar N° 0,5 de McFarland. Posteriormente, las cajas se preincubaron a 5°C durante 12 horas, para permitir la difusión del extracto, y luego, se incubaron a 37°C durante 48 horas, para permitir el crecimiento bacteriano. Las zonas claras que se formaron alrededor de los discos, se consideraron halos de inhibición, los cuales fueron medidos, registrando para cada caso el

diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para evaluar **la actividad antimicótica** se siguió la técnica descrita por Madubunyi (1995), utilizando cepas de un hongo patógeno (*Candida albicans*) de origen clínico. Dicha cepa se incubó por un periodo de 5 a 7 días a temperatura ambiente en un tubo con Agar Papa Dextrosa (PDA). Al cabo de este tiempo, se añadió 10 ml de agua destilada estéril al tubo, se agitó vigorosamente y se filtró a través de un embudo con gasa previamente estéril, para así obtener una suspensión de esporas. La cepa de *C. albicans* se trató siguiendo la metodología de la comparación con un estándar de turbidez 0,5 McFarland. La solución esporial obtenida se colocó sobre cápsulas de Petri, previamente preparadas con PDA, empleando hisopos estériles. Posteriormente, se colocaron los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados previamente con el extracto, y luego, se incubaron por dos días a temperatura ambiente. La aparición de halos de inhibición alrededor del disco indicó la actividad fúngica del extracto, los cuales se verificaron tomando en cuenta el diámetro (mm) de los mismos.

Los experimentos de análisis del efecto antimicrobiano de los extractos, se realizaron por triplicado para cada una de las especies vegetales estudiadas. Para establecer los diferentes grados de inhibición del crecimiento bacteriano, se consideraron los rangos de los diámetros de inhibición, como los sugieren Rios et al (2009), aplicados a los extractos de las especies empleadas en este estudio, estableciéndose posteriormente rangos de la actividad antimicrobiana.

## 2. Resultados y discusión

### Obtención de los extractos

Obtenidos todos los extractos metanólicos de las hojas de las plantas estudiadas, se determinó la masa de los diversos extractos, así como también, su porcentaje de rendimiento. En la Tabla 1 se encuentran reflejados todos estos resultados, tomando como referencia la masa inicial de las hojas de cada especie vegetal y la masa del extracto crudo de las hojas, los cuales se usaron luego para analizar el efecto antimicrobiano de dichos extractos. En dicha tabla se observan los porcentajes de rendimientos de extracción de las hojas secas, pudiéndose notar que *T. officinale* (diente de

león) presentó el rendimiento de extracción más alto y *C. citratus* (hierba luisa) mostró el rendimiento más bajo con respecto a las demás especies.

El extracto crudo de las hojas de *T. officinale* resultó ser el de mayor porcentaje de rendimiento con un 9,65%, seguido del de *A. artemisifolia*, *A. conyzoides* y *C. sativum* (8,84, 8,20 y 8,17 % respectivamente); mientras que un porcentaje menor

de 3,92 % correspondió al extracto metanólico de *C. citratus*. Tomando en consideración que el disolvente utilizado fue el metanol, se puede considerar que en las cuatro primeras especies mencionadas se encuentra una mayor cantidad de metabolitos secundarios con polaridades de media a alta fundamentalmente. Es posible entonces que en las hojas de *C. citratus* se encuentren metabolitos de baja polaridad.

**Tabla 1. Porcentajes de rendimiento de los extractos metanólicos de las hojas de las plantas estudiadas.**

Especie	Masa inicial de las hojas (g)	Masa del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>L. citriodora</i> (cedrón)	12,00	0,8611	7,18
<i>A. artemisifolia</i> (altamisa)	11,00	0,9722	8,84
<i>T. officinale</i> (diente de león)	10,00	0,9654	9,65
<i>A. conyzoides</i> (mastrante)	10,00	0,8199	8,20
<i>P. carpunya</i> (guaviduca)	12,00	0,9008	7,51
<i>B. officinalis</i> (borraja)	12,00	0,8874	7,40
<i>C. sativum</i> (cilantro)	11,00	0,8983	8,17
<i>M. officinalis</i> (toronjil)	10,00	0,5446	5,45
<i>C. citratus</i> (hierba luisa)	12,00	0,4698	3,92
<i>A. absinthium</i> (ajenjo)	10,00	0,7604	7,60
<i>M. charantia</i> (achochilla)	10,00	0,6442	6,44
<i>M. oleifera</i> (moringa)	10,00	0,7527	7,53

**Actividad antimicrobiana**

La Tabla 2 muestra los resultados promedios obtenidos, sobre los halos de inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico, por efecto de los extractos metanólicos de doce especies vegetales

ensayadas por el método del antibiograma, con tres cepas de bacterias Gram (+) y (-), y un hongo patógeno.

**Tabla 2. Actividad antimicrobiana mostrada por algunos extractos metanólicos de las hojas frente a las cepas utilizadas.**

Microorganismos	<i>L. citriodora</i>	<i>A. artemisifolia</i>	<i>T. officinale</i>	<i>A. conyzoides</i>	<i>P. carpunya</i>	<i>B. officinalis</i>	<i>C. sativum</i>	<i>M. officinalis</i>	<i>C. citratus</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>M. charantia</i>	<i>M. oleifera</i>
<b>Bacterias</b>												
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	1+	2+	1+	-	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
<i>Escherichia coli</i>	2+	1+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	1+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	1+
<b>Hongos</b>												
<i>Candida albicans</i>	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+

Diámetros de los halos de inhibición: (-) <6 mm ninguna actividad antimicrobiana; (1+) 6-8 mm poca actividad antimicrobiana; (2+) 8-10 mm mediana actividad antimicrobiana; (3+) 10-14 mm alta actividad antimicrobiana.

En la Tabla 2, se puede observar que todos los extractos analizados, a excepción de los de *L. citriodora* y *A. conyzoides*, exhibieron una acción bactericida contra todas las cepas bacterianas ensayadas, lo cual refleja la importancia de estas especies en la producción de fitofármacos antibióticos. *L. citriodora* (cedrón) mostró un efecto antibacteriano mediano contra *E. coli* y *P. aeruginosa*; no obstante, *S. aureus* no presentó sensibilidad frente a el extracto de esta especie; sin embargo, en otra investigación se reporta que *L. citriodora* mostró un efecto antibacteriano contra *E. coli* y *S. aureus*, pero no presentó acción inhibitoria contra *P. aeruginosa* (Sánchez et al., 2012). Además, se puede apreciar que *A. artemisifolia* (altamisa) muestra un efecto bactericida leve tanto contra las bacterias Gram (+) como Gram (-). Similar efecto inhibitorio frente al *S. aureus*, se observó en otra muestra de altamisa recolectada en Bolivia, demostrando también actividad antibacteriana en contra de cepas de *Bacillus subtilis* y *Micrococcus oxford* (Velásquez L, 2007).

*T. officinale* (diente de león) mostró una actividad antibacteriana alta contra *E. coli*, y en menor proporción inhibió el crecimiento de las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Tabla 2). Caso contrario, fue lo reportado en otra investigación donde esta planta no demostró tener actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *S. aureus* (Ramos, 2013). El extracto de *A. conyzoides* (mastrante) exhibió un efecto antibacteriano mediano contra *E. coli*, pero también actuó contra la *P. aeruginosa* y *S. aureus* aunque en menor proporción. Adetutu et al. (2012) reportaron halos de inhibición de hasta 12 mm (3+) al evaluar la sensibilidad bacteriana de la cepa *E. coli* frente a un extracto etanólico de *A. conyzoides* obtenido también por maceración.

*P. carpunya* (guaviduca) presentó un efecto antibacteriano alto contra *E. coli*, similar a *T. officinale*, y una actividad antibacteriana leve contra *P. aeruginosa* (Tabla 2); se podría decir que ambos extractos son una fuente de principios bioactivos, posibles antibióticos contra la cepa Gram (-) *E. coli*. No existen reportes en la literatura sobre la actividad antibacteriana que pueda poseer la planta *P. carpunya*; sin embargo, presenta otras propiedades terapéuticas, tales como poseer una actividad gastroprotectora, produciendo una

rápida y total recuperación de la mucosa gástrica, evidenciándose en el análisis macroscópico y con el estudio histopatológico de los estómagos de ratas de experimentación (Quintana, 2012).

El extracto de *B. officinalis* (borraja) presentó un efecto antibacteriano leve en contra de las todas las cepas bacterianas ensayadas (Tabla 2). No existen reportes en la literatura sobre la actividad antibacteriana que posee esta especie vegetal. Un comportamiento similar a la borraja, lo mostraron los extractos de *C. sativum* (cilantro) y *M. oleífera* (moringa) (actividad antibacteriana leve) (Tabla 3). *C. sativum* ha sido utilizado para tratar algunas dolencias no relacionadas con las enfermedades infecciosas; mas se ha demostrado científicamente que tiene actividad antimicrobiana frente a diferentes géneros de bacterias Gram Positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (Ardila et al. 2009), lo cual está en concordancia con lo generado en el presente estudio.

Hace dos décadas se reportaron resultados científicos que confirman la acción antibacteriana de *M. oleífera* al inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Cáceres et al., 1991); y en otro más reciente, se demostró la actividad antifúngica de aceites esenciales de las hojas y de extractos alcohólicos de las semillas y las hojas de *M. oleífera* contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Trichopyton metagrophytes*, aunque no se han reportado ensayos con *C. albicans* (Chuang et al., 2007).

La Tabla 2 muestra que los extractos de *M. officinalis* (toronjil), *C. citratus* (hierba luisa) y *A. absinthium* (ajenjo) exhibieron una actividad antibacteriana mediana o moderada contra la bacteria Gram (-) *E. coli*, y a su vez una actividad leve contra las otras dos cepas *P. aeruginosa* y *S. aureus* ensayadas. En la literatura no se ha informado sobre la actividad antibacteriana de *Melissa officinalis*; solo se ha reportado su efecto antioxidante en un estudio realizado por Calderón (2011), lo cual indica que dicho extracto puede convertirse en candidato para el aislamiento de compuestos antioxidantes activos.

En otra investigación realizada con *C. citratus*, su extracto mostró un efecto antibacteriano significativo en contra de las cepas *S. aureus*, *Sh. flexneri*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *V. cholerae*, y baja actividad frente a

*P. aeruginosa*, similar al resultado hallado en esta investigación donde esta cepa se muestra un poco resistente, indicando que *C. citratus* (hierba luisa) puede utilizarse para tratamientos de afecciones intestinales como la salmonelosis y el cólera, así como también en el tratamiento de procesos respiratorios causados por la bacteria *S. aureus* (Alzamora et al. 2001). Guerra et al. (2001) realizaron un estudio con el extracto fluido etanólico al 70% de *A. absinthium* y el mismo mostró tanto actividad anti-giardíosis como antimicrobiana, contra *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *C. albicans*, lo que justifica su uso en la medicina tradicional.

En la Tabla 2 también se observa que el extracto de *M. charantia* (achochilla) ejerció su efecto antibacteriano en contra de las tres cepas bacterianas ensayadas, mostrando actividad antibacteriana moderada contra las cepas Gram (-) *P. aeruginosa* y *E. coli*, y leve contra *S. aureus*. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Lagarto et al. (2008), cuya investigación demuestra que el extracto etanólico de *Momordica charantia* exhibió actividad antibacteriana sobre *Shigella*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *E. coli* y *S. aureus*. Además, esta planta presentó actividad antitumoral, antiinflamatoria y antihelmíntica; efecto antimicótico e inhibición de radicales libres, es decir el extracto de esta especie posee un potencial terapéutico avalado científicamente, que se utiliza en el tratamiento de múltiples enfermedades, en especial la diabetes.

En relación a la actividad antifúngica observada, se puede decir que todas las especies vegetales analizadas muestran un efecto antifúngico fuerte contra la cepa del hongo *C. albicans*; sin embargo dicha cepa mostró sensibilidad bacteriana moderada ante el extracto de *T. officinale* (Tabla 2). No se han reportado investigaciones científicas sobre la posible actividad de *L. citriodora*, *A. artemisifolia* y *T. officinale* contra la cepa *C. albicans*; sin embargo en un estudio reciente se demuestra que las dos últimas especies si tienen actividad antifúngica contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet conocida como Sigatoka negra (Viveros et al., 2006).

El aceite esencial de *A. conyzoides* demostró tener un potente efecto antifúngico contra los hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sclerotium rolfsii* y *Trichophyton mentagrophytes*,

según un estudio realizado por Pattnaik et al. (1996). No se han reportado investigaciones en este campo para las especies *Piper carpunya* y *B. officinalis* contra ninguna cepa fúngica; no obstante, se recomienda usar el aceite de *B. officinalis* ya sea administrado por vía oral como por vía tópica en el tratamiento de afecciones de la piel.

Otros estudios con *C. sativum* y *M. officinalis*, han demostrado la sensibilidad de la cepa *C. albicans* frente a dichos extractos, como es la investigación realizada por Inouye et al. (2006), donde se demostró que *C. sativum* tiene un efecto antifúngico contra *C. albicans*, *P. islandicum* y *Aspergillus flavus*, determinándose que su actividad antifúngica se fue reduciendo de acuerdo a los componentes de esta planta; y en otra investigación realizada a *Melissa officinalis*, donde esta planta exhibió un efecto anti fúngico frente a *C. albicans*, en pacientes con síntomas de vulvovaginitis, indicando así la eficacia de esta planta (Márquez, 2012).

Alzamora et al. (2001) realizaron una investigación con el aceite esencial de *C. citratus*, observándose un efecto antimicótico fuerte contra *C. albicans*, al igual que el mostrado por el extracto de hierba luisa en este trabajo de investigación; además, ejerciendo un efecto similar al del micosatin que fue el control utilizado, como dato adicional para un tratamiento tópico de una uña del pie afectada por hongos, con gotas de aceite esencial puro de hierba luisa, el cual exhibió su potente efecto sanando rápidamente, se podría decir que esta especie se perfila como una opción en el tratamiento de micosis ocasionadas por *C. albicans*.

Existen otros trabajos realizados en relación a la bioactividad de *A. absinthium* (ajenjo) y *M. charantia* (achochilla) con resultados similares a los obtenidos en esta investigación, entre los cuales están el de Guerra et al. (2001) donde un análisis realizado al extracto de ajenjo indicó que tuvo actividad en contra de la cepa *C. albicans* a un rango de 26 mg/dl, lo que justifica su uso tradicional. Así como el de Lagarto et al., (2008) que demostró que *M. charantia* posee una fuerte actividad antifúngica frente a *C. albicans*, como también otras actividades antitumorales, antiespermatogénico antilipolítica entre otras, pudiendo ser utilizada esta planta en diversas enfermedades, siempre y cuando sea caracterizado su potencial tóxico para avalar su empleo como agente terapéutico.

### III. CONCLUSIONES

La mayoría de las especies vegetales estudiadas exhibieron un efecto antibacteriano y antifúngico significativo contra las cepas de bacterias Gram (+) y Gram (-), y hongo ensayado (*C. albicans*).

Las especies de plantas analizadas constituyen una fuente promisorio de compuestos químicos antimicrobianos.

El estudio realizado constituye una información novedosa sobre la actividad antimicrobiana de doce especies usadas tradicionalmente en la medicina popular de Ecuador, el cual es de gran utilidad desde el punto de vista farmacológico para valorar su uso como agentes terapéuticos.

### IV. REFERENCIAS

- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. (2001). Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 62 (2), 156 – 161.
- Aponte, L., & Cardona, C. (2009). Educación ambiental y evaluación de la densidad poblacional para la conservación de los cóndores reintroducidos en el Parque Nacional Natural Los Nevados y su zona amortiguadora (tesis de pregrado). Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Ardila, M., Vargas, A., Pérez, J., y Mejía, L. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*, *Biosalud*, 8 (1), 47 – 57.
- Avellaneda, S., Rojas, N., Cuellar, R. y Fonseca, R. (2005). Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose. *Rev Cubana Plant Med.*, 10 (2), 1-10.
- Cáceres, A, Cebrera, O., Morales, O., Mollinedo, P., y Mendía, P. (1991). Pharmacological properties of *M. oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology*, 33 (3), 213-216.
- Calderón, J. (2011). Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risaralda) (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Chuang, P.H., Lee, C-W, Chou, J-Y, Murugan, M., Shieh, B-J, y Chen, H-M. (2007). Effect of crude extracts and essential oils of *M. oleifera* Lam. *Bioresour Technol.*, 98, 232-236.
- Guerra, M., Torres, D., y Martínez, P. (2001). Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. *Rev Cubana Plant Med.*, 6 (2), 48-51.
- Domingo, D., y López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16, 385-393.
- Hernández, N., Ramos, A., y Vizoso A. (2006). Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H.B.K. *Rev Cubana Plant Med*, 11 (3-4).
- Inouye, S., Uchida, K., y Abre, S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 1284, 210-216.
- Lagarto, A., Couret, M., Guerra, I., y López, R. (2008). Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. *Rev. Cubana Plant Med.*, 13 (3), 1-9.
- Márquez, G. (2012). Actividad Antifúngica de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Melissa officinalis* (toronjil) contra especies del genero *Candida*, aisladas de pacientes con vulvovaginitis (tesis de pregrado). Universidad de Oriente, estado Sucre, Venezuela.
- Pattnaik, S., Subramanyam, VR., y Kole, C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, 86, 237-246.
- Quintana, K. (2012). Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de achillea (*Achillea millefolium* L) y guaviduca (*Piper carpunya* Ruiz & Pav.) en ratas (*Rattus norvegicus*) con lesiones gástricas inducidas (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Ramos, A. (2011). Evaluación de actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosolubles de *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* frente a microorganismos patógenos (tesis de pregrado). Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Ríos, N., Medina, G., Jiménez, J., Yañez, C., García, M., Di Bernardo, M., y Guaitia, M. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas venezolanas. *Rev. Perú Biol.*, 16 (1), 097-100.

- Ruiz, J., y Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación*, 12 (1), 41-47.
- Sánchez, C., Bedoya, J., y Acosta, E. (2012). Estudio del Efecto Antimicrobiano del Aceite esencial de *Aloysia triphylla* sobre cepas *S. aureus* y *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Memorias del XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Química. Recuperado de <http://aiquruguay.org/congreso/download/TL18.pdf>.
- Velásquez, L. (2007). Actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifolium* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus fecalis* (tesis de pregrado). Universidad Mayor de san Andrés, La Paz, Bolivia.
- Viveros, J., & Castaño, J. (2006). Evaluación in vitro de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (tesis de pregrado). Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Vivot, E., Sánchez, C., Cacik, F., Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Cienc. docencia tecnol.*, 45, 177-189.

#### **Agradecimientos**

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación.

# Bioactividad de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela

Lino, Guevara<sup>1</sup>; María, Amaro<sup>2</sup>; Milagros, Fariñas<sup>2</sup>; Ricauter, López-Bermúdez<sup>3</sup>; Haydelba, D'Armas<sup>1, 3\*</sup>

## Resumen

Las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali*, fueron recolectadas en Isla Larga, Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela, para su estudio sobre bioactividad. Se procedió a realizar extracciones con acetato de etilo (AcOEt) a cada esponja, y posteriormente un *screening* químico y las pruebas biológicas señaladas a continuación: antibacteriana, antifúngica y letalidad contra nauplios I del crustáceo *Artemia salina*. Para ambas esponjas se detectó la presencia de alcaloides, esteroides insaturados y cumarinas, y además taninos y metilencetonas para *C. varians*. Los bioensayos demostraron que los extractos poseen actividad letal o tóxica muy fuerte contra el crustáceo *A. salina*, con valores de CL<sub>50</sub> inferiores a 103 µg/ml a 24 h de exposición de las larvas. Posterior al fraccionamiento cromatográfico de la fracción soluble en AcOEt de cada esponja, se observó que se magnificó el efecto tóxico de las subfracciones provenientes de *C. varians*, obteniéndose valores de CL<sub>50</sub> por debajo de 4 µg/ml. Los extractos en AcOEt de dichas esponjas no presentaron actividad contra las bacterias y hongos ensayados; al fraccionar *C. varians*, se mantuvo este comportamiento; sin embargo, la subfracción CV1 presentó actividad antibacteriana leve contra *Listeria monocytogenes*. Las subfracciones de *C. kuekenthali* no mostraron actividad antifúngica; sin embargo, esta especie aumentó su actividad antibacteriana actuando contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ephimurium* y *Enterococcus faecalis*. Estos resultados perfilan a dichas esponjas como una fuente promisoría en futuras investigaciones de fármacos con actividad antitumoral, especialmente *C. varians*.

**Palabras Clave:** bioactividad; *Cinachyrella kuekenthali*; *Cliona varians*; poríferos.

## Bioactivity of *Cliona varians* and *Cinachyrella kuekenthali* marine sponges from Isla Larga, Mochima Bay, Sucre state, Venezuela

### Abstract

The marine sponges *Cliona varians* and *Cinachyrella kuekenthali*, were collected in Isla Larga, Mochima Bay, Sucre state, Venezuela, to study their bioactivity. Each sponge was extracted with ethyl acetate (EtOAc) and then a chemical screening and the following biological tests were performed: antibacterial, antifungal and lethality against nauplii I of *Artemia salina* crustacean. The presence of alkaloids, unsaturated sterols and coumarins was detected for both sponges, and also tannins and metilencetonas for *C. varians*. Bioassays showed that extracts have very strong lethal or toxic activity against *A. salina* nauplii, with LC<sub>50</sub> values less than 103 µg/ml at 24 h of larvae exposure. After chromatographic fractionation of the EtOAc soluble fraction from each sponge, the toxic effect of the *C. varians* subfractions was magnified, obtaining LC<sub>50</sub> values below to 4 µg/ml. EtOAc extracts of these sponges showed no activity against fungi and bacteria used in this study; this behavior was maintained when fractioning *C. varians*; however, CV1 subfraction showed mild antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*. The *C. kuekenthali* subfractions did not show antifungal activity, but showed antibacterial effect against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ephimurium* and *Enterococcus faecalis*. These results suggest these sponges as a promising source for future investigations of drugs with antitumoral activity, especially *C. varians*.

**Keywords:** bioactivity; *Cinachyrella kuekenthali*; *Cliona varians*; porifera.

**Recibido:** 25 de agosto de 2015

**Aceptado:** 13 de junio de 2016

<sup>1</sup>Laboratorio de Productos Naturales-Lípidos, Dpto. de Química, Universidad de Oriente, Estado Sucre, Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Bioactivos Marinos, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Estado Sucre, Venezuela.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Provincia del Guayas, Ecuador. hdamasr@unemi.edu.ec; htrinidad86@hotmail.com

\*Autor para la correspondencia

## I. INTRODUCCIÓN

El estudio químico sistemático de la diversidad marina es muy reciente, si se compara con los estudios realizados a la flora y microorganismos terrestres, los cuales han constituido la base del desarrollo inicial de los fármacos. La flora tropical ha sido fuente de medicinas durante milenios para los pueblos asentados en esos lugares y más de un centenar de productos farmacéuticos, actualmente en uso, se han obtenido de plantas, la mayoría previamente utilizadas en la medicina popular.

Dentro del espectro de especies marinas evaluadas como fuente renovable de productos con valor agregado, las esponjas constituyen el mayor reservorio de compuestos bioactivos promisorios. A partir de este grupo se han aislado más de 2000 compuestos con gran variedad de estructuras y con diversas actividades biológicas. Entre estas últimas se destacan antivirales, antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias, hemaglutinantes, hemolizantes, antimicóticas, antiinflamatorias, analgésicas y particularmente antitumorales (Mayer *et al.*, 2009).

Los poríferos son los organismos pluricelulares vivientes más antiguos, considerados animales primitivos, obteniendo su alimento a partir de la filtración (Hernández y Hernández, 2005; Montes y Lener, 2003). Las esponjas se encuentran protegidas por un sistema inmune altamente complejo, han existido durante millones de años; tiempo en el cual, las bacterias asociadas a las esponjas, adquirieron en común un metabolismo complejo (Kijjoo *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

Existen tres Clases de esponjas: las calcáreas (Clase Calcarea) tienen un esqueleto de carbonato de calcio, las vítreas (Clase Hexactinellida) tienen un esqueleto de sílice y las demosponjas (Clase Demospongiae), que son las más numerosas, presentan un esqueleto de sílice complementado con un entramado de fibras orgánicas llamado "espongina". Las especies estudiadas (*Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali*) pertenecen a la Clase Demospongiae (Hooper, 2002).

El grupo de esponjas *Cliona varians* (Duchassaing & Michelotti, 1864), taxonómicamente, se ubican dentro del Orden Hadromerida (Topsent, 1894), Familia Spirastrellidae (Ridley & Dendy, 1886). *C. varians* se caracteriza por su aspecto tumoriforme

irregular, de tamaño variable. Su color es marrón-verdoso (Lanza, 2012). Del género se reportó un ensayo de campo evidenciando que la fracción lipídica del extracto de *Cliona delitrix*, presentó actividad "antifouling" (Castellanos *et al.*, 2010). Además, se ha reportado aislamiento de lectinas CLv con una considerable actividad preinflamatoria usando el modelo in vivo de migración de leucocitos, para el estudio inflamatorio de peritonitis en ratones (Moura, 2006).

La especie *Cinachyrella kuekenthali* (Uliczka, 1929) pertenece al orden Spirophorida Lévi, 1993, familia Tetillidae Sollas, 1886. Presenta forma esférica, con un diámetro aproximado de 2 a 10 cm, es de color amarillo oscuro en el exterior y amarillo claro en el interior y presenta espículas como defensa externa (Amaro, 2003; Lanza, 2012). De la esponja *Cinachyrella* sp., recolectada en Okinawan, Japón, se aisló el alcaloide cinachyramino, presentando actividad citotóxica contra células de HeLa S3 con un CL<sub>50</sub> de 6,8 µg/ml. El compuesto activo aislado más relevante del género *Cinachyrella* hasta los momentos ha sido el cinachyrolido A, un macrólido altamente citotóxico contra células de leucemia murina L1210 con una CL<sub>50</sub> <0,6 µg/ml (Shimogawa *et al.*, 2006).

La extracción orgánica de los metabolitos secundarios de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* (Porifera: Demospongiae) recolectadas en la bahía de Mochima (Venezuela), y el estudio de la actividad biológica (toxicidad, antibacteriana y antifúngica) de las mismas, constituye el objetivo de esta investigación, por ser dos especies muy abundantes en la Bahía de Mochima. Los resultados obtenidos constituirán un aporte al conocimiento de la bioactividad de estos organismos marinos que habitan en las costas venezolanas.

## II. DESARROLLO

### 1. Materiales y métodos

#### Recolección de muestras

Se realizó la recolecta de los ejemplares de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* en Isla larga, Bahía de Mochima (10°21'05" Lat. N y 64°21'05" Long. W), ubicada en la costa norte de Venezuela, a 30 kilómetros de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Las muestras

fueron transportadas hasta el laboratorio de Bioactivos Marinos del Instituto Oceanográfico de Venezuela en la Universidad de Oriente, donde fueron identificadas hasta la categoría de especie de acuerdo a Amaro (2003).

#### **Obtención de los extractos de las esponjas**

Los ejemplares de cada una de las esponjas se cortaron en trozos más pequeños y se limpiaron de cualquier fauna epibiótica y endobiótica adherida fuera y dentro de la esponja. Estos trozos se dejaron suspendidos en agua de mar bifiltrada (200 micras), se escurrieron y seguidamente se pesaron. Posteriormente, se colocaron en metanol de 99,8% de pureza durante 48 horas, se filtró y el residuo se extrajo nuevamente. Los filtrados fueron evaporados y concentrados a presión reducida, para obtener el extracto metanol/agua. Seguidamente, este extracto se particionó con agua destilada y se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se separó y fue secada con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose la fracción o extracto soluble. Se pesó y almacenó bajo refrigeración para análisis posteriores.

#### **Análisis Fitoquímico**

Para detectar las familias de compuestos presentes en los extractos de las esponjas se llevaron a cabo pruebas químicas específicas, las cuales permitieron apreciar la posible presencia o ausencia de cumarinas y fenilpropanoides (Murillo y Méndez, 2007), alcaloides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, taninos y polifenoles, antraquinonas y metilencetonas siguiendo la metodología de Marcano y Hasegawa (2002).

#### **Actividad antibacteriana**

Se empleó la técnica de difusión en agar, empapando discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm con 10 µl de una solución (preparada con 40 mg del extracto a probar en 1 ml de un solvente) y se colocaron en una placa Müller-Hinton, previamente inoculada con cepas bacterianas certificadas; Grampositivas: *Enterococcus faecalis* (CVCM 924), *Bacillus cereus* (CVCM 461), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Staphylococcus aureus* (CVCM 48), cepas bacterianas Gramnegativas:

*Escherichia coli* (CVCM 39), *Salmonella ephimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (CVCM 497) y una cepa silvestre de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente, se pre incubaron a 5°C durante 12 h, y luego a 37°C por 24 h. Las propiedades antimicrobianas se evaluaron por la formación del halo de inhibición alrededor del disco, el cual se midió utilizando un vernier (Bauer et al., 1966). Para la interpretación de los resultados se utilizó la metodología de cruces, donde se establece las categorías interpretativas para los diámetros de la zona de inhibición (Monks et al., 2002).

#### **Actividad antifúngica**

Se incubaron cepas de hongos en tubos a temperatura ambiente por una semana. Se le agregaron aproximadamente 10 ml de solución salina al 0,9 % a cada tubo para remover las esporas y se filtró sobre gasas estériles, para obtener la solución esporangial. Utilizando hisopos estériles, se colocó la solución obtenida sobre las capsulas de Petri, previamente preparadas con PDA (Agar Papa dextrosa). Seguidamente, se realizó la técnica del antibiograma, colocando los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados con aproximadamente 10 µl de la muestra a 40µg/ml y se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente. La actividad fue detectada al medir el diámetro (mm) del halo de inhibición observado alrededor del disco (Madubunyi, 1995). Los extractos solubles en acetato de etilo de cada esponja, así como algunas subfracciones obtenidas de la cromatografía de la fracción soluble en AcOEt de *C. kuekenthali*, se ensayaron frente a cepas de hongos de *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium crustosum* y *Curvularia sp.*

#### **Actividad tóxica contra Artemia salina**

Se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto, en una mezcla H<sub>2</sub>O/DMSO según la solubilidad de éste y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000 - 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada, en viales que contenían 10 nauplios de *A. salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 y 48 horas de

haber montado dicho ensayo. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado para tal fin, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 % (Stephan, 1977; Meyer *et al.*, 1982).

**Cromatografía de columna (CC) y capa fina (CCF)**

La separación de los componentes o metabolitos se realizó en una columna cromatográfica de dimensiones acorde con la masa del extracto, la cual se empaquetó con sílica gel 35-70 mesh a una proporción 1:30 (g extracto: g sílica). La fase móvil constó de diversos solventes o mezclas de solventes de polaridad creciente. La cromatografía de capa fina (CCF) se empleó con fines cualitativos, para la combinación de los eluatos provenientes de la cromatografía en columna (CC). Para ello se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm<sup>2</sup>) recubiertas con sílica gel 60 con un espesor de 0,5 mm como fase estacionaria y como fase móvil el solvente o mezcla

de solventes, con el cual se eluyeron las subfracciones al momento de fluir la columna cromatográfica del extracto. Se tomaron los R<sub>f</sub> de los eluatos utilizando como agentes reveladores una solución de molibdato de amonio al 10% y luz ultravioleta, y las que tenían comportamiento similar se combinaron en una sola subfracción.

**2. Resultados y discusión**

**Metabolitos secundarios**

Se realizaron las pruebas químicas para determinar la posible presencia de familias de metabolitos secundarios en el extracto soluble en acetato de etilo. Como se puede apreciar en la Tabla 1, la esponja marina *C. varians* dió resultados positivos para alcaloides, taninos, metilencetonas, esteroleos insaturados y cumarinas, representando así el 41,66% de las familias químicas ensayadas. Por su parte, *C. kuekenthali* mostró resultados positivos para alcaloides, esteroleos insaturados y cumarinas, obteniéndose así una menor cantidad de familias químicas que la especie anterior, lo que está representado por el 20% de los metabolitos ensayados.

**Tabla 1. Análisis químico preliminar de las fracciones solubles en acetato de etilo de las especies estudiadas.**

Familia de metabolitos	Alcaloides	Taninos	Metilencetonas	Esteroleos insaturados	Triterpenos pentacíclicos	Antraquinonas	Polifenoles	Saponinas	Glicósidos cianógenos	Glicósidos cardiotónicos	Fenilpropanoides	Cumarinas	%MPE
<i>C. varians</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	41,66
<i>C. kuekenthali</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	25
%MPF	100	50	50	100	100	0	0	0	0	0	0	100	

(+): Detectado; (-): No detectado; %MPF: porcentaje de fracciones con metabolitos pertenecientes a la misma familia química; %MPE: porcentaje de metabolitos presentes para cada extracto.

Al comparar estos resultados con los reportados por Cedeño (2010) que trabajo con esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima, se evidenció claramente que todas las esponjas biosintetizan prácticamente las mismas familias de metabolitos secundarios, posiblemente se debió a que estas esponjas están expuestas a condiciones ambientales similares (corrientes marinas, fuentes de alimentos, depredadores, entre otros) y poseen oportunidades semejantes para

subsistir en este ecosistema.

Se detectaron alcaloides en ambas especies, lo cual concuerda con los trabajos reportados anteriormente en la literatura, en los que se ha aislado aaptaminas en el género *Aaptos* (Dyshlovoy *et al.*, 2014), una variedad de alcaloides tipo bromotirosina en esponjas del género *Aplysina*, cinachyramino en el género *Cinachyrella*, halitoxina en *A. viridis*, reportándose por primera vez la presencia general de alcaloides en esponjas

del género *Cliona* (Cedeño, 2015). La abundancia de alcaloides en esponjas marinas, puede deberse a las altas concentraciones de nitritos y nitratos disueltos en los océanos (Cedeño, 2010).

Los esteroides y triterpenos mostraron una abundancia importante en las esponjas, lo cual está en concordancia con muchos estudios donde han sido reportados; coincidiendo que éstos se encuentran relacionados con la formación de la membrana plasmática de las células de las esponjas, siendo constituida por lípidos, donde los compuestos de origen terpenoidal tienen una significativa participación (Duque *et al.*, 1983).

Las cumarinas son compuestos derivados de benzo- $\alpha$ -pirona, tienen propiedades antiinflamatoria, antitrombóticas y vasodilatadora. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Madubunyi, 1995). Ambas esponjas mostraron resultados positivos para esta familia química, debido a que la presencia de este tipo de metabolito se comprobó mediante observación de una fluorescencia amarilla bajo la luz ultravioleta en el papel de filtro, lo que indicó efectivamente la presencia de estos metabolitos en ambos extractos analizados.

Galindo (2014) ha reportado la producción de metabolitos con actividad antiparasitaria procedentes de actinomicetos asociados a esponjas y la caracterización química preliminar del extracto confirmó la presencia de cumarinas.

### Actividad antibacteriana

Los extractos crudos solubles en acetato de etilo fueron probados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, mostrando inactividad contra estas cepas bacterianas. Sin embargo, esto no implica que frente a otros microorganismos no pueda presentar cierta actividad inhibitoria (Mora *et al.*, 2008).

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos antimicrobianos aplicados a las diferentes subfracciones de *C. varians*, observándose que los extractos no tuvieron actividad contra las bacterias empleadas, y que solo la fracción CV1 presentó efecto antibacteriano leve (10 mm) contra *Listeria monocytogenes*. Estos resultados indican parcialmente que esta esponja, proveniente de la localidad de estudio, no parece tener una aplicación en el campo de los fitofármacos antibacterianos.

**Tabla 2. Actividad antibacteriana mostrada por las subfracciones de *Cliona varians* frente a las cepas ensayadas.**

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Paeruginosa</i>	<i>S. ephimurium</i>	<i>E. fecalis</i>	%EAM
CV1	-	-	-	+	-	-	-	-	12,5
CV2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV4	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV6	-	-	-	-	-	-	-	-	0
%MSE	0	0	0	16,6	0	0	0	0	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hubo actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml y discos de 5 mm de diámetro.

A pesar de que la actividad antibacteriana en este bioensayo fue prácticamente nula para *C. varians*, hay estudios realizados en las costas colombianas, en los que se observó que dicha esponja tuvo actividad inhibitoria frente a las bacterias *B. subtili* y *S. aureus*. Esto hace pensar que ambos ejemplares pueden poseer metabolitos secundarios de familias químicas diferentes, debido a que las condiciones de cada ambiente donde fueron recolectadas eran distintas (Santafe, 2005).

La biosíntesis de compuestos orgánicos en cada individuo, dependerá del medio donde este se encuentre, debido a ésto se observan diferencias entre estudios, ya que las esponjas fueron recolectadas en ecosistemas diferentes, ocasionando así que cada individuo posea necesidades particulares y distintas con respecto al otro. Para organismos sésiles como las esponjas, la supervivencia en un ambiente está asociada a la producción de dichos metabolitos (Águila-Ramírez *et al.*, 2011). Es probable es que las esponjas que lograron inhibir el crecimiento de estas bacterias, se encuentren

en ecosistemas muchos más hostiles y competitivos por espacio y alimento, lo que conlleva a la producción de estos compuestos químicos con el fin de asegurar su permanencia en este medio ambiente.

En la Tabla 3 se muestran las subfracciones provenientes de *C. kuekenthali*, a las cuales se le realizó dicho bioensayo, arrojando resultados alentadores con respecto a la actividad inhibitoria que tuvieron estas subfracciones contra cada uno de los microorganismos evaluados. Dicha actividad aumentó significativamente luego de la separación de los componentes del extracto (efecto antagónico), ya que inicialmente el extracto o fracción soluble en acetato de etilo no presentó actividad alguna contra las bacterias que fueron ensayadas. Con respecto a estos resultados, se puede inferir que en las fracciones menos polares se encuentran la mayor cantidad de compuestos químicos responsables de la actividad inhibitoria, especialmente la subfracción CK(2) la cual exhibió una actividad fuerte frente a siete de las cepas bacterianas ensayadas.

**Tabla 3. Actividad antibacteriana mostrada por las subfracciones de *Cinachyrella kuekenthali* frente a las cepas ensayadas.**

Bacteria	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterisi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. ephimurium</i>	<i>E. fecalis</i>	%EAM
CK1-1	++	++	+	-	++	-	-	-	50
CK(1)	-	-	+	++	-	+	-	+	50
CK(2)	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	87,5
CK3	++	++	+	-	++	-	-	-	50
CK8	-	-	-	-	-	-	-	-	0
%MAE	40	60	80	40	60	40	20	40	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hubo actividad, %MAE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml y discos de 5 mm de diámetro.

La actividad de las fracciones menos polares fue mediana. Al comparar los %EAM (porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo), se aprecia claramente que la subfracción CK(2) presentó mayor valor en este renglón mostrando un 87,5%, lo que le confiere cierto grado de importancia para investigaciones futuras en el campo de los medicamentos antibacterianos, mientras que las subfracciones CK1-1, CK(1) y CK3 presentaron un valor de 50%, actuando contra la mitad de las bacterias tratadas. La capacidad

de inhibición de las subfracciones de *C. kuekenthali* frente a las cepas ensayadas, posiblemente se deba a la presencia de triterpenos y alcaloides, debido a que éstos son capaces de actuar sobre colonias de bacterias hasta producir el fallecimiento de las mismas (Stout *et al.*, 2012).

El aumento considerable de la actividad antibacteriana observado en *C. kuekenthali*, se debe a que los compuestos químicos presentes en esta esponja actúan eficazmente sobre estos microorganismos al

estar separados en las diferentes fracciones de la misma, presentando así un efecto antagónico. Se puede inferir que los compuestos responsables de esta actividad se encuentran en las fracciones menos polares de la misma, debido a que estas fracciones fueron las más activas biológicamente. La aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a los antibióticos tradicionales, establece un serio problema a escala mundial, lo que ha conducido a la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad antibacteriana. Los resultados demostraron la capacidad de esta esponja, de biosintetizar sustancias bioactivas con efectos antibacterianos.

### Actividad antifúngica

Ambas esponjas no mostraron acción antifúngica en contra de ninguna de las cepas de hongos ensayadas. Es probable que los compuestos que se encuentran presentes en estas esponjas no posean la capacidad de inhibir el crecimiento de estos hongos (Mora *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en esta investigación están en concordancia con los resultados reportados por Mora *et al.* (2008) y los de Santafe (2005) en un estudio de los extractos orgánicos de *C. kuekenthali* recolectada en Santa Marta (Colombia).

El efecto observado puede deberse a la fuerte resistencia de los hongos ensayados a la acción de diferentes agentes antimicóticos, ya que estos pertenecen a la familia de los hongos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*) (Mellado *et al.*, 2002). Sin embargo, el extracto de esta esponja demostró en estudios previos poseer compuestos con propiedades antifúngicas. Tal es el caso de una investigación realizada con el extracto acuoso de *C. kuekenthali*, recolectada en la Isla de Coche (Venezuela), el cual mostró efecto antifúngico contra *Candida albicans* y *Penicillium crustosum*, pudiéndose inferir que posiblemente los extractos acuosos de las esponjas analizadas sean más prometedores para la actividad antimicótica (Hernández, 2004).

### Letalidad

La fracción soluble en acetato de etilo de las esponjas estudiadas evidencia claramente que la especie *C. kuekenthali* presentó menores valores de  $CL_{50}$ , lo que la hace más letal que *C. varians* y revela la presencia de compuestos con actividad citolítica en dicha esponja (Tabla 4). Probablemente, este efecto letal se deba a los alcaloides, triterpenos, esteroides y/o cumarinas

detectados en los ensayos químicos preliminares realizados. La letalidad de la FAE de *C. kuekenthali* recolectada en la Isla de Coche, se reportó en la literatura con un  $CL_{50}$  de 31,74  $\mu\text{g/ml}$ , mostrando que esta esponja es capaz de producir metabolitos con potencial antitumoral (Hernández, 2004).

**Tabla 4. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) contra *A. salina*, de la fracción soluble en acetato de etilo de las esponjas estudiadas.**

Esponjas	$CL_{50}$ (24 h)	$CL_{50}$ (48 h)	Método
<i>Cliona varians</i>	102,35	74,28	Binomial
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	52,37	4,10	Probit

Por otra parte, la esponja *C. varians* presentó menor actividad letal contra el crustáceo ensayado; sin embargo, mostró un  $CL_{50}$  (102,35  $\mu\text{g/ml}$ ; 24 h)  $\ll$  1 000  $\mu\text{g/ml}$ , por lo que se puede inferir que esta especie posee también metabolitos con posible actividad letal, y que las larvas de *A. salina* respondieron al efecto de los metabolitos bioactivos presentes en esta especie.

Al comparar estos resultados con estudios realizados a esponjas de la misma localidad (*A. lacunosa*,  $CL_{50}$  743,45  $\mu\text{g/ml}$ ; *A. fulva*,  $CL_{50}$  287,24  $\mu\text{g/ml}$ ; *A. viridis*,  $CL_{50}$  24,56  $\mu\text{g/ml}$ ; *A. pernucleata*,  $CL_{50}$  1,54  $\mu\text{g/ml}$ ), se aprecia que todos los especímenes estudiados generan de una u otra forma metabolitos secundarios con una considerable actividad tóxica ( $\ll$  1 000  $\mu\text{g/ml}$ ), lo que conlleva a pensar que todas las especies están expuestas al mismo depredador y la única alternativa de subsistir a este elemento perturbador, es la producción de metabolitos secundarios que repelan dicha amenaza (Cedeño, 2015).

Seguidamente se realizó dicho bioensayo a varias de las subfracciones de *C. varians*, para comprobar el efecto que causaba sobre los nauplios de *A. salina*, y la a vez estimar la incidencia de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) en la separación del extracto en sus diferentes subfracciones. De los resultados se puede inferir, que los componentes del extracto actúan de una forma antagónica, ya que el estudio de las subfracciones mostró mayor letalidad que el extracto, en un intervalo de 0,02 a 3,16  $\mu\text{g/ml}$  para CV6 y CV3, respectivamente (Tabla 5). Para la realización de este ensayo, se tomó como punto de referencia aquellas subfracciones que no podían fraccionarse más, debido a la falta de masa de las mismas; entre éstas, se tomaron las que poseían mayor cantidad de masa.

**Tabla 5. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) de algunas subfracciones de la esponja *C. varians* contra el crustáceo *A. salina*.**

Subfracción	CL <sub>50</sub> (24 h)	CL <sub>50</sub> (48 h)	Método
CV1	0,07	0,00	Probit
CV3	3,16	0,03	Binomial
CV6	0,02	0,01	Binomial
CV8	3,08	0,00	Moving Average

Según diversas investigaciones, se reporta que valores de CL<sub>50</sub> menores a 1000  $\mu\text{g/ml}$ , son considerados con actividad letal o tóxica; ya que este bioensayo se utiliza para la pre-evaluación de extractos de origen natural en el descubrimiento de compuestos con propiedades antitumorales. Además, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de larvas de *A. salina* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388), (leucemia in vivo) (Schmitz *et al.*, 1993).

Las cuatro fracciones ensayadas de *C. varians* con el crustáceo *A. salina*, mostraron una muy buena actividad letal ( $\ll 30 \mu\text{g/ml}$ ), por lo que se puede inferir que esta esponja sea una fuente promisoría de compuestos biológicamente activos para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas y otras afecciones que perturban a la población humana. Para poder asegurar esto, se necesitarían estudios más profundos y avanzados que los mostrados en esta investigación, dado que este bioensayo constituye un análisis preliminar para posteriores investigaciones.

A pesar que la letalidad presentada por la fracción soluble en AcOEt de *C. kuekenthalii* fue considerablemente buena (CL<sub>50</sub> 52,37  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 h), la misma aumentó después del fraccionamiento para las fracciones CK4 (CL<sub>50</sub> 15,63  $\mu\text{g/ml}$ ) y CK8 (CL<sub>50</sub> 21,02  $\mu\text{g/ml}$ ) al realizarle el mismo bioensayo a algunas subfracciones provenientes del extracto de esta esponja (Tabla 6). Esto puede ser debido a que los compuestos responsables de dicha actividad tóxica o letal actúan mejor separados que juntos (actividad antagónica). Sin embargo, para las fracciones CK1, CK1-1, CK3 y CK9, disminuyó la CL<sub>50</sub> después de la separación cromatográfica, a pesar de que exhibieron CL<sub>50</sub>  $\ll 1000 \mu\text{g/ml}$ , observándose un sinergismo entre los metabolitos presentes en estas fracciones.

También se puede notar, que a medida que aumenta la polaridad de la subfracción estudiada aumento la letalidad del mismo, lo cual indica una fuerte relación en esta esponja entre letalidad y polaridad, lo que puede

llevar a inferir que los compuestos con mayor toxicidad se encuentran en las fracciones más polares.

**Tabla 6. Actividad letal ( $\mu\text{g/ml}$ ) de algunas subfracciones de *Cinachyrella kuekenthalii* contra *Artemia salina***

Subfracción	CL <sub>50</sub> (24 h) $\mu\text{g/ml}$	CL <sub>50</sub> (48 h) $\mu\text{g/ml}$	Método
CK1	205,36	168,40	Binomial
CK1-1	726,15	518,18	Binomial
CK2	306,54	139,34	Binomial
CK3	>1000	>1000	Probit
CK4	15,63	0,08	Logit
CK8	21,02	1,33	Logit
CK9	150,65	100,00	Probit

### III. CONCLUSIONES

La presencia de alcaloides, esteroides insaturados, triterpenos pentacíclicos y cumarinas, la actividad antibacteriana contra las bacterias *E. faecalis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. ephimurium*, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes.*, y la alta toxicidad que presentan las esponjas estudiadas pueden obedecer a mecanismos de defensa que utilizan estos organismos en contra de depredadores, asegurando así la conservación de su especie.

Los valores de CL<sub>50</sub> observados para ambas especies de esponjas, indican la presencia de compuestos bioactivos en las fracciones y subfracciones, con posibles propiedades antitumorales y/o pesticidas, que le confieren un carácter letal o citotóxico sobre este crustáceo.

Estos resultados permiten perfilar a las *C. varians* y *C. kuekenthalii*, como una fuente promisoría de compuestos biológicamente activos que pueden ser utilizados con fines terapéuticos, específicamente *C. kuekenthalii* para obtener compuestos antibacterianos y ambas esponjas como fuente de compuestos antitumorales.

### IV. REFERENCIAS

- Amaro, M. (2003). Demospongiae (Porifera) de la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela (tesis de maestría). Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Bauer, A., Kirby, A., Sherris, J., y Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493-496.

- Castellanos, H., Mayorga, H., y Duque, C. (2010). Estudio de la composición química y actividad antifouling del extracto de la esponja marina *Cliona delitrix*. *Actualidades Biológicas*, 40, 30-40.
- Cedeño, R. (2010). Estudio químico y bioactividad de las esponjas marinas (Porifera: Demospongiae) más comunes de Isla Larga y Mangle Quemao, Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela (tesis de pregrado). Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Cedeño, R., D' Armas, H., Amaro, M., y Martínez, R. (2015). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de seis esponjas marinas de la Bahía de Mochima, Venezuela. *Cuadernos de Investigación UND*, 7 (2), 225-232.
- Águila-Ramírez, R. N., Hernández-Guerrero, C. J., y González-Acosta, B. (2011) Potencial Biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Océánides*, 26 (2), 31-46.
- Duque, C., Martínez, A., y Pe Auala, G. (1983). Esteroles en esponjas marinas. *Revista Colombiana de Química*, 12 (1), 51-68.
- Dyshlovoy, S., Fedorov, S., Shubina, L., Kuzmich, A., Bokemeyer, C., Keller-von Amsberg, G., y Honecker, F. (2014). Aaptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell Lines and Modulate AP-1-, NF- $\kappa$ B-, and p53-Dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 1-7.
- Galindo, N. (2014). Potencial antiparasitario de los metabolitos extracelulares de actinomicetos aislados de esponjas marinas frente a *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* (tesis de pregrado). Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Hernández, Y. (2004). Estudio químico y actividad biológica de la esponja *Cinachyrella kuekenthali* (tesis de pregrado). Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Hernández, M., y Hernández, M. (2005). Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. *Saber*, 17 (5), 3-9.
- Hooper, J. (2002). Guide to sponge collection and identification. Australia: Queensland Museum. 123 pp.
- Kijjoa, A., Wattanadilok, R., Campos, N., Nascimento, M., Pinto, M., y Herz, W. (2007). Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs*, 6-22.
- Lanza, V. (2012). Actividad biológica y metabolitos secundarios de esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela (tesis doctoral). Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Madubunyi, I. (1995). Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.*, 33 (3), 232-237.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela-Litopar.
- Mayer, A., Rodríguez A., Berlinck, R., y Hamann, M. (2009). Marine pharmacology in 2005–2006: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790 (5), 283-308.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., y Rodríguez-Tudela, J. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 20 (10), 523-30.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nicols, D., y McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45 (1), 31-34.
- Monks, N., Lerner, C., Henriques, A., Farias, F., Schapoval, E., Suyenaga, E., Da Rocha, A., Schwartsmann, G. y Mothes, B. (2002). Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Eco.*, 281, 1-12.
- Montes, B. y Lener, C. (2003). Esponjas marinas. Segunda edición. USEB. Brasil.
- Mora, J., Newmark, F., Santos, M., y Sánchez, J. (2008). Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias

- antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 21 (3), 174-179.
- Moura, R. (2006). CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, 517-523.
- Murillo, E., y Méndez, J. (2007). Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios. Ibagué, Colombia: Universidad de Tolima.
- Santafe, G., Vargas, Y., Hoyos, L., Torres, O., y Zuluaga, J. (2005). Estudio químico de las fracciones lipídicas de esponjas marinas de Córdoba (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 27, 95-100.
- Shimogawa, H., Kuribayashi, S., Teruya, T., Suenaga, K., y Kigoshi, H. (2006). Cinachyramide, the novel alkaloid possessing a hydrazone and two aminals from *Cinachyrella* sp. *Tetrahedron Letters*, 47: 1409-1411.
- Schmitz, F., Bowden, A., y Toth, S. (1993). Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. *Marine Biotechnology*, 1: 138-197.
- Stephan, C. (1977). Methods for calculating LC50. En: *American Society for Testing and Material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation*. F.L. Mayer y J. Hamelink (Eds.), Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Stout, P., Yu, L., y Molinsk, T. (2012). Antifungal Diterpene Alkaloids from the Caribbean Sponge *Agelas citrina*: Unified Configurational Assignments of Agelasidines and Agelasines. *European J. Org. Chem.*, 2012 (27), 5131-5513.
- Takahashi, Y., Kubota, T., Fromont, J., y Kobayashi, J. (2007). Metachromins L-Q, new sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from sponge *Spongia* sp. *Tetrahedron*, 63, 8770-8773.

# Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales

Ana, Echavarría<sup>1-2\*</sup>; Haydelba, D´Armas<sup>1-2</sup>; Nubia-Lisbeth, Matute-L.<sup>2</sup>;  
Carmita, Jaramillo<sup>2</sup>; Luisa, Rojas-de-Astudillo<sup>2</sup>; Ricardo, Benitez<sup>3</sup>

## Resumen

El presente estudio evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de dieciséis plantas medicinales: escoba amarga (*Parthenium hysterophons*), ajeno (*Artemisia absinthium*), guarumo (*Cecropia obtusifolia*), chaya (*Cnidioscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linaza (*Linum usitatissimum*), hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia cumanensis*), diente de león (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) y moringa (*Moringa oleifera*). Para ello, se usó el método DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil); además, se realizaron ensayos de reconocimiento de metabolitos secundarios a fin de obtener los primeros indicios de compuestos de interés fitoquímico. La actividad captadora de radicales libres de los extractos se expresó como valor de IC<sub>50</sub> (µg/mL) (cantidad necesaria para inhibir la formación de radicales DPPH en un 50%). El valor bajo de IC<sub>50</sub> refleja mejor acción eliminadora de radicales libres. Aunque la mayoría de las muestras evaluadas mostraron buena capacidad antioxidante con este método (DPPH), los ensayos de los extractos hidro-alcohólicos demuestran que la alcachofa (IC<sub>50</sub> 9,89 µg/mL), moringa (IC<sub>50</sub> 11,4 µg/mL) y borraja (IC<sub>50</sub> 14,0 µg/mL) presentaron mayor capacidad antioxidante. Mediante las pruebas químicas de caracterización, se detectó la presencia de flavonoides, taninos, triterpenos, alcaloides y saponinas en la mayoría de las especies analizadas (aproximadamente 56-69%); tan sólo un 20% de las mismas mostró la presencia de polifenoles, glucósidos cianogénicos, lactonas, cumarinas, esteroides y antraquinonas. Según los resultados, se podría considerar a estas plantas como fuentes prometedoras de metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

**Palabras Clave:** capacidad antioxidante; metabolitos secundarios; plantas medicinales.

## Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts

### Abstract

This study evaluated the antioxidant capacity of sixteen medicinal plants: Escoba amarga (*Parthenium hysterophons*), ajeno (*Artemisia absinthium*), guarumo (*Cecropia obtusifolia*), chaya (*Cnidioscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linaza (*Linum usitatissimum*), hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia cumanensis*), diente de León (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) and moringa (*Moringa oleifera*). For this, the DPPH (radical 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil) method was used; furthermore, recognition assays of secondary metabolites were performed, in order to obtain the first signs of phytochemical compounds of interest. The free radical scavenging activity of the extracts was expressed as IC<sub>50</sub> value (g/mL) (necessary amount to inhibit the formation of 50% of DPPH radical). The low value of IC<sub>50</sub> reflects better free radical scavenging action. Although most of the samples tested showed good antioxidant capacity with this method (DPPH), tests of hydro-alcoholic extracts show that alcachofa (IC<sub>50</sub> 9.89 mg/mL), moringa (IC<sub>50</sub> 11.4 mg/mL) and borraja (IC<sub>50</sub> 14.0 mg/mL) were those with higher antioxidant capacity. Through chemical characterization tests, the presence of flavonoids, tannins, triterpenes, alkaloids and saponins were detected in most of the analyzed species (approximately 56-69%); only 20% of them showed the presence of polyphenols, cyanogenic glycosides, lactones, coumarins, anthraquinones and sterols. According to the results obtained, these plants might be considered as promising sources of secondary metabolites with antioxidant activity.

**Keywords:** antioxidant capacity; medicinal plants; secondary metabolites.

**Recibido:** 26 de julio de 2016

**Aceptado:** 13 agosto de 2016

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Machala, Provincia del Oro, Ecuador,

<sup>2</sup>Universidad Estatal de Milagro, Provincia de Guayas, Ecuador,

<sup>3</sup>Universidad del Cauca-Popayán, Colombia

\*echavarría@tecal.udl.cat, anapaola8@yahoo.com

## I. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios de plantas medicinales se han realizado desde hace décadas, a causa del uso potencial como fuente de sustancias con propiedades biológicas. Uno de los componentes principales de las plantas son los antioxidantes, sustancias existentes en determinados alimentos que actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y otras enfermedades (Gutiérrez Zavala, et al., 2007). Asimismo, el estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, tales como: arterioesclerosis, artritis, demencia, cáncer, entre otras (Castañeda et al., 2008); es por ello que el uso de antioxidantes es estudiado de forma intensiva; teniendo en cuenta las características que presentan los alimentos enriquecidos en vitaminas antioxidantes, algunas plantas medicinales podrían incluirse dentro del grupo de alimentos funcionales o nutracéuticos.

Los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía, liberan radicales libres, por lo cual deben existir mecanismos de defensa contra estas especies químicas y así asegurar la vida. La formación de radicales libres mediante procesos naturales conduce a la oxidación de biomoléculas, dando lugar a diversas enfermedades. Los organismos fotosintéticos como las plantas, están expuestos a ambientes muy oxidativos, por lo que poseen un sistema antioxidante muy eficaz (Finkel y Holbrook, 2000).

Las plantas *Artemisia absinthium*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Taraxacum officinale*, *Parthenium hysterophorus* y *Cynara scolymus* pertenecen a la familia *Asteraceae*; *A. absinthium* L, es digestivo, estimulante del apetito y la secreción de los jugos gástricos y bilis (Abad M, 2011); *A. Artemisiifolia*, se utiliza para desinflamar, previene el paludismo, es antihelmíntico, antiespasmódico y regula la menstruación (Blair y Madrigal, 2005). *T. officinale* es diurético, evita los cálculos renales, escorbuto, laxante, limpia el hígado y es estimulante del apetito (Macha, 2014); *P. hysterophorus*, se utiliza para los padecimientos digestivos, dolor de estómago, fiebre intestinal, antihelmíntico, reumatismo, antitusígeno y paludismo (Águila et al., 2000); *C. scolymus*, en el tratamiento de la anemia, diabetes, fiebre, gota, reumatismo y piedras en vías urinarias (Esteva-Espinosa, 2003).

La especie vegetal *C. citratus* (familia *Poaceae*) tiene un efecto tónico, estomacal, digestiva, antiespasmódica

y carminativa (Madaleno y Montero, 2012); *M. officinalis* (familia *Lamiaceae*), usos medicinales desmayos, decaimiento de ánimo, vértigos, migraña, cólicos nerviosos, espasmos, calambres, dolores neurálgicos (Acevedo, 2013). *P. carpunya* (familia *Piperaceae*), se utiliza para aliviar cólicos menstruales, estomacales, úlceras gástricas, inflamaciones y controlar la diarrea (Cárdenas-Tello, 2016); *M. oleífera* (familia *Moringaceae*), se usa para controlar azúcar en sangre, evitar la formación de tumores, combatir infecciones bacterianas, controlar los niveles de colesterol, limpiar el hígado y riñones, antiinflamatorio, energizante, ayuda a la circulación y la digestión (Olson y Fahey, 2011).

La especie *B. officinalis* L (familia *Boraginaceae*), se emplea en la medicina tradicional se usa como depurativo, emoliente, béquico, diurético, laxante, expectorante, antipirético, diaforético, galactógeno, antiinflamatorio de las vías urinarias, afecciones de los bronquios y expectorante (Fonnegra y Jiménez, 2007); *Ochroma sp* (familia *Malvaceae*), se utiliza para aliviar dolores de cabeza, inflamación de la garganta, y tratar el resfriado. *C. obtusifolia* (familia *Urticaceae*), se utiliza para la arterioesclerosis, asma, fracturas óseas, hematomas, diarrea, fiebre, infecciones genitales, herpes, trastornos renales, trastornos hepáticos, úlceras bucales y linguales, obesidad, enfermedad de Parkinson, inflamación reumática, enfermedades de la piel, verrugas y heridas, disminuir la presión arterial, efectos diuréticos y reducción de los niveles de azúcar en sangre (Pérez-Guerrero et al., 2001).

Tradicionalmente, *C. nidoscolus chayamansa* (familia *Euphorbiaceae*) se emplea para enfermedades del riñón como piedras e inflamación, como diurético, contra la obesidad, diabetes, reumatismo, hemorroides, acné, estreñimiento, colitis, gastritis, problemas circulatorios, osteoporosis, colesterol alto, presión alta de la sangre y para estimular la lactancia (Valenzuela Soto, 2015); *B. spectabilis* (familia *Nyctaginaceae*), es usada tradicionalmente como antibacteriano, antidiarreico, reducir la acidez de estómago, como infusión para frenar la tos y aliviar afecciones pulmonares. *L. usitatissimum* (familia *Linaceae*), se usa para combatir el estreñimiento, inflamaciones intestinales, catarro, colesterol y triglicéridos, arteriosclerosis, maduración de abscesos y forúnculos, combatir la ictericia; *P. officinalis* (familia *Urticaceae*), se utiliza para evitar la formación de arenilla en los riñones, para tratar inflamaciones renales o de la vejiga (cistitis), evitar la retención de líquidos,

ayuda en las enfermedades reumáticas, tratamiento de mala circulación e hipertensión arterial y problemas de estómago (Hilgert *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante de los extractos de dieciséis plantas de uso ancestral y medicinal cultivadas en Ecuador, a través de pruebas de caracterización química y del ensayo de la decoloración del radical DPPH, respectivamente.

## II. DESARROLLO

### 1. Materiales y métodos

**Obtención de los extractos:** los ejemplares de las especies vegetales escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*), ajeno (*Artemisia absinthium*), guarumo (*Cecropia obtusifolia*), chaya (*Cnidioscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linaza (*Linum usitatissimum*), hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia cumanensis*), diente de León (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) y moringa (*Moringa oleifera*) en estado óptimo de desarrollo vegetativo y fitosanitario se recolectaron en ecosistemas naturales de las provincias El Oro y Azuay (Ecuador) en agosto de 2014; siendo procesados en el laboratorio, sin almacenamiento previo.

**Obtención del extracto alcohólico:** las hojas de las plantas se lavaron con agua destilada y fueron colocadas en un secador artesanal y, posteriormente, llevadas a la estufa a 37 ° C (MEMMERT SNB 400 con flujo de aire). Para la obtención del extracto alcohólico, 20 g de cada materia vegetal molida (molino Lab. Mill serial No. 56969, Type AR 400 Erweka®, Germany) fueron macerados con 100 ml con etanol al 70%, a temperatura ambiente, durante 48 horas, luego filtradas al vacío y pulverizadas.

**Tamizaje fitoquímico:** se evaluó los principales componentes químicos presentes en las especies estudiadas, mediante pruebas químicas de caracterización, tales como: Ensayos de saponinas, taninos, triterpenoides y/o esteroides, quinonas (una fracción y ensayo directo), antocianinas, reconocimiento de cumarinas, siguiendo la metodología sugerida por Martínez (1998), con algunas modificaciones.

Para el reconocimiento de polifenoles (flavonoides), leucoantocianidinas y cardiotónicos, se utilizó 10 g de

muestra fresca finamente triturada, añadiendo un volumen de 50 mL de alcohol etílico. Posteriormente, se calentó al baño María con agitación durante unos 5 min y finalmente se filtró. Cuando la muestra presentó clorofilas, se le añadió al filtrado un volumen igual de solución de acetato de plomo al 4% que contenía ácido acético al 0,5 %, se agitó y se dejó reposar por 15 minutos, para proceder a filtrar la solución; con el filtrado obtenido se realizaron ensayos de reconocimiento de flavonoides, leucoantocianidinas y glucósidos cianogénicos, con el reactivo de Kedde. (Murillo y Méndez, 2007)

El reconocimiento de alcaloides se realizó utilizando los reactivos de Dragendorff, Mayer, Valser y reineckato de amonio (Maldoni, 1991). Previo al ensayo con la muestra biológica, se hizo un ensayo con un estándar de quinina en solución ácida.

**Capacidad antioxidante:** la actividad antioxidante de los extractos se evaluó mediante la capacidad captadora del radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (Brand-Williams *et al.*, 1995), utilizando la metodología de Rojano *et al.* (2008). Un volumen de 990 µL de una solución metanólica de DPPH se mezcló con 10 µL de las soluciones hidro-etanólicas (50:50) de cada extracto a varias concentraciones; las mezclas se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 minutos, se leyó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de inhibición y expresados como capacidad antioxidante en µmol de equivalentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico);TE/g Equivalente (AAE) a ácido Ascórbico. Los datos de todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

### 2. Resultados

En la Figura 1 se observa la capacidad antioxidante, medida por el porcentaje de captación de radicales libres, para extractos de las hojas de las plantas estudiadas a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50,75 y 100µg/mL).

Aunque la mayoría de las muestras evaluadas presentaron capacidad antioxidante el método (DPPH), los extractos hidro-alcohólicos demuestran que *C. scolymus* o alcachofa 95,7%, *M. oleifera* o moringa 97,9% y *B. officinalis* o borraja 96,3% fueron los que mostraron mayor capacidad antioxidante; seguidos por *P. carpunya* (guaviduca) 95,8%, *P. hysterophorus* (escoba amarga) 88,4 % y *T. officinale* (diente de león) con 71,2% a 100 ug/mL. De lo anteriormente

referido, se puede observar que algunos de estos extractos superaron al control positivo, ácido ascórbico (vitamina C) que presentó 90,5% a la misma concentración.

De acuerdo con los datos del IC<sub>50</sub> que se observan en la Figura 2, existe una relación inversamente proporcional, a menor valor del IC<sub>50</sub> mayor actividad

anti radical. Obteniendo IC<sub>50</sub> 9,89 µg/mL para la *C. colymus* o alcachofa, IC<sub>50</sub> 11,4 µg/mL para la *M. oleifera* o moringa y IC<sub>50</sub> 14,0 µg/mL *B. officinalis* o borraja, los cuales presentaron mayor capacidad antioxidante; seguidos por *P. carpanya* (guaviduca), *P. hysterophorus* (escoba amarga) y *T. officinale* (diente de león).

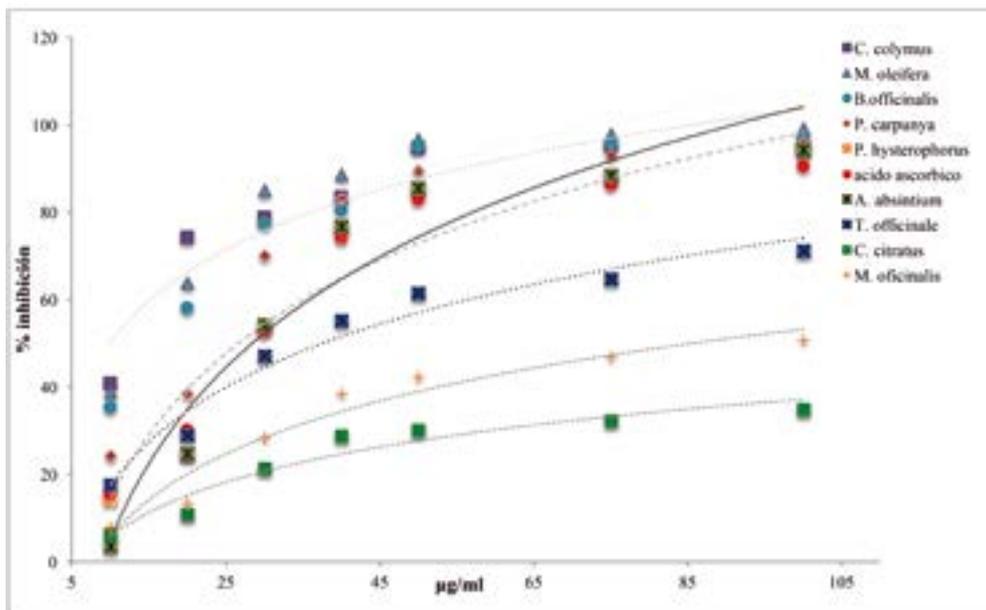


Figura 1. Capacidad antioxidante de las especies vegetales estudiadas (capacidad captadora del radical DPPH).

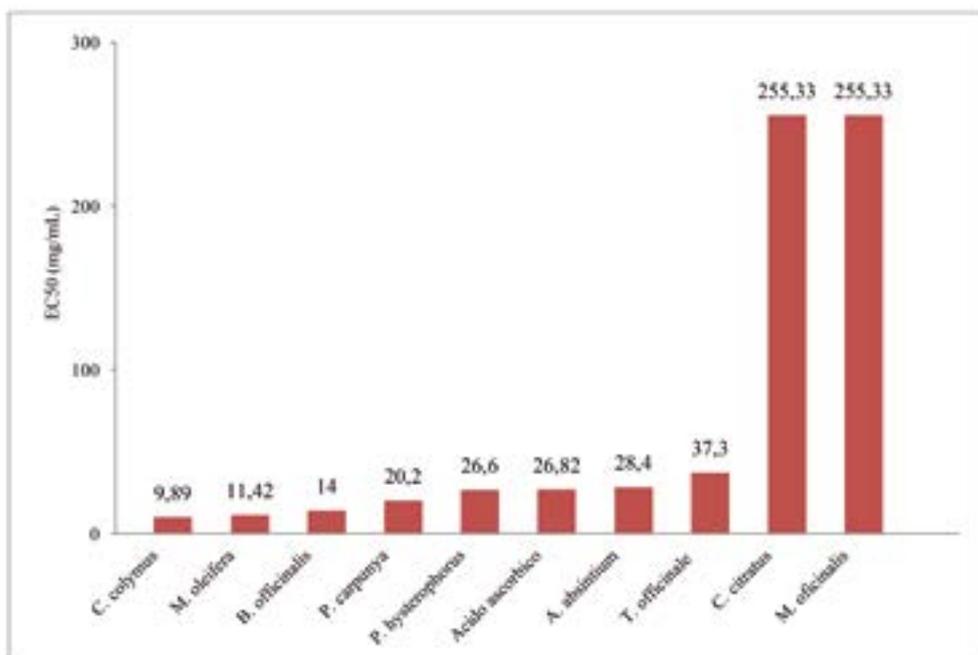


Figura 2. Actividad antioxidante expresada como coeficiente de inhibición IC<sub>50</sub> de las especies vegetales estudiadas.

El análisis fitoquímico reveló la presencia de familias de metabolitos secundarios, en los extractos etanólicos de las especies vegetales estudiadas; así se detectó la presencia de flavonoides, taninos, triterpenos pentacíclicos, alcaloides y saponinas en la mayoría de las especies (Tabla 1). Específicamente, el porcentaje de extractos que mostraron metabolitos secundarios pertenecientes a una misma familia química, fueron de 43,8; 56,3; 62,5 y 68,8% para saponinas, alcaloides, flavonoides-taninos y triterpenos, respectivamente; por lo que se puede observar que son los flavonoides, taninos y triterpenos los compuestos más abundantes dentro del grupo de plantas analizadas. Tan sólo un 25,0 y 31,3% de las mismas mostró la presencia de polifenoles

y glucósidos cianogénicos, respectivamente, y un 12,5% poseen lactonas, cumarinas, esteroides insaturados y antraquinonas.

De igual forma, como puede apreciarse en la Tabla 1, al analizar el porcentaje de metabolitos presentes por cada extracto, se observó que el extracto alcohólico de las hojas de *P. carpunya* mostró la mayor presencia de núcleos secundarios (47,1%), seguido del extracto alcohólico de las hojas de *C. colymus* (41,2%); presentando los extractos de *P. hysterophorus*, *C. obtusifolia*, *B. officinalis*, *B. spectabilis* y *M. oleifera*, un 35,3% de metabolitos y el resto de los extractos poseen una menor cantidad de los mismos.

**Tabla 1. Metabolitos secundarios detectados en los extractos alcohólicos de las plantas medicinales analizadas**

Familia de Compuestos	Muestras (especie vegetal)																%emf
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Flavonoides	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	62,5
Flavonoles	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	12,5
Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	6,25
Polifenoles	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	25,0
Triterpenos	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	68,8
Sesquiterpens	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,25
Alcaloides	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	56,3
Glucósidos cardiotónicos	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,3
Esteroides	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5
Cumarinas	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	12,5
Saponinas	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	43,8
Taninos	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	62,5
Mucilagos	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,25
Ligninas	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,25
Lactonas	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	18,8
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	12,5
%mpe	35,3	17,6	35,3	5,9	35,3	11,8	11,8	17,6	17,6	35,3	41,2	47,1	29,4	29,4	17,6	35,3	

(+): presencia; (-): ausencia; %mpe: porcentaje de metabolitos presentes por cada extracto; %emf: porcentajes de extractos con metabolitos pertenecientes a la misma familia química. 1. escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*), 2. ajeno (*Artemisia absintium*), 3. guarumo (*Cecropia obtusifolia*), 4. chaya (*Cnidioscolusaconitifolius*), 5. borraja (*Borago officinalis*), 6. balsa (*Chroma pyramidale*), 7. linaza (*Linum usitatissimum*), 8. hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), 9. toronjil (*Melissa officinalis*), 10. buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), 11. alcachofa (*Cynaras colymus*), 12. guaviduca (*Piper carpunya*), 13. altamisa (*Ambrosia cumanensis Kunth*), 14. diente de león (*Taraxacum officinale*), 15. buscapina (*Parietaria officinalis*), 16. moringa (*Moringa oleifera*).

### 3. Discusión

Si bien es cierto que existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo, los métodos in vitro permiten tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas, in vivo. Uno de los métodos más utilizados es DPPH, ya que presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones. El DPPH es

un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, lo que lo hace de gran utilidad en el estudio simultáneo de varias plantas. (Castañeda et al., 2008)

Los resultados obtenidos indican que los extractos de *C. colymus*, *M. oleifera*, *B. officinalis*, *P. carpunya* y *T. officinale* poseen tanto flavonoides como taninos en su

composición química, por lo cual la actividad antioxidante mostrada por estas plantas, pudiera atribuirse a la acción sinérgica de ambos tipos de metabolitos; sin embargo, *P. hysterophorus* también mostró una buena capacidad antioxidante a pesar de la ausencia de taninos, por lo cual ésta podría ser solo atribuida a la presencia de flavonoides en dicha planta. En particular, *M. oleifera*, *B. spectabilis* y *P. carpunya* fueron las únicas especies que exhibieron la presencia de compuestos polifenólicos, además de flavonoides y taninos, posiblemente todos causantes de la actividad observada.

En este sentido y en concordancia con los resultados obtenidos en esta investigación, Jáuregui et al. (2006) indican que la capacidad antioxidante en una especie vegetal no viene dada sólo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada tipo de metabolito presente, también depende del microambiente en el que se encuentre el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios. Como es sabido, los compuestos fenólicos en general, lo cual incluye a polifenoles, taninos, flavonoides, flavonoles, coumarinas, son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. (Cai et al., 2006)

Entre las plantas estudiadas, *Moringa oleifera* presenta mayor capacidad antioxidante y se detectaron compuestos fenólicos en el análisis fitoquímico realizado a esta planta, al igual que los obtenidos por Guzmán-Maldonado et al. (2015). En relación a *Cynaras colymus*, al comparar los resultados obtenidos con los de Cruzado et al. (2013), se concluye que estos extractos tienen un alto porcentaje de capacidad antioxidante y presentan contenido fenólico. Otro de los extractos que mostró mayor actividad antioxidante con un 96,3%, fue el de *Borogo officinalis*. Siendo los compuestos fenólicos el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal (Quinones et al., 2012). Existe una correlación directa entre los valores del % de inhibición y los metabolitos secundarios detectados, lo que explica que los extractos de estas especies vegetales contienen mayor diversidad de compuestos fenólicos.

Estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por el estrés

oxidativo (Prior, 2005). Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a los compuestos fenólicos y a la actividad antioxidante presentes en dichos alimentos vegetales.

Según los resultados obtenidos, se podría considerar a las plantas medicinales analizadas como fuentes promisorias de componentes o principios activos (compuestos fenólicos) con actividad antioxidante que deberían ser aislados e identificados, considerándose además el uso de estas especies vegetales como una base importante, para un alimento funcional y/o nutracéutico promisorio en una alimentación saludable.

### III. CONCLUSIONES

Los diferentes extractos de las plantas estudiadas, presentaron una buena actividad antioxidante, siendo los extractos etanólicos de borraja (*B. officinalis*), alcachofa (*C. scolymus*) y moringa (*M. oleifera*) los que presentaron una mayor capacidad de captación de radicales libres. Es recomendable seguir realizando estudios adicionales por medio de otros métodos y técnicas de aislamiento e identificación estructural de los principios activos presentes en estos extractos estudiados en el presente trabajo, que han presentado una gran capacidad antioxidante.

### Agradecimientos

Agradecemos de manera especial al Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por su patrocinio en este trabajo.

### IV. REFERENCIAS

- Abad M, Bedoya L y Bermejo P (2011). The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*, 17(3) 2542-2566.
- Acevedo D., Navarro M y Montero P. (2013). Composición Química del aceite esencial de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis* L.). *Información Tecnológica*, 24(4), 49-54.
- Águila B., Meneses R., González L., Madrigal E y Fernández D. (2000). Extracto acuoso de escoba amarga. Estudio preliminar de sus propiedades. *Revista Cubana plantas medicinales*, 5, 123-4.
- Blair S y Madrigal B. (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco, Costa Pacífica Colombiana, ed. Universidad de Antioquia. 49p.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E y Berset C. (1995). Use

- of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT. Food Science and Technology* 28: 25- 30.
- Cai Y., Sun M., Xing J., Luo Q., y Corke H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*, 78(25), 2872-2888.
- Cárdenas-Tello, C., Pozo-Rivera, W., Almirall, E. y Roque, A. (2016). Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* y *Piper carpunya*, potenciales fungo controladores. *Qualitas*, 11, 56-83. ISSN: 1390-6569.
- Castañeda B., Ramos E y Ibáñez L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Medical*, 8 (1), 56-72.
- Cruzado, M., Pastor, A., Castro N y Cedrón C. (2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Sociedad Química del Perú*. 79 (1)
- Esteva-espinoza E. (2003). Uso farmacéutico de las hojas de alcachofa. Formación universitaria del farmacéutico: prácticas tuteladas. *Fitoterapia*, 22 (9): 138-140.
- Finkel T y Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Fonnegra G y Jiménez S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia: mastrante y borraja*. Antioquia. 2a edición. Ed. Universidad de Antioquia, Colombia. 370p.
- Gutiérrez Z, A., Ledesma R L., García G I. y Grajales C O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 33(1). Versión Online ISSN 0864-3466
- Guzmán, S., Zamarripa, A y Hernández L (2015). Calidad nutrimental y nutracéutica de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(2), 317-330.
- Hilgert N., Higuera M., Kristensen M. (2010). La medicina herbolaria en el contexto urbano. Estudio de caso en un barrio de la ciudad de Tandil. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (3), 177-190.
- Jáuregui, A., Ramos-Escudero, F., Alvarado-Ortiz, C., y B. Castañeda. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 73 (3), 142-149.
- Quiñones, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y. y Hernández de la Torre M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18 (2).
- Machaca, F. (2014). Efecto toxicológico del jincho (*Heracium neoherreriae*), altamisa (*Ambrosia arborescens*), diente de león (*Taraxacum officinale*), huira huira (*Pseudognaphalium spicatum*) y mishico (*Bidens andicola*) en ratas (*wistar*). *Investigaciones altoandinas*, 16 (01).
- Madaleno, I. M y Montero, M. C. (2012). El cultivo urbano de plantas medicinales, su comercialización y uso fitoterapéuticos en la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba, Argentina. *Cuadernos Geográficos*, 50, 63-85.
- Maldoni B (1991). Alkaloids Isolation and Purification. *J Chem Educ*, 68: 700- 703.
- Martínez M. A. (1998). Manual de prácticas para el laboratorio de Fitoquímica. Universidad de Antioquia, Medellín, 700-703.
- Murillo, E. y Méndez, J. (2007). Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios. Ibagué, Colombia: Universidad de Tolima.
- Olson M. y Fahey J (2011). Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1071-1082.
- Pérez-Guerrero C., Herrera M. y Ortiz R. (2001). A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal Ethnopharmacology*, 76(3), 279-284.
- Prior, R. L., Wu, X y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 239-262.
- Rojano B., Sáez J., Schinella G., Quijano J, Vélez E y Gil A. (2008). Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-Isopropyl-3, 6-dimethoxy-5-methylphenol). *Journal of Molecular Structure*. 877:1- 6.
- Valenzuela S, R., Morales R, M., Verde S, M., Oranday C, A., Preciado-R, P., González, J y Esparza R, J. (2015). *Cnidioscolus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutracéutica y toxicidad. *Revista Mexicana Agrícola*, 6(4), 815-825.

# Monitor Cardíaco Portátil con Interfaz Bluetooth “CARDIO UEES”

Pablo, Jácome-Ruiz<sup>1</sup>; Cristiam, Baquerizo-Cardenas<sup>2</sup>

## Resumen

En este trabajo se presenta el desarrollo e implementación de un monitor cardíaco capaz de cumplir con características de portabilidad, facilidad de uso y tiempo prolongado de operación. El diseño se divide en dos fases. En la primera, cada etapa del monitor cardíaco se implementa priorizando su consumo individual de energía. En la segunda fase, se integran las etapas para conformar el monitor cardíaco, constituido por una fuente de alimentación, una interfaz con el paciente, un micro controlador, una interfaz inalámbrica y una aplicación que se ejecuta en un teléfono inteligente. Para cumplir con las dos fases de diseño se exponen inicialmente los fundamentos teóricos y el desarrollo actual de la monitorización cardíaca. Posteriormente, para cada etapa se describen los requerimientos funcionales y las variables relevantes para su diseño. También se detallan los procesos de implementación y los procedimientos de prueba y sus resultados. Con esta investigación se pretende contribuir con una alternativa de diseño de un monitor cardíaco, que puede utilizarse por un periodo no menor a 30 días. Los resultados demostraron que el equipo desarrollado permite la monitorización cardíaca remota, facilita la movilidad de pacientes y además elimina la necesidad de continuas recargas de energía.

**Palabras Clave:** interfaz inalámbrica; monitor cardíaco; teléfono inteligente.

## Portable Heart Monitor with a Bluetooth Interface “CARDIO UEES”

## Abstract

This paper describes the development and implementation of a heart monitor capable of meeting portability features, easy to use and a prolonged time of operation. The design is divided into two phases. In the first, each stage of the cardiac monitor is implemented prioritizing their individual energy consumption. In the second phase, the stages are integrated to form the cardiac monitor, consisting of a power supply, an interface with the patient, a micro controller, a wireless interface and an application running on a smartphone. To fulfill the two design phases are initially exposed the theoretical foundations and the current development of cardiac monitoring. Subsequently, for each stage, the functional requirements are described and the relevant variables for the design. Also, implementation processes and test procedures and results are detailed. This research is intended to contribute to an alternative design of a heart monitor, which can be used for not less than 30 days period. The results showed that the equipment developed allows remote cardiac monitoring, facilitates the mobility of patients and also eliminates the need for continuous energy refills.

**Keywords:** heart monitor; wireless interface; smartphone.

**Recibido:** 5 de noviembre de 2015

**Aceptado:** 31 de agosto de 2016

<sup>1</sup> Universidad Espiritu Santo, Ecuador. Ingeniero en Electrónica y Telecomunicaciones. [pjacome@uees.edu.ec](mailto:pjacome@uees.edu.ec).

<sup>2</sup> Universidad Espiritu Santo, Ecuador. Ingeniero en Telecomunicaciones. [cbaquerizo@uees.edu.ec](mailto:cbaquerizo@uees.edu.ec).

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define a las enfermedades cardiovasculares como un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, clasificándolos dentro del conjunto de enfermedades no transmisibles (OMS, 2016). Este tipo de dolencias representa un serio problema de salud a nivel global ya que, según el reporte de World Health Organization (2014), durante el 2012 se produjeron 17.5 millones de muertes causadas por trastornos del corazón, de los cuales 7.4 millones fueron consecuencia de un infarto de miocardio (isquemia cardíaca). Se estima que desde el 2014 al 2030 mueran por alguna enfermedad cardiovascular cerca de 23.6 millones de personas. Los países pobres son los más afectados por la incidencia de enfermedades cardiovasculares, ya que el 80% de muertes fueron una consecuencia de este tipo de patología (World Health Organization, 2013). Esta realidad no es ajena en el Ecuador, ya que según un estudio desarrollado por el Ministerio de Salud Pública (2012), durante el 2011 se registraron 4381 muertes por trastornos del corazón. Como reacción ante estas cifras, la política de salud en el país ha planteado como prioridad de investigación los temas inherentes a enfermedades cardiovasculares y las nuevas tecnologías que aportan como solución para reducir estas estadísticas. (Ministerio de Salud Pública de la República del Ecuador, 2013)

Con respecto a las nuevas tecnologías que aportan con soluciones para la prevención, detección temprana, diagnóstico y monitorización de enfermedades cardiovasculares, estas se pueden incluir dentro del campo de investigación conocido como U-Health (medicina omnipresente) (Touati & Tabish, 2013). Bajo este concepto se han habilitado redes de monitorización inalámbrica para pacientes en varias instituciones de salud (Banchs & Scher, 2015). Estas redes se conocen como WBAN (Redes de Area Corporal Inalámbrica) y constituyen la siguiente generación de la medicina remota utilizando redes inalámbricas, (Meharouech, Elias, & Mehaoua, 2015). Las aplicaciones de U-Health pueden tener un gran potencial en los sectores de la salud pública y la educación, debido al uso generalizado de teléfonos inteligentes. (Liu, Zhu, Holroyd, & Seng, 2011)

En este contexto, Giovanelli, Milosevic & Farella (2015) manifiestan que el desarrollo de U-Health depende en gran medida del avance en las

comunicaciones inalámbricas y teléfonos inteligentes y lo que ha permitido el uso de Bluetooth como protocolo inalámbrico de corto alcance en aplicaciones de U-Health. El lanzamiento en el 2010 de la versión Bluetooth 4.0, la cual se conoce también como BLE (Bluetooth de Baja Energía) definido en Bluetooth, S. I. G (2010), ha permitido ampliar el rango de uso de este protocolo inalámbrico en las aplicaciones de U-Health. Los teléfonos inteligentes, por lo tanto, pueden en la actualidad usarse como receptor de valores digitalizados de las funciones fisiológicas de pacientes. (Klasnja & Pratt, 2012)

Otro beneficio de los teléfonos inteligentes, y las aplicaciones de U-Health, es que estos pueden permitir la movilidad total para pacientes y médicos en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, su uso estaría limitado por restricciones en la fuente de alimentación de estos dispositivos. De acuerdo a Serhani, Menshawy, & Benharref, (2016), la arquitectura de los monitores cardíacos actuales, que se basan en teléfonos inteligentes, no son los adecuados para aplicaciones en donde se requiera la adquisición de datos por largos periodos de tiempo, debido a las restricciones de almacenamiento, además de la limitación del tiempo de operación de las baterías de los teléfonos inteligentes. Este problema se agrava en aplicaciones con redes inalámbricas, en donde el consumo de energía se incrementa debido a la necesidad de transmitir las señales adquiridas. Las limitaciones físicas del paciente o la falta de instalaciones para realizar una carga regular de las baterías de los monitores cardíacos, son también condiciones restrictivas que dificultan el correcto uso de los monitores cardíacos basados en teléfonos inteligentes.

En este sentido, la problemática existente consiste en la indisponibilidad de un monitor cardíaco que mantenga los requerimientos de movilidad de los pacientes y su facilidad de uso, pero que además, permita su utilización continua durante largos periodos de tiempo sin demandar recargas regulares de energía. El objetivo principal del presente trabajo de investigación es proporcionar una alternativa de diseño de un monitor cardíaco, que posea gran flexibilidad en el tiempo de operación y portabilidad, aprovechando los recursos de un teléfono inteligente para la visualización de las ondas cardíacas. El monitor cardíaco que se desarrolla, pretende también favorecer

su uso en condiciones en donde equipos convencionales vean limitada su aplicación, debido a la necesidad de frecuentes recargas de energía frecuentes.

#### **Desarrollo actual de los monitores cardíacos**

El objetivo de la monitorización cardíaca es evaluar cuantitativamente y de manera constante las funciones fisiológicas del corazón, utilizando electrocardiografía (Hall, 2010). En la actualidad, el desarrollo combinado de varias tecnologías tales como, la tecnología celular, el internet y las comunicaciones inalámbricas, han permitido modificar el proceso de monitorización cardíaca. Es así que por ejemplo, un teléfono inteligente puede representar para los pacientes una herramienta en sus bolsillos, con alta capacidad de almacenamiento y varios puertos de comunicación, que adquiera la señal cardíaca en sus hogares y puede ayudar a los médicos a realizar el análisis remotamente para diagnóstico, e incluso alertar en tiempo real de eventos relacionados con el miocardio. (Kalahasty et al., 2013)

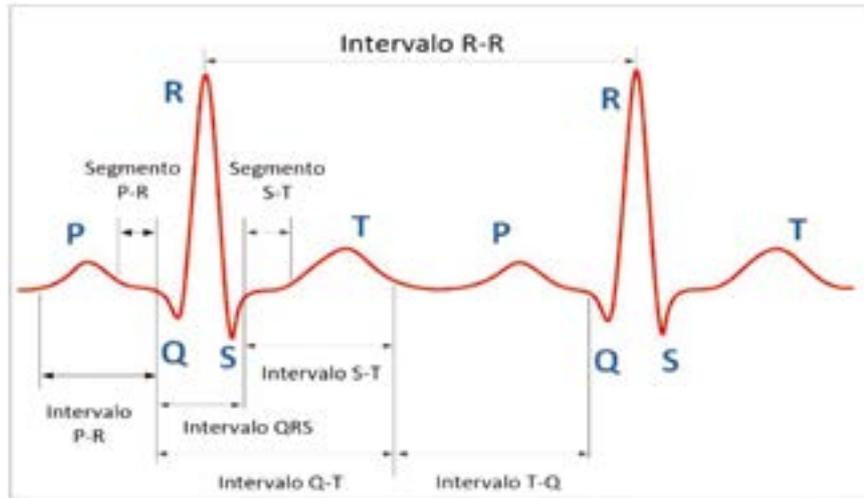
En la actualidad, existen muchos diseños de monitores cardíacos y opciones comerciales disponibles en el mercado, que se han enfocado en la inclusión de computadores personales y teléfonos inteligentes en su desarrollo. En este sentido, por ejemplo, se tiene el caso del trabajo de investigación en Varman (1998), que realiza el diseño e implementación de varios módulos de hardware y utiliza una computadora personal para la visualización de las imágenes de un simulador cardíaco. Por otro lado, Busra & Rahman (2014), proponen la implementación de un sistema computarizado de tele-medicina, que se orienta al uso en poblaciones rurales.

Además, el uso de computadores en el desarrollo de monitores cardíacos ha facilitado el diseño por medio de la implementación con herramientas avanzadas como LabVIEW (instrumentación virtual), para el procesamiento y visualización de la señal cardíaca. Kumar y otros (2014), implementan un monitor en LabVIEW, para la detección automática de problemas cardíacos comparando la tasa de pulso cardíaco con un límite fijo (determinado por los autores). Por otro lado Murugappan, M., Thirumani, Omar, & Murugappan, S., (2014), implementan un circuito analógico con un amplificador diferencial y digitalizan la señal a 12 bits con una tarjeta de adquisición de datos de National Instruments. Los resultados se pueden visualizar en una PC que ejecuta una aplicación en LabVIEW. Ambos proyectos de investigación permiten

la visualización en una PC y utilizan una interfaz alámbrica para la transmisión de datos. Aunque se pueden aprovechar los recursos de una computadora personal en el desarrollo de monitores cardíacos, no se puede garantizar la movilidad del paciente por las características de peso y necesidades energética de una PC.

Por otra parte, mediante el uso de teléfonos inteligentes en la implementación de monitores cardíacos se puede garantizar características como monitorización remota y movilidad. La aplicación realizada por Yu, Xu, & Li (2012), es un ejemplo de la integración de teléfonos inteligentes como herramienta de visualización en monitores cardíacos. En esta aplicación se implementa un electrocardiógrafo utilizando un circuito integrado personalizado para la parte analógica. Los datos digitalizados se transmiten por Bluetooth a un iPhone para su procesamiento y visualización en pantalla. Por otra parte, el trabajo que se propone en Park & Cho (2013), implementa un monitor cardíaco portátil, pero utiliza un convertidor de Bluetooth 4.0 para Android, ya que este sistema operativo no era compatible con BLE sino desde la segunda mitad del 2013 (Laird Technology, 2013). Estos trabajos de investigación permitieron demostrar la factibilidad de la plataforma de teléfonos inteligentes para el desarrollo de monitores cardíacos, sin embargo, no se presentan opciones en el diseño de la fuente de alimentación que permita garantizar portabilidad de los equipos, para tiempos prolongados de uso del dispositivo.

En el ámbito del diseño de monitores cardíacos, por otra parte, los parámetros que la literatura recomienda digitalizar, tienen que ver con la determinación de los intervalos de la señal cardíaca, de acuerdo a los expresado por Varman (1998), Karpagachelvi, Arthanari y Sivakumar (2010). (Ver Figura 1). Los monitores cardíacos se utilizan para obtener la tasa de pulsos por minuto del corazón, para mostrar en pantalla una de las derivaciones y en algunos casos se incluyen alarmas, facilitando la detección automática de un paro cardíaco, bradicardia y/o taquicardia (Baura, 2011). Los monitores cardíacos no tienen las mismas funcionalidades de un electrocardiógrafo, de acuerdo con Varman (1998), para la monitorización de un paciente no es necesario la utilización de las 12 derivaciones, sino que se pueden obtener buenos resultados únicamente con tres derivaciones.



**Figura 1. Parámetros de interés.**  
Fuente: Karpagachelvi et al (2010)

### **Generalidades del protocolo de comunicación Bluetooth Low Energy (BLE)**

El Bluetooth Low Energy (BLE) o Bluetooth de Baja Energía representa la última versión del protocolo de comunicación de corto alcance Bluetooth. BLE se orienta para aplicaciones que requieren bajo costo, corto alcance, baja tasa de transmisión y sobre todo bajo consumo de potencia (Giovannelli, Milosevic, y Farella, 2015). Según los resultados publicados por Shetty, Prasad, y Nalini (2015), el tiempo de operación de BLE es 220 veces mayor que el Bluetooth clásico.

Por el lado del protocolo de BLE (S. I. G, 2010), las tres capas que lo conforman son el Host, el Controlador y la Aplicación. En una red BLE existe un dispositivo que cumple la función de maestro de la comunicación y uno o varios dispositivos como esclavos. BLE adiciona además el concepto de anunciador para ahorrar energía. Un dispositivo puede anunciar que tiene datos y un receptor recibe dicho anuncio e inicia la comunicación comportándose como maestro. La comunicación puede realizarse mediante notificaciones continuas entre servidor y cliente o mediante una solicitud explícita de lectura. (Gomez, Oller, y Paradells, 2012)

El intercambio de información en BLE, por otro lado, ocurre siempre por medio de eventos de conexión (CE). El intervalo entre dos CE continuos se identifica como intervalo de conexión (CI) y se

caracteriza por reducir al mínimo la cantidad de energía que se consume. El consumo de energía de BLE se calcula mediante un promedio que se cuantifica entre cada CE y CI. Por otra parte la latencia, para aplicaciones médicas, requiere valores cercanos a cero. (Vallejos de Schatz, Medeiros, Schneider y Abatti, 2012)

## **II. DESARROLLO**

### **1. Metodología**

El alcance de la investigación descrita en el presente documento es obtener un circuito base de un monitor cardíaco, capaz de cumplir con características de portabilidad, facilidad de uso y tiempo prolongado de operación. Con este fin se utiliza la metodología de investigación del tipo cuantitativa. En este contexto, primeramente se determinan las etapas que deben conformar un monitor cardíaco, para luego realizar el diseño y su implementación individual (ver Figura 2). Luego, todas las etapas son verificadas cuantitativamente en su funcionamiento y consumo de energía. Por cada etapa se identifican las variables críticas de diseño y se establece su marco referencial (rango de valores que demuestran un funcionamiento correcto). Finalmente se ejecuta la experimentación integral del monitor cardíaco y se recopila datos para la evaluación del rendimiento. El flujo metodológico que se aplica puede verse en detalle en la Figura 3.

Como primera instancia, el diseño del Monitor Cardíaco se divide en etapas (Ver figura 2). Estas etapas se determinaron siguiendo las recomendaciones de diseño de dispositivos de bio-instrumentación que se especifican en Enderle (2006). Las etapas principales son las siguientes:

- Fuente de alimentación

- Interfaz con el paciente
- Microcontrolador
- Interfaz Bluetooth
- Aplicación CARDIO UEES que se ejecuta en un teléfono inteligente

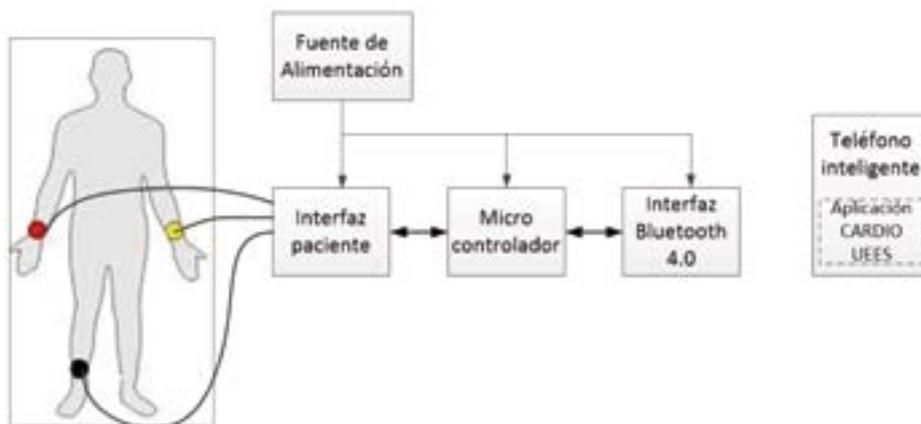


Figura 2. Diagrama de bloques de monitor cardíaco "CARDIO UEES"

Para cada una de las etapas se sigue la metodología de diseño, implementación y prueba que se describe en la Figura 3. En las siguientes

secciones se detallan los puntos relevantes a llevar a cabo, en base al flujo metodológico.

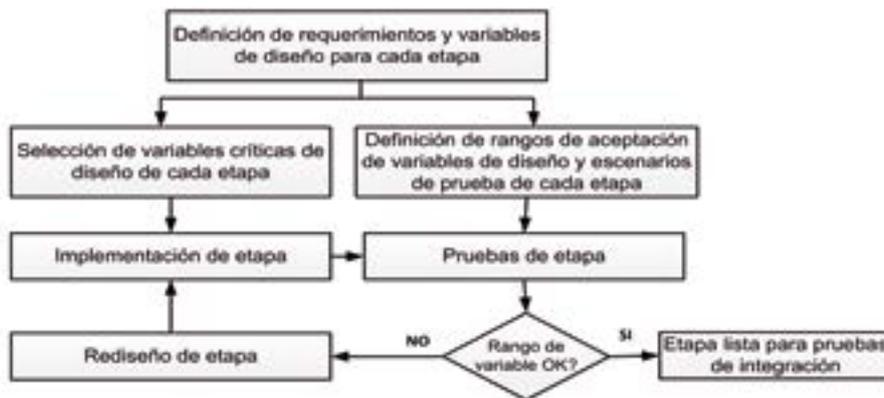


Figura 3. Metodología de diseño, implementación y prueba de cada etapa

## 2. Resultados

La Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) recomienda seguir las especificaciones del estándar ANSI/AAMI EC13:2002 - Monitores cardíacos, medidores de pulso cardíaco y alarmas, para el diseño, implementación y pruebas de

un monitor (Association for the Advancement of Medical Instrumentation, 2002). De aquí, se puede mencionar que los principales aspectos en el diseño del hardware y software de un monitor cardíaco se relacionan con la eliminación de ruido, el acople del equipo al paciente, la implementación

de la plataforma de comunicación, el despliegue de información en pantalla, el formato de reportes, etc. (Webster, 2009). También, el monitor cardíaco debe tener la capacidad de amplificación, amplitud de la señal cardíaca en un vasto rango dinámico, ya que las señales pueden variar entre pacientes y del tipo de patología cardíaca que se pretenda amplificar. El rango de frecuencias de amplificación debe estar entre 0.5 Hz y 500 Hz (Webster, 2009). Tomando como referencia todas estas recomendaciones, en las siguientes secciones se detalla el proceso de diseño, implementación y prueba correspondiente a cada una de las etapas de la Figura 2.

**Definición de requerimientos de la fuente de alimentación**

Las principales características que debe cumplir la fuente de alimentación son las siguientes:

- Debe permitir una fácil instalación del monitor cardíaco en cualquier ambiente.
- Debe tener la capacidad de mantener el circuito funcionando por lo menos 30 días. Bajo ciertas circunstancias, puede ser necesario conservar

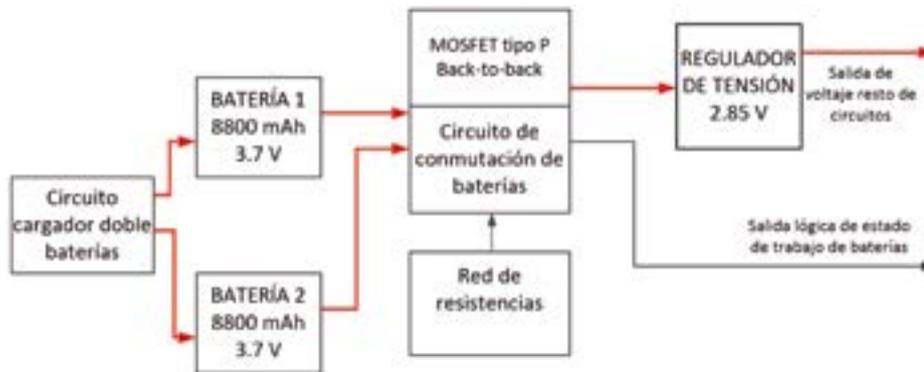
bajo monitorización al paciente por períodos extendidos de tiempo, con el fin de verificar patologías cardíacas espontáneas tales como las arritmias del corazón. (Huszar, 2002)

- Debe poseer una fuente redundante de respaldo y la transición entre las fuentes deberá ejecutarse de manera transparente al operador y paciente.
- Debe además brindar protección de sobre voltaje a todos los componentes del monitor cardíaco.
- Debe permitir la carga del equipo de manera fácil y segura para el operador y paciente.

Brown (2001), especifica que las variables que definen el diseño de la fuente de alimentación tienen que ver con el perfil de carga, durante la operación del Monitor Cardíaco.

**Implementación de la fuente de alimentación**

Con base a los requerimientos de la sección anterior y lo detallado por Dobkin y Hamburger (2014), se puede establecer los siguientes bloques que deben conformar la fuente (Figura 4):



**Figura 4. Diagrama de bloques de fuente de alimentación con batería doble**

*Circuito cargador doble de baterías:* Se utiliza el circuito integrado LTC4413 de Linear Technology (2004), que contiene dos diodos ideales con capacidad de 2.6 A de corriente y el rango de voltaje de 2.5 a 5.5 V. La caída de tensión en cada diodo no supera los 28mV y posee un habilitador para controlar su operación.

*Batería principal de trabajo y batería de respaldo (Batería 1 y Batería 2):* Se utiliza del tipo ion de litio con un voltaje nominal de 3.7 V y una capacidad de 8800 mAh. Poseen también protección de sobre voltaje (4.35 V) y bajo voltaje (2.8 V). Corriente máxima 3 A.

*Circuito de conmutación de baterías:* esta etapa se basa en el circuito integrado LTC4417 del fabricante Linear Technology (2004), que conmuta una de las dos baterías a una salida común de voltaje. La validez de voltaje para las baterías es una ventana de operación establecida por una red de resistencias. Como prioridad se selecciona la batería principal de trabajo, si ésta sale del rango definido de voltaje por un intervalo de al menos 256 ms, se conmuta automáticamente la batería de respaldo.

*Red de resistencias:* consiste de un divisor de tensión en el circuito integrado LTC4417 y establece la ventana de

validez de voltaje en las baterías. Todas las resistencias son de 1% de tolerancia para mantener los límites dentro del rango de [4.8 V - 3.05 V] e histéresis de 30mV.

*MOSFET tipo P:* El mosfet utilizado es el IRF7324 (International Rectifier, 2004). Tiene una resistencia de encendido de 0.026 ohm y un voltaje límite de compuerta VGSth de -1V. Los MOSFET están en configuración back to back (NXP Semiconductors, 2013), como medida de protección ante corrientes inversas producto de la conmutación de las baterías.

*Regulador de voltaje de 2.85 V:* se utiliza el circuito integrado TPS727285 de Texas Instruments (2013). Tiene una capacidad de 50 mA, caída de tensión (máximo 113 mV) y corriente de reposo (1.6  $\mu$ A).

### Pruebas de la fuente de alimentación

Para las pruebas se cuantifican los siguientes parámetros de la fuente de alimentación:

- Caída de tensión en el LTC4413 en conducción durante la carga de las baterías.
- Límite de sobre voltaje (OV) y bajo voltaje (UV), para ambas baterías
- Tiempo de carga/descarga de las baterías.
- Caída de tensión en los MOSFET tipo P durante la conmutación.
- Regulación de voltaje sin carga y carga máxima (durante la conexión Bluetooth).
- Consumo de corriente durante los periodos de carga y operación.

### Definición de requerimientos de la Interfaz con el paciente

Esta etapa está conformada por los electrodos, convertidores analógico-digitales y amplificadores necesarios para digitalizar y procesar las señales producto de la actividad electro-química del corazón del paciente. Según lo que afirman Becchetti & Neri (2013), las variables técnicas que definen el diseño de la interfaz con el paciente tienen que ver con el número de canales, la resolución en bits de la conversión analógica digital, ganancia de los amplificadores, referencia de voltaje, tasa de muestreo, niveles de rechazo al ruido, tasa de rechazo de modo común e impedancia de entrada.

### Implementación de la interfaz con el paciente

Con base a los requisitos técnicos anteriores y los que se mencionan Baura (2011) y Becchetti & Neri (2013), como interfaz con el paciente, se seleccionó el circuito

integrado ADS1298 del fabricante Texas Instruments (2015). El ADS1298 integra en un solo circuito convertidores analógicos digitales, amplificadores con ganancia programable, referencia de voltaje y un oscilador, de este modo se puede ahorrar espacio para propósitos de portabilidad y reducir los niveles de ruido. Para el monitor cardíaco sólo se requiere el uso de un amplificador y la resolución a utilizarse 8 bits. El ADS1298 posee las siguientes características:

*Relación de rechazo de ruido en modo común de -115 dB.* Supera los límites mínimos que se exigen de -100 dB a 60 Hz para monitores cardíacos. (Becchetti & Neri, 2013)

*Interfaz periférica serial (SPI).* Los datos convertidos por ADS1298 pueden accederse por una interfaz serial de 4 hilos.

*Modo de operación de bajo consumo de corriente de hasta 2.1 mA.* En modo de espera tiene consumo de 2 mW, apropiado para alargar la el tiempo de operación de las baterías.

*Voltaje de alimentación: unipolar [2.7V - 5.25 V], compatible con el regulador de la fuente de alimentación. Resolución de hasta 17 bits con 32 kilo muestras por segundo (kSPS) y 24 bits con 16 kSPS.* Rango válido para tasa de muestreo de monitores cardíacos (Giovannelli y otros, 2015).

El ADS1298 posee una bandera lógica que permite verificar el estado de conexión de los electrodos del monitor cardíaco al paciente. En el momento que se tiene un cambio de estado de la bandera de conexión del ADS1298 a conectado, el microcontrolador cambia a modo de operación normal, caso contrario el microcontrolador deshabilita todos los circuitos del monitor cardíaco e ingresa a estado de espera.

### Pruebas de la interfaz con el paciente

Debido a la alta escala de integración del ADS1298, las pruebas fueron configuradas para verificación de intercambio de datos serial, de bandera de desconexión de electrodos y de consumo de corriente. Para las pruebas se utilizó un simulador cardíaco que permitió emular un paciente y varias patologías cardiovasculares.

### Definición de requerimientos del Microcontrolador

El microcontrolador es el encargado de definir todas las funciones y los estados de operación del Monitor Cardíaco. Éstos representan las condiciones de

funcionamiento del monitor c ante ciertos eventos. Los estados que se tienen son: estado de carga, de operación normal y de espera.

*Estado de carga:* las dos baterías estaban recargándose y no se hizo ningún tipo de adquisición de señal cardíaca ni de transmisión por la interfaz inalámbrica. Debido a que se debe contemplar la carga de las dos baterías que conforman la fuente de alimentación, la carga del monitor cardíaco puede tomar hasta 7 horas.

*Estado de espera:* el microcontrolador verificó cada 10 segundos la conexión del paciente. Una vez detectado se activa la interfaz Bluetooth y se inicia la conversión analógica digital.

*Estado de operación normal:* la transmisión estuvo habilitada y en ejecución la adquisición de la señal cardíaca. Se debe considerar que en este estado hay dos perfiles de consumo de energía, ya que la interfaz Bluetooth cambia periódicamente entre transmisión y espera.

### Implementación del microcontrolador

Se seleccionó como microcontrolador el PIC24FJ256GB108 del fabricante Microchip Technology Inc. (2009), considerando como variables críticas su consumo de corriente y la versatilidad ofrecida en los diferentes estados de funcionamiento. De acuerdo a lo que establece el fabricante, este microcontrolador posee 5 contadores de 16 bits, de los cuales se programan 3 para mantener la temporización de los estados de funcionamiento del monitor cardíaco, descritos en la etapa anterior. Se aprovecha también del puerto serial síncrono (SPI), para la interconexión con la interfaz con el paciente. Se utiliza además un puerto serial, de los cuatro disponibles, para la intercomunicación con la etapa Bluetooth 4.0.

### Pruebas del microcontrolador

Se realizaron pruebas de consumo de energía en el circuito del microcontrolador, en los estados de funcionamiento del monitor cardíaco. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

### Definición de requerimientos de la Interfaz Bluetooth 4.0

Las aplicaciones de medicina que utilizan redes inalámbricas para la transmisión de datos deben cumplir con requerimientos como tiempo de operación, latencia y fiabilidad de los datos (Zheng et al, 2014), además

deben proveer también seguridad en la transmisión, brindar facilidades de movilidad, uso y privacidad (Touati y Tabish, 2013). Para la implementación de monitores cardíacos en tiempo real se recomienda valores no menores a 8 kbit/s (Giovannelli, Milosevic y Farella, 2015).

Por otra parte, para determinar los rangos de aceptación del consumo de corriente de esta etapa, se realizaron los cálculos utilizando el modelo que se describe en Giovannelli y otros (2015). En este modelo se define el consumo medio de energía del módulo Bluetooth como una función de dos parámetros: el CI y el número de paquetes por cada CE (PPCE). Este modelo considera que el consumo de corriente en las fases del dispositivo BLE es constante, tal como se muestran en las expresiones (1) y (2).

$$I_{CE\text{medio}} = \frac{I_F \cdot t_F + PPCE \cdot I_P \cdot t_P + (PPCE - 1) \cdot I_{P1} \cdot t_{P1}}{t_{CE}} \quad (1)$$

En donde:

$I_{CE\text{medio}}$ : corriente promedio en cada CE.

$I_F$ : corriente de las fases que no dependen de PPCE.

$t_F$ : intervalo de duración de las fases que no dependen de PPCE.

$I_P$ : corriente de las fases proporcionales a PPCE.

$t_P$ : intervalo de duración de las fases proporcionales a PPCE.

$I_{P1}$ : corriente de las fases proporcionales a PPCE en CE anterior.

$t_{P1}$ : intervalo de duración de las fases proporcionales a PPCE en CE anterior.

$$I_{\text{medio}} = \frac{I_{CE\text{medio}} \cdot t_{CE} + I_{\text{dormido}} \cdot t_{\text{dormido}}}{t_{CI}} \quad (2)$$

En donde:

$I_{\text{medio}}$ : corriente promedio entra cada CI.

$I_{\text{dormido}}$ : corriente en etapa de dormido.

$t_{\text{dormido}}$ : intervalo de etapa de dormido.

### Implementación de la Interfaz Bluetooth 4.0

El módulo Bluetooth seleccionado para este proyecto es el BL600 del fabricante LairdTech. (Laird Technologies, 2015). El cual tiene las siguientes características:

- Posee antena interna.
- Sensibilidad de recepción de -91 dBm

- Consumo en modo dormido de 2.0  $\mu$ A.
- Interfaz serial UART (Receptor-transmisor asincrónico universal)

Esta etapa se comporta como esclavo y cuando tiene listo los datos provenientes de la interfaz con el paciente, el BL600 se comporta como anunciante. La latencia puede llegar hasta 5 ms.

### Pruebas de la interfaz inalámbrica

La evaluación de desempeño de la interfaz inalámbrica se realiza con el fin de determinar los parámetros de funcionamiento (CI y latencia del esclavo), que permitan mantener al mínimo el consumo de energía y la tasa de error de bit (BER), sin necesidad de comprometer la tasa de transmisión. Para esta prueba, se utilizó el teléfono inteligente como maestro y al módulo BL600 como esclavo, con una potencia de transmisión de 4 dBm y separando el esclavo y el maestro por una distancia de 0.5 m. El maestro obtiene los datos del esclavo como un intercambio en una sola vía, en la cual, el esclavo envía una notificación en respuesta a una consulta general emitida por el maestro generándose, de este modo, un evento de comunicación (CE).

### Aplicación CARDIO-UEES

La aplicación CARDIO UEES, que se ejecuta en un teléfono inteligente con sistema operativo iOS 8.0, se desarrolló en Xcode 6.1.1, el cual posee un conjunto de herramientas creadas por Apple, con el propósito de implementar las aplicaciones para sus dispositivos (Costa, 2015). El lenguaje de programación que se usó es Swift, por su capacidad de compilación en tiempo real y por la facilidad de uso de sus librerías. La librería que se utiliza es UIKit framework. Deitel, P. J., Deitel, H. M., y Deitel, A. (2014), indican que esta librería tiene la capacidad de construir la interfaz de usuario, además facilitar la gestión de los eventos que se generan por el usuario y el sistema. Entre las clases importantes que se usó de la librería UIKit framework, se tienen la clase UIView, UILabel, UIControl y UIButton.

La clase UIView define un área rectangular en la pantalla determinando dinámicamente un valor máximo en altura de 360 píxeles. Se toma este valor como referencia y permite establecer

que la adquisición digital esté limitada a 8 bit para representar valores en el rango de 0 a 255. La clase UILabel implementa una vista de texto de sólo lectura. Se utiliza para dibujar una o varias líneas de texto estático. El texto estático corresponde al nombre paciente y características fisiológicas previamente ingresadas por el operador de la aplicación. La clase UIControl proporciona métodos para establecer el título, imagen y otras propiedades de apariencia de los botones disponibles en la aplicación de CARDIO UEES. La clase UIButton implementa un botón en la pantalla táctil. Los métodos para establecer el destino y la acción se heredan de la clase UIControl. En conjunto la aplicación "CARDIO UEES" permitió recibir datos del monitor cardiaco y además ingresar datos de interés del paciente.

Por otra parte, la información que se intercambia entre el microcontrolador y la aplicación está basada en 8 bits. La aplicación solo estará en capacidad de funcionar correctamente si el microcontrolador está en estado de operación normal y ha establecido una comunicación con el BLE. La información digitalizada del ritmo cardiaco se transmite en 8 bits, luego que se recibe como protocolo de partida un carácter de inicio. Para detener el intercambio de información se transmite desde la aplicación al microcontrolador un carácter de parada. Estos eventos (inicio y parada de transmisión) se generaron como respuesta a las acciones por parte del usuario, en el botón PLAY y STOP, disponibles en la pantalla de la aplicación.

### Resultados de las pruebas por etapas

Se presenta a continuación una síntesis de las pruebas que se realizaron, de acuerdo a lo descrito en el apartado de la Metodología, es así como en la Tabla 1 se pueden ver los resultados obtenidos en las pruebas integrales que se ejecutaron en relación a la fuente de alimentación. En la Tabla 2 se desglosa la configuración del circuito integrado ADS1298 y los resultados de la interfaz con el paciente. En ambas tablas se consideran parámetros de consumo de corriente y además cuantificaciones de rendimiento. En la Tabla 3 se presentan los consumos de energía de la tarjeta del microcontrolador en los estados de funcionamiento.

**Tabla 1. Resultados de pruebas de fuente de alimentación**

Parámetro	Valor
Caída de tensión LTC4413	50 mV
Caída de tensión en MOSFET tipo P	93 mV
Límite de sobre voltaje conmutación batería de respaldo 2	4.81 V
Límite de bajo voltaje conmutación batería de respaldo 2	2.88 V
Límite de sobre voltaje red de resistencias	1.02 V
Límite de bajo voltaje red de resistencias	0.99 V
Regulación de voltaje sin carga	2.83 V
Regulación de voltaje con carga (28 mA peak)	2.839 V
Consumo de corriente durante la carga de baterías	0.6 mA
Consumo de corriente de fuente de alimentación	1 mA
Tiempo de carga de baterías (3.0 V - 4.2 V) con cargador 2 A	6.6 horas
Tiempo de descarga de batería principal 4.2 V a 3.1 V (67 mA peak, 25°C)	12 días
Tiempo de descarga de batería respaldo 4.2 V a 3.1 V (67 mA peak, 25°C)	12 días

**Tabla 2. Configuración y resultados de la interfaz con el paciente.**

Configuración	
Frecuencia del reloj	Fclk =2.048Mhz bajo consumo
Frecuencia de muestreo	500 muestras por segundo
Ancho de banda filtro EMI	131 Hz
Referencia de voltaje	2.4V
Modo de conversión	Continuo
Resultados	
Intercambio de datos serial	Palabra de estado OK
Consumo de corriente	3 mA
Ganancia del amplificador	8

**Tabla 3. Resultados prueba de microcontrolador**

Estado de funcionamiento	Consumo	Comentarios
Estado de carga	5mA	El consumo se debe al indicador luminoso activado en este estado, sin embargo, en este estado el consumo de energía no es crítico debido a que el monitor cardiaco está conectado a una fuente de energía diferente a las baterías.
Estado de espera	0.25mA	El microcontrolador está en modo de espera manteniendo habilitado un contador por medio de un crista externo de 32768 Khz. Los demás periféricos del microcontrolador se encuentran deshabilitados. Se activa también una interrupción externa para salir de este estado.
Estado de operación normal	7.5mA/3mA	Se puede reducir este valor promedio disminuyendo el tiempo de ON de los leds que se incluyeron en la tarjeta del microcontrolador

### 3. Discusión de resultados

Se puede observar en la Tabla 1, que el valor de caída de tensión en el LTC4413 es mayor al valor teórico, según Linear Technology (2004), sin embargo, esto no representó un problema de carga de las baterías ni tampoco presentó problemas de sobre calentamiento (máximo 51 °C). Por otra parte, la caída de tensión en los MOSFET tipo P y el regulador de voltaje no comprometieron los límites de voltaje mínimo del resto de componentes y no representaron, por lo tanto, una limitación en la fuente de alimentación.

En las pruebas de conmutación automática de las baterías fue necesaria la implementación de un regulador de voltaje variable, basado en el circuito integrado LM317 (Texas Instruments, 2014). Esta prueba es válida por la baja corriente de consumo del circuito del monitor cardíaco (máximo 28 mA). Según ShenZhen LiYaWang Battery Co Std (2015), la resistencia interna de las baterías utilizadas puede alcanzar valores de hasta 350 mΩ, que en dependencia de la temperatura de operación genera una pérdida interna de hasta 10 mV. Este valor es menor al voltaje de histéresis de 30 mV, configurado en el circuito integrado LTC4417. Esto es muy importante debido a que se evita la reconexión errónea de la batería principal, al momento que se conmuta a la batería secundaria. Al momento de conmutación entre baterías, la batería desconectada recuperó un valor de 10 mV pero no se reconectó a la salida por el valor de histéresis configurado en el circuito integrado LTC4417.

Para las pruebas a la etapa de interfaz con el paciente, se utilizó el kit demostrativo de desempeño del ADS1298, cuyas características se detallan en Texas Instruments (2011). Se modificó el kit demostrativo

para acceder al puerto SPI del ADS1298 y se utilizó un simulador cardíaco para emular al paciente. Se activó únicamente el canal 1 del ADS1298 y la ganancia del amplificador se ajustó hasta observar una mejoría en el nivel de ruido presente en la señal digitalizada. Los resultados demostraron que la configuración realizada, permite mantener niveles bajos de consumo de energía, sin comprometer el rendimiento requerido en cuanto a la tasa de muestreo y resolución del monitor cardíaco.

Para la evaluación del desempeño de la etapa interfaz Bluetooth 4.0 se utilizó el kit de desarrollo BLE600 del fabricante LairdTech (Laird Technologies, 2014). El tiempo entre cada intercomunicación se configuró a 100 ms. El consumo promedio teórico del BLE600 en cada CE es de 10.7mA (utilizando la expresión 1) y el consumo promedio teórico es de 2.1 mA (utilizando la expresión 2). Cada 100 ms transmite 50 muestras de 8 bits convertidas a una cadena de 3 bytes (valores ASCII de 000 a 255). Con estos valores se alcanza un total de 12 kilo bits por segundo. A esta tasa de transmisión el consumo de corriente del módulo BL600 alcanza los 17 mA en su valor máximo. El consumo total del circuito de monitor cardíaco en su valor máximo no sobrepasa los 28 mA. En promedio el monitor consume un valor cercano a los 15 mA. En las pruebas realizadas, las baterías enfrentaron una carga de 67 mA y tuvieron una duración individual de 12 días. El valor resultante como consumo de corriente del circuito es cuatro veces menor al que se utilizó en las pruebas de las baterías, por lo tanto, se puede garantizar una autonomía de operación no menor a 30 días sin necesidad de carga de las baterías. En la Figura 5 se puede ver la onda obtenida y las etapas integradas.

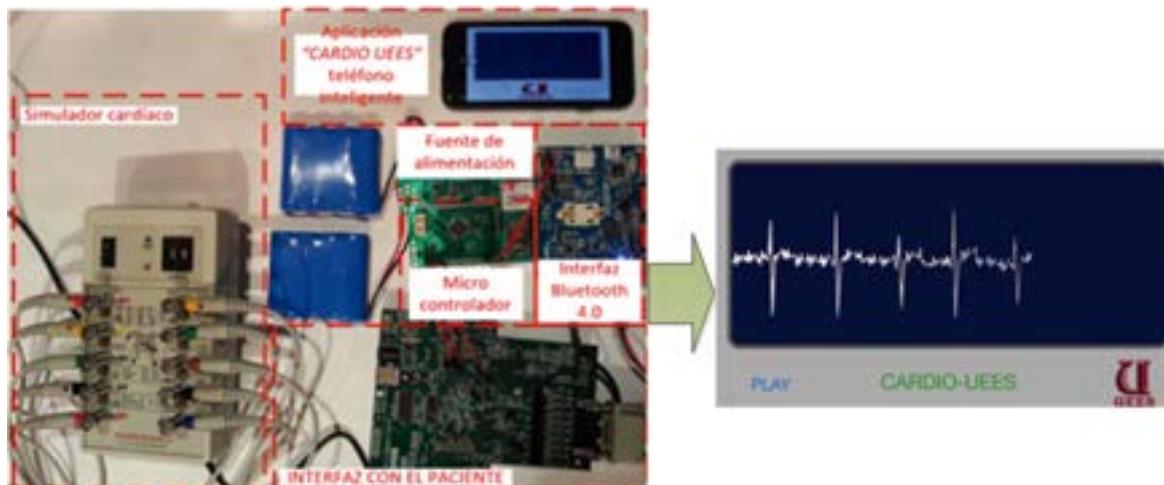


Figura 5. Implementación del monitor cardíaco CARDIO UEES

### III. CONCLUSIONES

En base a los requerimientos de diseño de los monitores cardíacos y a los resultados de pruebas a las que se sometieron las etapas del monitor cardíaco, se desarrolló un equipo que obedece los estándares de implementación y además, habilita su uso sin necesidad de recarga, por un tiempo no menor a 30 días. Se cumplió también con los requerimientos que incluyen portabilidad, fiabilidad y facilidad de uso. El abastecimiento garantizado de energía, durante 30 días, también puede favorecer el uso por parte de pacientes con limitaciones físicas o en ambientes con falta de infraestructura apropiada, para la recarga del monitor cardíaco.

El tiempo de operación de 30 días se puede garantizar, ya que los resultados que se obtuvieron representan una consecuencia de la implementación de rutinas de programación y criterios de diseño, orientados a la optimización en el uso de energía en todas las etapas del monitor cardíaco. La metodología cuantitativa de desarrollo individual por etapa, permitió obtener resultados dentro de los rangos deseados en el consumo de energía.

La integración de dos baterías de ion de litio en el circuito del monitor cardíaco anularon la necesidad de recargas continuas durante 30 días, sin embargo, adicionaron también complejidad al circuito de la fuente de alimentación. Para integrar óptimamente las baterías, es necesaria la inclusión de un circuito de carga de baterías en paralelo, un circuito comparador, un circuito de protección individual y un circuito de conmutación de baterías (principal y secundaria).

Se mejoró la interfaz con el usuario, mediante la implementación de indicadores luminosos en el circuito del monitor cardíaco, sin embargo, la adición de indicadores luminosos incrementaron el consumo de energía total del circuito. Para reducir este problema fue necesaria la programación de un temporizador adicional en el microcontrolador, para reducir el tiempo promedio de encendido de los indicadores. Para el estado de recarga del monitor cardíaco no se consideró al consumo de energía como un parámetro crítico, ya que en este estado, el monitor está conectado a una fuente de alimentación confiable.

La inclusión de dos baterías de 8800 mAh, como fuentes principales de alimentación del circuito, permitió incrementar el tiempo de operación continuo del monitor cardíaco a 30 días, sin embargo, el peso aumentó en 450 gramos. El peso puede representar un

inconveniente en términos de portabilidad, no obstante, en futuros trabajos de investigación se pueden utilizar diferentes celdas de baterías de ion litio, así como también diferentes compuestos, con el fin de reducir el peso y modificar la forma de las baterías. De este modo se puede apartar la forma de los monitores, en dependencia de las necesidades de portabilidad de los médicos y pacientes.

Como trabajo futuro se puede aprovechar las señales digitalizadas por el monitor cardíaco y almacenarlas en una plataforma informática, de tal manera que estas puedan ser visualizadas por estudiantes de medicina y utilizadas como herramientas didácticas por profesores, en cualquier momento y sitio.

### IV. REFERENCIAS

- Association for the Advancement of Medical Instrumentation. (2002). Cardiac Monitors, Heart Rate Meters, and Alarms. ANSI/AAM EC13:2002. Recuperado de <http://www.aami.org/>.
- Banchs, J. E., y Scher, D. L. (2015). Emerging Role of Digital Technology and Remote Monitoring in the Care of Cardiac Patients. *Medical Clinics of North America*, 99(4), 877-896.
- Baura, G. (2011). Medical Device Technologies: A Systems Based Overview Using Engineering Standards. Academic Press.
- Becchetti, C., y Neri, A. (2013). *Medical instrument design and development: from requirements to market placements*. John Wiley & Sons.
- Bluetooth, S. I. G (2010). Specification of the Bluetooth System v4.0. Recuperado de <https://www.bluetooth.org>.
- Brown, M. (2001). *Power supply cookbook*. Newnes.
- Busra, U. S., y Rahman, M. Z. (2014, March). Mobile phone based telemedicine service for rural Bangladesh: ECG. In Computer and Information Technology (ICCIT), 2013 16th International Conference on (pp. 203-208). IEEE. Conference held in Khulna.
- Costa, C. (2015). *Swift Cookbook - 50 Recipes to Help You Harness Swift*. Packt Publishing
- Deitel, P. J., Deitel, H. M., y Deitel, A. (2014). *IOS 8 for Programmers: An App-driven Approach with Swift (Vol. 1)*. Pearson Education.
- Dobkin, B., y Hamburger, J. (2014). *Analog Circuit Design Volume Three: Design Note Collection (Vol. 3)*. Newnes.
- Enderle, J. D. (2006). Bioinstrumentation. Synthesis

- Lectures on Biomedical Engineering, 1(1), 1-220.
- Giovanelli, D., Milosevic, B., y Farella, E. (2015, June). Bluetooth Low Energy for data streaming: Application-level analysis and recommendation. In *Advances in Sensors and Interfaces (IWASI), 2015 6th IEEE International Workshop on* (pp. 216-221). IEEE. doi:10.1109/IWASI.2015.7184945.
- Gómez, C., Oller, J., y Paradells, J. (2012). Overview and evaluation of bluetooth low energy: An emerging low-power wireless technology. *Sensors*, 12(9), 11734-11753.
- Hall, J. E. (2010). *Guyton y Hall physiology review*. Elsevier Health Sciences.
- Huszar, R. J. (2002). Arritmias Guía práctica para la interpretación y el tratamiento. *Arritmias Guía práctica para la interpretación y el tratamiento-84-8174-652-5-68*, 97.
- International Rectifier (2004). IRF7324 HEXFET Power Mosfet (PD-95460). Recuperado de <http://www.irf.com>.
- Kalahasty, G., Alimohammad, R., Mahajan, R., Morjaria, S., Ellenbogen, K. (2013). A Brief History of Remote *Cardiac Monitoring*. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 5(3), 275-282.
- Karpagachelvi, S., Arthanari, M., y Sivakumar, M. (2010). ECG feature extraction techniques-a survey approach. arXiv preprint arXiv:1005.0957.
- Klasanja, P., y Pratt, W. (2012). Healthcare in the pocket: mapping the space of mobile-phone health interventions. *Journal of biomedical informatics*, 45(1), 184-198.
- Kumar, M., Umesh, K., Pandiaraja, G., Thomas, S., y Venkatesh, M. (2014). A Research Work on Identification of Cardiac Disorders using LabVIEW.
- Laird Technologies. (2014). Bluetooth Low Energy (BLE) Development Kit User Manual (Version 1.0). Recuperado de [www.lairdtech.com/bluetooth](http://www.lairdtech.com/bluetooth).
- Laird Technologies. (2015). Single Mode Bluetooth Low Energy (BLE) Module Part # BL600-SA, BL600-SC, BL600-ST, BL620-SA, BL620-SC, BL620-ST HARDWARE INTEGRATION GUIDE (Version 2.4). Recuperado de [www.lairdtech.com/bluetooth](http://www.lairdtech.com/bluetooth)
- Laird Technology (2013). Laird Technologies releases android support for 40 series radio modules. Recuperado de <http://www.lairdtech.com/news/>
- Linear Technology. (2004). LTC4413 Dual 2.6A, 2.5V to 5.5V, Ideal Diodes in 3mmx3mm DFN (Rev. LT 0909 REV C). Recuperado de <http://www.linear.com>.
- Linear Technology. (2012). LTC4417 Prioritized PowerPath Controller (LT 1112). Recuperado de <http://www.linear.com>.
- Liu, C., Zhu, Q., Holroyd, K. A., & Seng, E. K. (2011). Status and trends of mobile-health applications for iOS devices: A developer's perspective. *Journal of Systems and Software*, 84(11), 2022-2033. Conference held in Kyoto.
- Meharouech, A., Elias, J., & Mehaoua, A. (2015, May). Future body-to-body networks for ubiquitous healthcare: a survey, taxonomy and challenges. In *Future Information and Communication Technologies for Ubiquitous HealthCare (UbiHealthTech), 2015 2nd International Symposium on* (pp. 1-6). IEEE. Symposium held in Beijing.
- Microchip Technology Inc. (2009). PIC24FJ256GB110 Family Data Sheet 64/80/100-Pin, 16-Bit Flash Microcontrollers with USB On-The-Go (OTG) (DS39897C). Recuperado de <http://www.microchip.com>.
- Ministerio de Salud Pública de la República del Ecuador. (2012). Indicadores Básicos. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/>
- Ministerio de Salud Pública de la República del Ecuador. (2013). Prioridades de investigación en Salud. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/>
- Ministerio de Salud Pública de la República del Ecuador. (2016). Causas de mortalidad en el Ecuador. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/>
- Murugappan, M., Thirumani, R., Omar, M. I., & Murugappan, S. (2014, March). Development of cost effective ECG data acquisition system for clinical applications using LabVIEW. In *Signal Processing and its Applications (CSPA), 2014 IEEE 10th International Colloquium on* (pp. 100-105). IEEE. Conference held in Kuala Lumpur.
- Park, Y. J., y Cho, H. S. (2013, October). Transmission of ECG data with the patch-type ECG sensor system using Bluetooth Low Energy. In *ICT Convergence (ICTC), 2013 International Conference on* (pp. 289-294). IEEE. Conference held in Jeju.
- Sherhani M. A., Menshaw, M. E., y Benharref, A. (2016, Jan). SME2EM: Smart mobile end-to-end

- monitoring architecture for life-long diseases. *Comput Biol Med*, 1(68), 137-154. doi: 10.1016.
- Shen Zhen Li Ya Wang Battery Co Std (2015). 18650-4s1p battery pack Data Sheet.
- Shetty, N. R., Prasad, N. H., & Nalini, N. (2015). Emerging Research in Computing, Information, Communication and Applications.
- Texas Instruments (2013). Ultralow IQ, 50mA LDO Linear Regulators with Power Good Output in SC70 Package (SLVS332I). Recuperado de <http://www.ti.com>.
- Texas Instruments (2015). ADS129x Low-Power, 8-Channel, 24-Bit Analog Front-End for Biopotential Measurements (SBAS459K). Recuperado de <http://www.ti.com>.
- Texas Instruments. (2011). ADS1298ECG-FE/ADS1198ECG-FE ECG Front-End Performance Demonstration Kit User's Guide (SBAU171A). Recuperado de <http://www.ti.com>.
- Texas Instruments. (2014). LM117/LM317A/LM217-N Three-Terminal Adjustable Regulator (SNVS7740). Recuperado de <http://www.ti.com>.
- Touati, F., y Tabish, R. (2013). U-healthcare system: State-of-the-art review and challenges. *Journal of medical systems*, 37(3), 1-20.
- Vallejos de Schatz, C. H., Medeiros, H. P., Schneider, F. K., y Abatti, P. J. (2012). Wireless medical sensor networks: Design requirements and enabling technologies. *Telemedicine and e-Health*, 18(5), 394-399.
- Varman, M. (1998, June). Computer based biomedical equipment design: An EKG recorder, monitor and simulator. In *Computer-Based Medical Systems, 1998. Proceedings. 11th IEEE Symposium on* (pp. 222-227). IEEE. Conference held in Lubbock, TX.
- Webster, J. (2009). *Medical instrumentation: application and design*. John Wiley & Sons.
- World Health Organization. (2013). Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. Recuperado de <http://www.who.int/en/>
- World Health Organization. (2014). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Recuperado de <http://www.who.int/en/>
- Yu, B., Xu, L., & Li, Y. (2012, June). Bluetooth Low Energy (BLE) based mobile electrocardiogram monitoring system. In *Information and Automation (ICIA), 2012 International Conference on* (pp. 763-767). IEEE. Conference held in Shenyang.
- Zheng, Y. L., Ding, X. R., Poon, C. C. Y., Lo, B. P. L., Zhang, H., Zhou, X. L., y Zhang, Y. T. (2014). Unobtrusive sensing and wearable devices for health informatics. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 61(5), 1538-1554

# Queratina a partir de la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo, utilizando queratinasas producidas por *Bacillus subtilis*

Geanina, Machuca-Loja<sup>1</sup>, Braulio, Madrid-Celi<sup>2</sup>, Diana, Sanmartin-Galvan<sup>3</sup>,  
Jhonny, Pérez- Rodríguez<sup>4</sup>

## Resumen

El objetivo de la presente investigación fue hidrolizar harina de plumas de pollo para la obtención de queratina. El diseño metodológico de la investigación fue experimental; se realizaron cuatro fermentaciones correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar factores [concentración de sustrato (18 g/L y 23 g/L) y concentración del inóculo (2 y 3 g/L), dos niveles para cada factor]. La determinación de la concentración de nitrógeno total se efectuó mediante espectrofotometría UV-Visibles, el método utilizado fue la digestión de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), la concentración máxima de nitrógeno se alcanzó en el tratamiento 2 (1,5 %), lo cual multiplicado por el factor proteico 6,25 dio un porcentaje de proteína de 9,4% de queratina en el hidrolizado, presentando diferencia significativa (p<0,05) del resto de tratamientos, al cabo de 24 horas de retención hidráulica. En conclusión, es posible la hidrólisis enzimática de harina de plumas de pollo utilizando el *Bacillus subtilis* como productor de proteasas.

**Palabras Clave:** digestión; espectrofotometría UV-Visible; fermentación; hidrólisis enzimática; proteasas.

## Getting keratin from feather meal using keratinases produced by *Bacillus subtilis*

## Abstract

The objective of this research was hydrolyzed feather meal of chicken for the production of keratin. The methodological research design was experimental; four fermentations, corresponding to a completely randomized experimental design, resulting from considering factors [substrate concentration (18 g / L and 23 g / L) and concentration of inoculum (2 and 3 g / L), two levels was performed for each factor]. Determining the total nitrogen concentration was performed by UV-Visible spectrophotometry, the method used is the persulfate potassium digestion (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), the maximum concentration of nitrogen is reached in the treatment 2 (1.5%) which multiplied by the factor protein 6.25 gives a percentage of 9.4% protein in the hydrolyzed keratin, showing significant difference (p <0.05) from other treatments at 24 hours hydraulic retention. In conclusion the enzymatic hydrolysis of chicken feather meal is possible using the *Bacillus subtilis* as a producer of proteases.

**Keywords:** fermentation; UV-visible spectrophotometry; digestion; enzymatic hydrolysis; proteases.

**Recibido:** 20 de agosto de 2015

**Aceptado:** 31 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Bioquímica Farmacéutica. geaninamachucaloja@hotmail.com

<sup>2</sup>Docente de la carrera de Ingeniería Química, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Ingeniero Petroquímico. Especialista en Auditoría y Gestión de la Seguridad y Salud Ocupacional. bmadrid@utmachala.edu.ec; brauliomadrid@gmail.com

<sup>3</sup>Docente Contratada de la cátedra de Microbiología, Farmacología y Microbiología General en la Carrera de Bioquímica y Farmacia e Ingeniería Química de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud-Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Bioquímica Farmacéutica. dsanmartin\_est@utmachala.edu.ec

<sup>4</sup>Docente Auxiliar Tiempo Completo en Imagenología y Clínica de Especies Menores, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias-Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Máster en Clínica y Cirugía Canina. Máster en Salud Canina. Doctorando en Ciencias Ambientales. jeperez@utmachala.edu.ec

## I. INTRODUCCIÓN

La avicultura es uno de los sustentos de la alimentación y la economía en Ecuador, hay aproximadamente 1576 granjas avícolas de pequeños, medianos y grandes productores, dedicados a la producción de huevos, carne y reproductoras, dentro de las cuales, en ocasiones se presentan dificultades con el manejo de los residuos orgánicos que representan aproximadamente el 8 % del peso de las aves (Morochó, 2014).

La fuente natural principal de la queratina es la pluma de ave de corral, que como deshecho puede ser aprovechado, mediante una combinación de tratamientos fisicoquímicos y biológicos, debido al alto contenido proteico que presentan, aunque con limitaciones en su estado natural debido a su baja digestibilidad (Reddy & Santosh, 2016) y escaso valor biológico por la mínima presencia de aminoácidos esenciales, los métodos convencionales de aprovechamiento implican alto consumo de energía, lo cual degrada los pocos aminoácidos esenciales que contienen las plumas y por ende el alto valor económico (Fakhfakh et al, 2011).

En la actualidad se da el uso de herramientas biotecnológicas, como los microorganismos productores de enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar este sustrato (Pluma de pollo), entre ellos puede mencionarse la queratina, colágeno y elastina, y en especial los *Bacillus subtilis* productores de queratinasas y con alta actividad queranolítica (Zaghloul, Embaby, & Elmahdy, 2011). Por lo cual, el objetivo de la presente investigación fue la obtención de queratina a partir de la hidrólisis enzimática de plumas de pollo, dándole valor agregado a este tipo de desechos orgánicos y de esta manera fomentar la aplicación de nuevas tecnologías amigables con el ambiente.

## II. DESARROLLO

### 1. Marco Referencial

En Ecuador mensualmente se desechan 72 toneladas de plumas de pollo y se importa grandes cantidades de productos cosméticos como cremas, gel, shampoo, loción, etc., para el cabello, que contienen queratina (Núñez Altamirano & Salazar Cedillo, 2013). En los últimos 5 años, se ha importado queratina cosmética, 823.035 toneladas en 1999 a 2'21.009 toneladas en el 2011, que proviene de países como Brasil, México, Colombia y Argentina, cuya inversión aproximada fue de 73 millones de dólares (Noureddine, 2015).

En promedio, de 200 pollos se generan 30 kg de

plumas al día y se desechan alrededor de 11.000 kg al año. Si esta cantidad de plumas se procesara como materia prima, de ella se obtendría alrededor de 9000 kg de queratina, ya que el 80% de su peso corresponde a esta proteína (Osejos, 2010; Rai & Mukherjee, 2015).

La queratina es rica en treonina, arginina, valina y leucina y muy rica en cisteína; contrariamente, las tasas de histidina, lisina y metionina son bastante bajas. Los hidrolizados de las plumas de los pollos contienen 88 % de la fracción proteica que corresponde a  $\alpha$ -queratina.

Las alfa queratinas son especialmente ricas en aminoácidos con grupos hidrofóbicos como fenilalanina, isoleucina, valina, metionina y alanina y particularmente ricas en cistina, llegando a un 18% en el caso de las alfa queratinas más duras como las del caparazón de las tortugas (Lehninger, 1995; Yusuf et al, 2016).

De acuerdo al trabajo de investigación titulado "Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas", con el método químico Na<sub>2</sub>S se obtienen las soluciones de queratina, con características similares a las de la queratina cosmética (comercial), en su procedimiento se emplea agua y temperatura ambiente que bajan el costo de producción y no es peligroso, por lo tanto es el más recomendado para la obtención de queratina cosmética (Virginia, Cedillo, Rodrigo, & Altamirano, 2013).

Por tal motivo la presente investigación utilizó el método biológico para la obtención de queratina a partir de plumas de pollo, estas fueron el sustrato fermentable para la secreción de queratinasas capaces de degradarlas. Este fenómeno está asociado a la necesidad de la célula de hidrolizar sustratos proteicos de gran tamaño en moléculas pequeñas para su aprovechamiento como fuente de nutrientes. Entre los microorganismos Gram +, encontramos *Bacillus subtilis* que producen una proteasa con actividad para degradar queratina, el cual se usa en el tratamiento de degradación de las plumas de aves (Cui, Li, Li, & Lin, 2016 ; Abhrajyoti, Krishanu & Dhruvajyoti, 2008) .

### 2. Metodología

**Localización de la investigación:** la presente investigación se desarrolló en los laboratorios de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

**Medio de Fermentación y Condiciones de Cultivo:** se empleó el medio salino basal descrito por Pandian et al. 2012, el cual contiene un litro de agua

de mar y un litro de suero de leche y ajustado a pH 7,5 con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 10 %. Este medio fue suplementado con harina de plumas molidas a una concentración de 40 g/L y 50 g/L y esterilizado por autoclave 15 min, a 121°C (Pandian, Sundaram, & Panchatcharam, 2012).

El diseño de la investigación fue de carácter descriptivo (describe situaciones porque se observa y define el tratamiento que resulte estadísticamente significativo en la obtención de queratina a partir de plumas de pollo) experimental, (se realizaron cuatro fermentaciones, correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar dos factores [concentración de sustrato y concentración del inóculo y dos niveles para cada factor]). Ver Tabla 1

**Tabla 1. Combinación factorial del experimento**

Concentración de Sustrato (%)	Concentración de Enzima (g/L)	
	B <sub>1</sub> = 2 g/L	B <sub>2</sub> = 3 g/L
A <sub>1</sub> = 18 %	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>
A <sub>2</sub> = 23 g/L	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>

HPP: Harina de plumas de pollo, A<sub>n</sub>\*B<sub>n</sub>: Interacción de los dos

La preparación del medio de cultivo se realizó, adicionando 40 g/L y 50 g/L (Factor A) de plumas de pollos molidos, se ajustó el pH a 7,5 con NaHCO<sub>3</sub>, posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 min, al cual se le inoculó 2 g/L y 3 g/L de enzima Granozyme de la marca comercial GRANOTEC (Factor B).

El criterio utilizado para seleccionar la concentración de plumas del medio de cultivo (40 g/L y 50 g/L) y la temperatura de incubación (Temperatura ambiente), estuvo basado en ensayos previos realizados con enzimas proteasas (Daroit, Corrêa, & Brandelli, 2011)-

**Obtención de Enzimas:** Granozyme ACC es una enzima proteasa neutral que contiene exclusivamente actividad endo - peptidasa. Se obtiene a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus subtilis*, la cual tiene la capacidad de hidrolizar proteínas de alto peso molecular en péptidos de bajo peso molecular (GRANOTEC, 2013). Ver Tabla 2.

**Tabla 2. Composición del extracto enzimático.**

Constituyentes	%
Solución de Proteasa	40
Glicerol	30
Sorbitol	30

Fuente: Granotec (2013)

Granozyme ACC tiene una actividad mínima de 840 UHb/g. El producto cumple con las especificaciones recomendadas de la FAO/OMS, JECFA y la Food Chemicals Codex (FCC), para enzimas de grado alimenticio. El conteo viable total está dentro del límite superior de 5 x10<sup>4</sup>/g.

**Dosificación:** Hidrólisis de proteínas 0,01 -0,5 % basado en el contenido de proteínas del sustrato.

**Protocolo de hidrólisis enzimática de las plumas de pollo**

**Obtención de la Harina de Pluma de Pollo**

**Molienda:** luego del Prensado se obtiene un Cake un poco duro que debe ser sometido a un proceso de molienda en molinos de martillos, para lograr la granulometría de 300 µm.

**Tamizado:** el tamaño de partícula fue un parámetro importante en la hidrólisis enzimática de la harina de plumas de pollos, de preferencia menor a una granulometría baja (315 µm), de esta manera existe mayor área de ataque para los *Bacillus subtilis* productores de enzimas proteolíticas.

**Inoculación de la Enzima:** una vez ajustado el medio de cultivo a pH 7 se esterilizó, enfrió a temperatura ambiente y se inoculó la cantidad de enzima de acuerdo al tratamiento.

**Purificación del Hidrolizado:** una vez transcurrido las 72 horas de hidrólisis enzimática se procedió a separar mediante filtración la porción de harina de plumas que no se solubilizó, al hidrolizado soluble se lo desodorizó y concentró por tratamiento térmico.

**3. Resultados**

**Determinación de la relación óptima de sustrato – inóculo (hidrólisis enzimática)**

La relación recomendable de la concentración óptima de sustrato-enzima se la determinó en función del mayor porcentaje de hidrólisis obtenido. En la Figura 1 se muestran los porcentajes de hidrólisis obtenidos.

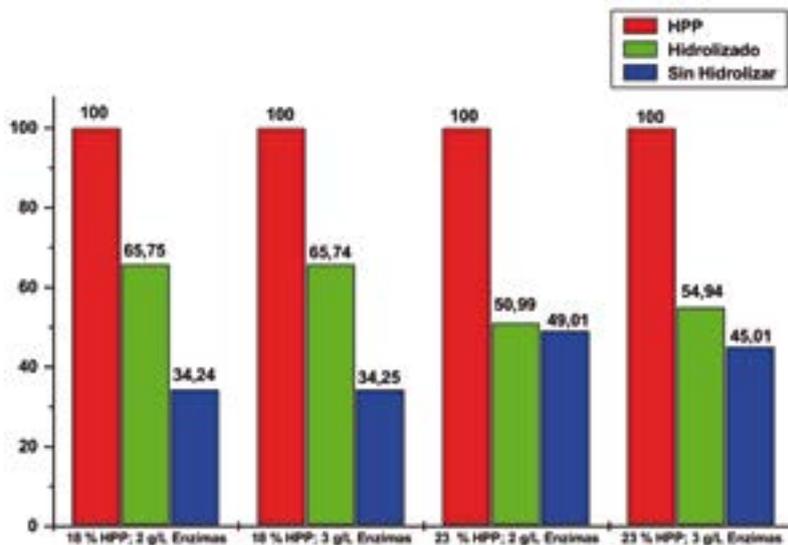


Figura 1. Porcentaje de hidrólisis obtenido en los cuatro tratamientos estudiados

En la Figura 1, puede observarse cómo los tratamientos 1 y 2 alcanzan los mayores porcentajes de hidrólisis de la harina de plumas de pollo (65,75 %), mientras que los tratamientos 3 y 4 solo alcanzan el 50,99 y 54,94 %, respectivamente.

La prueba de Tukey indica que existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos estudiados, el factor que influye en la hidrólisis enzimática es la concentración de harina de pluma de pollos, ya que a mayor concentración de proteína mayor formación de nitrógeno amoniacal, el cual es un inhibidor de la hidrólisis enzimática.

### Análisis Estadístico

Este método se lo realizó con la finalidad de optimizar el proceso de hidrólisis enzimática. En la Tabla 3 se muestra la prueba de Tukey realizada a los 4 tratamientos.

Tabla 3. Pruebas de rango múltiple de Tukey

Contraste	Diferencia	Límites (±)
1-2	-0,1	4,21
1-3	*14,96	4,21
1-4	*10,76	4,21
2-3	*15,12	4,21
2-4	*10,92	4,21
3-4	-4,2	4,21

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa

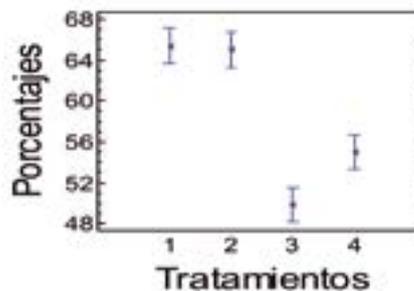


Figura 2. Prueba de Tukey (95 % HSD)

La prueba de Tukey indica los intervalos alrededor de cada media. Los intervalos que se muestran se basan en la prueba de Tukey, la cual indica que si existe diferencia honestamente significativa (HSD), de tal manera que todas las medias se encuentran por encima del 95,0% de confianza. Ver Figura 2.

### Determinación de los parámetros que intervienen en la hidrólisis enzimática (pH, nitrógeno total, oxígeno disuelto, conductividad, solidos totales disueltos y queratina total)

Durante la hidrólisis enzimática existieron parámetros fisicoquímicos que son indispensables controlar, para un correcto desarrollo del proceso. En Figura 3 se muestra el comportamiento del pH durante las 60 horas de hidrólisis enzimática de la harina de plumas de pollo (HPP).

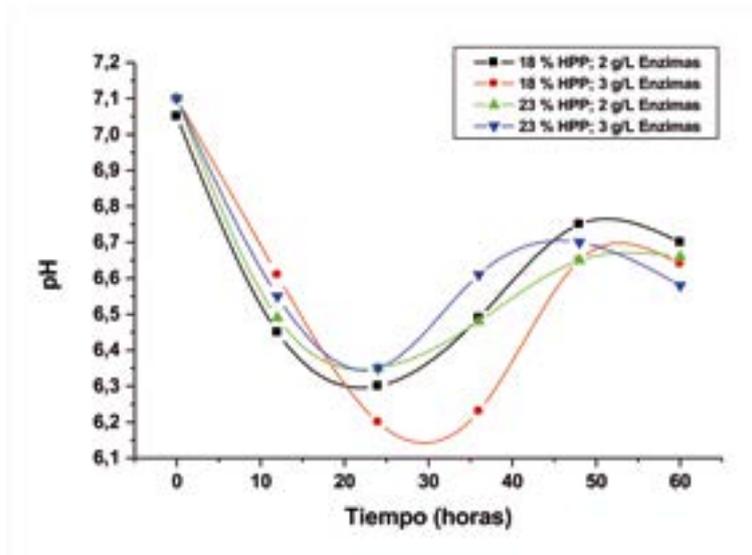


Figura 3. Variación del pH en la hidrólisis enzimática.

Como puede verse en la Figura 3 el pH desciende durante las 24 primeras horas en los cuatro tratamientos desde un 7,1 en el tratamiento 1 y 2 hasta 6,3 y 6,2 respectivamente y 7,05 en el tratamiento 3 y 4 hasta un valor pH de 6,35 en ambos tratamientos. El descenso de pH se presenta las 24 primeras horas de hidrólisis, luego se incrementa debido a la formación de nitrógeno amoniacal como producto de degradación.

En la Figura 4 se presenta el comportamiento del oxígeno disuelto durante las 60 horas de hidrólisis enzimática. Como se visualiza en la

Figura 4, la concentración de oxígeno disuelto desciende significativamente ( $p < 0,05$ ) en los cuatro tratamientos, en el tratamiento 1 desde 5 mg/L hasta 0,3 mg/L, en el 2 desde 4 mg/L hasta 0,35 mg/L, en el tratamiento 3 desde 2,8 mg/L hasta 0,2 mg/L y en el 4 desde 2,5 mg/L hasta 0,25 mg/L, este fenómeno se le atribuye a que el *Bacillus subtilis*, es un microorganismo aerobio que comienza a consumir oxígeno y reproducir enzimas queratinas desde el inicio de la hidrólisis enzimática (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003).

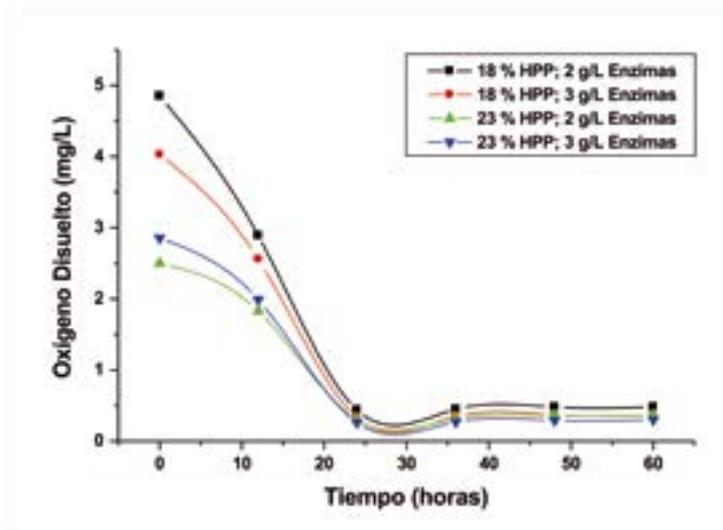


Figura 4. Variación de la concentración de oxígeno disuelto

En la Figura 5 se muestra el comportamiento de la conductividad del hidrolizado durante las 60 horas de hidrólisis enzimática. Como se puede ver en la Figura 5, se incrementa la conductividad eléctrica en

el hidrolizado ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), en los cuatro tratamientos, lo cual tiene una relación directamente proporcional con el incremento de la concentración de los sólidos totales (Brusasco, 2014).

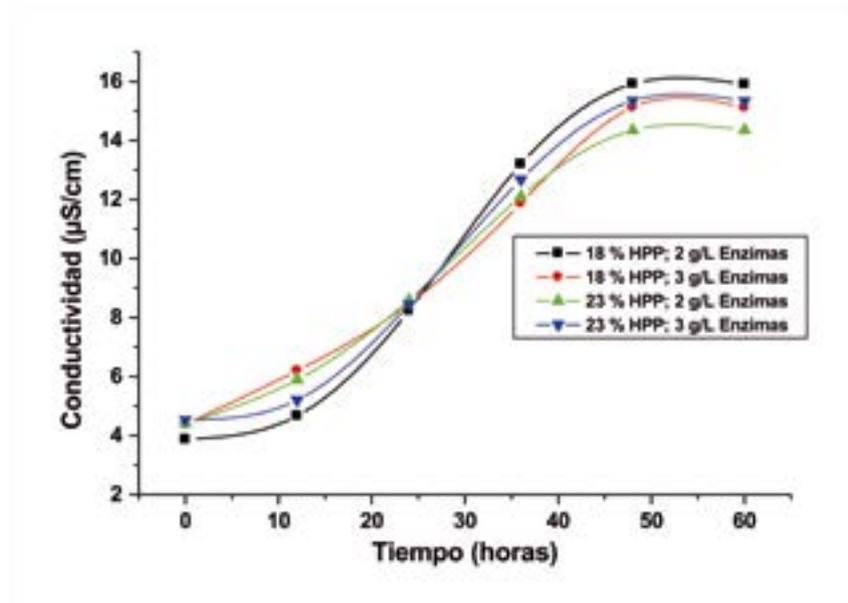


Figura 5. Comportamiento de la conductividad durante la hidrólisis enzimática

En la Figura 6 se muestra el incremento de la concentración de sólidos disueltos totales en el hidrolizado. Como puede apreciarse en la Figura 6, la concentración de sólidos disueltos totales se incrementa significativamente en los

4 tratamientos, llegando a estabilizarse a las 48 horas de hidrólisis enzimática, y al realizar la medición de este parámetro no hubo incremento significativo ( $p>0,05$ ).

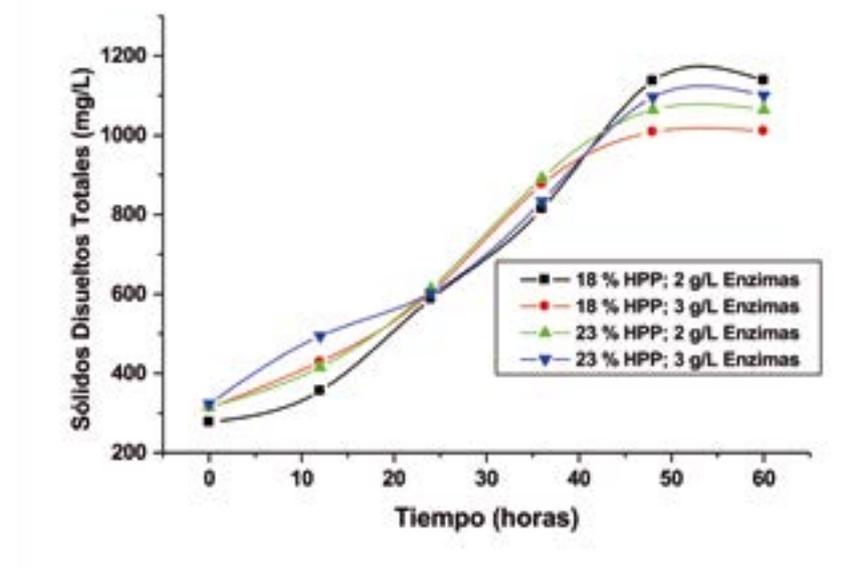


Figura 6. Incremento de los sólidos disueltos totales en el hidrolizado.

### Determinación del tiempo de retención de la hidrólisis enzimática

El tiempo de retención depende en gran medida del tamaño y la longitud del péptido, la composición de aminoácidos y la presencia de áreas hidrofóbicas (Reddy & Santosh, 2016). El tamaño de partícula es un factor importante debido que a menor tamaño de partícula, mayor área de ataque por parte de los microorganismos (Vidal, Christen, & Coello, 2000).

En la Figura 7 se muestran las concentraciones de Nitrógeno total obtenidas durante el proceso de hidrólisis enzimática. Puede apreciarse el incremento de nitrógeno total y por ende queratina, metabolito secundario de interés en la presente investigación, aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) hasta las 24 horas de hidrólisis enzimática, pasado ese tiempo inicia el incremento de nitrógeno amoniacal, el cual inhibe la hidrólisis enzimática.

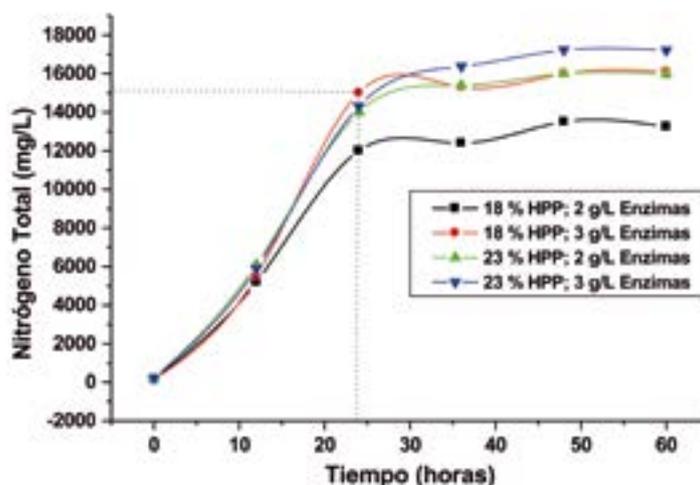


Figura 7. Incremento de la concentración de nitrógeno total en el hidrolizado

### Análisis de Varianza

Para determinar con exactitud el tiempo de retención hidráulico óptimo se realizó un análisis de varianza, cada doce (12) horas, tomando como referencia la producción de nitrógeno total. En la Tabla 4 se muestra el análisis de varianza del experimento.

Tabla 4. Análisis de varianza del experimento a las 24 horas de hidrólisis enzimática

Fuente	Media	Varianza	N
T1=18 % HPP; 2 g/L Enzimas	12000,04	1156,00	3
T2=18 % HPP; 3 g/L Enzimas	15000,07	14151,62	3
T3=23 % HPP; 2 g/L Enzimas	13999,91	9161,54	3
T4=23 % HPP; 3 g/L Enzimas	14300,66	79274,33	3
F = 191,55404			
p = 8,69751E-8			

Como muestra la Tabla 4, a las 24 horas de hidrólisis enzimática existió diferencia significativa en la producción de nitrógeno total, y por ende ese es el tiempo de retención hidráulico óptimo en la producción de queratina.

### III. CONCLUSIONES

Se determinó que la relación óptima de sustrato - enzima se consiguió en los tratamientos 1 (18 % harina de plumas de pollo; 2 g/L de enzima) y 2 (18 % harina de plumas de pollo; 3 g/L de enzima), los que alcanzaron los mayores porcentajes de hidrólisis de la harina de plumas de pollo (65,75 %), mientras de los tratamientos 3 (23 % harina de plumas de pollo; 2 g/L de enzima) y 4 (23 % harina de plumas de pollo; 3g/L de enzima) solo alcanzaron el 50,99 y 54,94 % respectivamente. La prueba de Tukey para la determinación de la relación óptima sustrato-enzima indicó que si existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos estudiados, el factor que influyó en la hidrólisis enzimática fue la concentración de harina de pluma de pollos, ya que a mayor concentración de proteína, mayor concentración de queratina en el hidrolizado.

El descenso de pH de los hidrolizados durante las primeras 24 horas, en los cuatro tratamientos,

indicaba que se estaba desarrollando con eficiencia el proceso. La concentración de oxígeno disuelto descendió significativamente ( $p < 0,05$ ) en los cuatro tratamientos, este fenómeno se le atribuye a que el *Bacillus subtilis*, es un microorganismo aerobio que comienza a consumir oxígeno y reproducir enzimas queratinas desde el inicio de la hidrólisis enzimática (Guo et al, 2016). La conductividad eléctrica en el hidrolizado ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) se incrementó en los cuatro tratamientos, lo cual tiene una relación directamente proporcional con el incremento de la concentración de los sólidos totales (Jablonska, Rybarczyk, & Lieder, 2016). (Brusasco, 2014) La concentración de sólidos disueltos totales se incrementó significativamente en los 4 tratamientos, llegando a estabilizarse a las 48 horas de hidrólisis enzimática, y al realizar la medición de este parámetro después de este tiempo no hubo incremento significativo ( $p > 0,05$ ).

En la presente investigación queda demostrado que es posible hidrolizar las plumas de pollo mediante hidrólisis enzimática. Durante el proceso de hidrólisis se produjo el incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de nitrógeno total y por ende la solubilidad de la queratina, metabolito secundario de interés en la presente investigación (Zaghoul et al, 2011). El estadístico Chi-cuadrado calculado para la prueba fue igual a 44,0. El valor de  $p$  fue inferior a 0,05, en conclusión se acepta la hipótesis alternativa: es posible la hidrólisis enzimática de las plumas de pollo.

#### IV. REFERENCIAS

- Cui, H., Li, W., Li, C., & Lin, L. (2016). Intelligent release of cinnamon oil from engineered proteoliposome via stimulation of *Bacillus cereus* protease. *Food Control*, 67, 68–74. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.036>
- Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., & Brandelli, A. (2011). International Biodeterioration & Biodegradation Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus sp.* P45. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 45–51. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.04.014>
- Granotec. (2006). Ficha técnica: Nutrición y Biotecnología para la salud. Granozyme 3, (4 C), 82.
- Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, I. H., Dahmen, I., & Nasri, M. (2011). Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochemistry*, 46(9), 1731–1737. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.023>
- Guo, X., Chen, D.-D., Peng, K.-S., Cui, Z.-W., Zhang, X.-J., Li, S., & Zhang, Y.-A. (2016). Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish & Shellfish Immunology*, 52, 74–84. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.017>
- Jablonska, M. A., Rybarczyk, M. K., & Lieder, M. (2016). Electricity generation from rapeseed straw hydrolysates using microbial fuel cells. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.062>
- Noureddine, L., Arnaud, C., Mathieu, S., Alain L., Jérôme, M. (2016). Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose: II. Case of insoluble substrate. *Chemical Engineering Science journal*, 1 (149)322–333
- Morocho, M., (2015). Diseño de un plan de administración ambiental para la granja avícola NUTRIVIT. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
- Pandian, S., Sundaram, J., & Panchatcharam, P. (2012). Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. *European Journal of Experimental Biology*, 2(1), 274–282.
- Rai, S. K., & Mukherjee, A. K. (2015). Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron-oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) magnetic nanoparticles coupled  $\beta$ -keratinase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1–13. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.002>
- Reddy, N., & Santosh, M. S. (2016). Recovery and Applications of Feather Proteins, 255–274. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4/00014-8>
- Vidal, L., Christen, P., & Coello, M. N. (2000). Feather degradation by *Kocuria rosea* in submerged culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(6), 551–

554. <http://doi.org/10.1023/A:1008976802181>  
Virginia, M., Cedillo, S., Rodrigo, W., & Altamirano, N. (2013). Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas. Químico-Farmacéutico. Universidad Central del Ecuador.
- Yusuf, I., Ahmad, S. A., Phang, L. Y., Syed, M. A., Shamaan, N. A., Abdul Khalil, K., ... Shukor, M. Y. (2016). Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-Alcaligenes sp. AQ05-001. *Journal of Environmental Management*, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.059>.
- Zaghloul, T. I., Embaby, A. M., & Elmahdy, A. R. (2011). Biodegradation of chicken feathers waste directed by Bacillus subtilis recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. *Bioresource Technology*, 102(3), 2387–2393. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.106>

## Serological test for *West Nile virus* in horses of Los Ríos, Ecuador

Roberto, Coello-Peralta<sup>1</sup>; Aslam, Díaz-Castillo<sup>1</sup>; Rosario, Zambrano-Bonilla<sup>2</sup>; Betty, Pazmiño-Gómez<sup>3</sup>; Lizán Ayol-Pérez<sup>3</sup>

### Abstract

The aim of this study was to determine the serological presence of *West Nile virus* (WNV) in horses of wetland "Abrás de Mantequilla", Los Ríos, Ecuador, during the rainy season of 2012. The samples received were selected according to the presence or absence of disease which belonged to horses in the study area. During the study, a total of 118 horses were examined by ELISA detection of IgG and IgM antibodies. The incidence was 36.44% and the prevalence was 33.05%. The highest incidence occurred at the Mapancillo (28%) locality and the lowest was in La Luz (13%). Age distribution was: 1-5 years (32.55%); 6-10 years (27.91%); 11-15 years (23.26%); 16-20 years (16.28%). The 53.48% of the infected animals were males and 46.52% were female. All animals were criollos mixed race. The presence of WNV was demonstrated through the detection of IgG and IgM antibodies in blood serum of horses at the wetlands "Abrás de Mantequilla" Los Ríos, Ecuador.

**Keywords:** *West Nile virus*; ELISA IgG and IgM; equines.

## Prueba serológica para el virus del *Nilo Occidental* en los caballos de Los Ríos, Ecuador

### Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia serológica del virus del *Nilo Occidental* (VNO) en los caballos de los humedales "Abrás de Mantequilla", Los Ríos, Ecuador, durante la temporada de lluvias del 2012. Las muestras analizadas fueron registradas de acuerdo a la presencia o ausencia de enfermedad y que pertenecía a los caballos en el área de estudio. Durante el estudio, un total de 118 caballos se examinaron por ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM. La incidencia fue del 36,44% y la prevalencia fue del 33,05%. La incidencia más alta se produjo en la localidad Mapancillo (28%) y la más baja fue en La Luz (13%). La distribución por edad fue: 1-5 años (32,55%); 6-10 años (27,91%); 11-15 años (23,26%); 16-20 años (16,28%). El 53,48% de los animales infectados eran machos y 46,52% hembras. Todos los animales fueron de raza mixta-criolla. La presencia indirecta del virus, se demostró a través de la detección de anticuerpos IgG e IgM en el suero sanguíneo de los caballos en los humedales "Abrás de Mantequilla" Los Ríos, Ecuador.

**Palabras Clave:** virus del *Nilo Occidental*; ELISA IgG e IgM; equinos.

**Recibido:** 25 de mayo de 2016

**Aceptado:** 4 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Docente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guayaquil, Ecuador. Avenida Kennedy y Delta, Guayas, Ecuador. rdcoello1218@hotmail.com

<sup>2</sup>Docente de la Facultad de Medicina, Universidad de Guayaquil, Ecuador. rzdedavila@hotmail.com

<sup>3</sup>Docente de la Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Estatal de Milagro, Ecuador. bpazminog@unemi.edu.ec; layolp@unemi.edu.ec

## I. INTRODUCCIÓN

*West Nile fever* (FON) is caused by the West Nile virus (WNV) genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. FON is an emerging infectious zoonoses. The birds are amplifying hosts and biological vector is *Culex* mosquito. However, other sorts and even mosquito, ticks transmit it. Susceptible hosts are human and equine. Mammals such as cats, dogs, goats, sheep, pigs, cows, rabbits, squirrels, bats, lemurs and rodents can also become infected (Valles and Sánchez 2000 and Burgueño et al. 2013).

WNV was detected in the Western Hemisphere in August 1999, when an epidemic occurred in the city of New York. WNV is enzootic in eastern and southeastern United States, today. Because of the migratory patterns of birds in America, this problem has spread to several countries in a short time (CDC 199 and CDC 2000). FON involves American countries: Canada, Cayman Islands, USA, Guadeloupe, Dominican Republic, Bahamas, Puerto Rico, Cuba, Jamaica, Haiti, French West Indies, Brazil, Colombia, Trinidad and Tobago, El Salvador, Costa Rica, Guatemala, Mexico, Venezuela and Argentina (Soler and Vera 2007 and Díaz et al. 2011). Coello et al. (2011) serological evidence was found against WNV from 2007 to 2009 in horses of Los Rios, Ecuador. This area is a migration route of birds from North America.

The aim of this research was to demonstrate the presence of WNV in Los Rios, Ecuador, through a serological study of antibodies in horses.

## II. DESARROLLO

### 1. Methodology

#### Materials and methods

Location: wetlands "Abrás de Mantequilla" is located in the municipalities of Vinces, Pueblo Viejo and Baba, in the province of Los Ríos, Ecuador. Sampling period: February and June of 2012. Type of research: panel and longitudinal. Population and sample: the population was 506 horses and the sample was 118 animals (36.87%). The locations studied in the wetland "Abrás de Mantequilla" were: La Piedad, La Luz, Los Playones, Mapancillo and Jobo.

Sampling methodology: blood sampling was performed with the consent of the owners, in the

early hours of the morning. Biosafety standards (cleaning and bath investigator, appropriate clothing, insect repellent and cold boxes) were met. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes to separate blood serum. The serum was stored at -20 °C for further analysis in the area of Virology, in the National Institute of Hygiene and Tropical Medicine "Leopoldo Perez Izquieta". ELISA method was used to detect specific antibodies (IgM and IgG) against WNV, according to the protocols of the World Health Organization (WHO) and Pan American Health Organization (PAHO) and the Center for Control and Prevention (CDC) (PAHO-WHO-CDC 2003) and World Organization for Animal Health (OIE 2013). Reactive serum it was considered positive by the ELISA test and used the conjugate HRP6B6C1-CDC. (OMS/OPS/CDC, 2013). Incidence was calculated as the quotient of positive animals in February, among the total sample, multiplied by one hundred percent. Prevalence was calculated as the quotient of positive animals in June, among the total sample, multiplied by one hundred percent. The animals were classified by age ranges 5 years, sex, and race.

Statistical analysis: data were analyzed by SAS software (Statistical Analysis System), version 9.3 (2013) to evaluate descriptive statistics (mean and standard deviation) and multiple range test of Tukey was used for comparison of averages, with the determining standard error (SE) and the probability value (p), in the analysis of variance (ANOVA).

### 2. Results and discussion

The incidence of WNV had a decreasing trend between the blood serum samples at the beginning and end of the rainy season (Table 1) in 118 horses. IgG antibodies were reduced by 6.78% and IgM antibodies were reduced by 3.39% in animals that were sampled in the wetland "Abrás de Mantequilla", Los Rios, Ecuador. The total positive animals, including two samples of blood serum was 33.05%. The incidence was of 36.44%. The prevalence was 33.05%.

**Table 1. Serology incidence of WNV in beginning and ending rainy season.**

Antibodies		IgG	IgM	Positive total	I	II
February, beginning	Absolute value	43	22	43	22	22
	Relative value (%)	36.44	18.64	36.44	18.64	18.64
June, ending	Absolute value	35	18	39	15	14
	Relative value (%)	29.66	15.25	33.05	12.71	11.86
Diference	Absolute value	8	4	4	7	8
	Relative value (%)	6.78	3.39	3.39	5.93	6.78

I: how many of the animals that were positive for IgG antibodies were also positive for IgM  
 II: how many of the animals that were positive for IgM antibodies were also positive for IgG

The results match those of CDC (1999) which determined that the presence of IgG and IgM is an effective method to detect the presence of WNV serological. This technique has been used in USA and Canada since 1999. The serological evaluation has been an effective indirect evidence, to detect the movement of the pathogen, since WNV has spread to other countries in the Americas (Mattar et al. 2005). Mattar et al. (2005), Diaz et al. (2011) and Lindsey (2011) also reported serological evidence of infection in horses and other species in different countries of the Americas.

Human infections by WNV have been reported in the USA, Cuba, and Argentina, in relation to infected horses (Soler and Vera, 2007 and CDC 2013). This disease has a high rate of incidence and prevalence in the USA, where up to November 2013, there had been 39,557 positive cases of encephalitis (CDC 2013) and 1668 people had died from WNV (CDC 2013). In this investigation, it was also found a high incidence and prevalence of WNV.

In this research, only two horses show clinical symptoms of the disease, but it was failed to isolate the virus. However, in some South American countries like Argentina, WNV has been isolated in equine brain (Morales 2006), with symptoms of the disease. The relative distribution of positive cases in the first sampling localities in the first rains in February showed that more animals were found in Mapancillo (26%); followed by Los Playones (23%), Jobo (21%), La Piedad (16%) and La Luz (14%).

In the sampling at the end of the rainy season in June, the largest number of positive cases were again presented in Mapancillo (28%); followed by Los Playones and Jobo, both with 23%; and La Piedad and La Luz, in the two locations with 13%. The areas studied are routes of migratory birds from North America to Ecuador. This is a risk factor for the transmission of various types of

microorganisms in the wetland "Abrás de Mantequilla" including WNV. Soler and Vera (2007), Diaz (2008) and Vasquez (2010) demonstrated that birds are multiplier hosts of WNV amplifiers. Migratory birds that come with WNV may influence the development of the transmission to other susceptible species including horses and humans as in wetlands like this, where they are so abundant.

Seropositive samples for IgG and IgM antibodies had the following age distribution: 1-5 years (32.55%); 6-10 years (27.91%); 11-15 years (23.26%); 16-20 years (16.28%). The 53.48% of the infected animals were males and 46.52% were female. All animals were criollos mixed race. IgG antibodies indicate past infections. The serological examination showed that the infection is recent. This is because the presence of IgM antibodies can be detected only up to 500 days after infection. This could indicate that the entry of the virus into the country is activated by the migratory birds. However, studies are needed in other wetlands in the country, to confirm the finding. This exploratory study allows to demonstrate the serological evidence of WNV circulation in Ecuador. The results of this work could enable health authorities to strengthen epidemiological surveillance systems in Ecuador.

**III. CONCLUSIONS**

The presence of WNV was demonstrated through the detection of IgG and IgM antibodies in blood serum of horses, in the wetlands "Abrás de Mantequilla" Los Rios, Ecuador. The incidence was of 36.44%. The prevalence was 33.05%. The highest incidence occurs in Mapancillo (28%) locality and the lowest was in La Luz (13%). Age distribution were: 1-5 years (32.55%); 6-10 years (27.91%); 11-15 years (23.26%); 16-20 years (16.28%). The

53.48% of the infected animals were males and 46.52% were females.

#### IV. REFERENCES

- Blitvich B, Bowen R, Marlenee N, Hall R, Bunning M, Beaty B. (2003). Epitope-blocking enzyme linked immunosorbent assay for detection of West Nile Virus antibodies in domestic mammals. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (1): 2676-79.
- Blitvich B, Marlenee N, Hall R, Calisher Ch, Bowen R, Roering S. (2003). Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (39): 1041-1046.
- Burgueño A, Spinsanti L, Díaz L, Rivarola M, Arbiza J, Contigiani M, Delfraro A. (2013). Seroprevalence of St. Louis Encephalitis virus and West Nile virus (*Flavivirus, Flaviviridae*) in horses, Uruguay. *Bio. Med. Research International*. 1-5
- CDC (1999). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of West Nile like viral encephalitis New York US. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 48: 845-849.
- CDC (2000). Centers for Disease Control and Prevention. Update: *West Nile* virus activity-Eastern United States. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 49: 1044-1047.
- CDC (2013). West Nile virus disease cases reported to CDC by state, 1999-2013. ArboNET, Arboviral Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC (2013). West Nile virus disease cases and deaths reported to CDC by year and clinical presentation, 1999-2013. ArboNET, Arboviral Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention.
- Coello R., Mosquera C. and González M. (2011). Presencia del virus del *Nilo Occidental* en equinos (*Equus caballus*) de dos humedales de la provincia de los Ríos. Universidad de Guayaquil, año 2007 al 2009. *Rev. Universidad de Guayaquil*, 111: 15-18.
- Díaz L, Quaglia A, Flores F, Contigiani M. (2011). Virus *West Nile* en Argentina: un agente infeccioso emergente que plantea nuevos desafíos. *Hornero*, 26: 1-12.
- Díaz L. 2008. *West Nile* virus in birds, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (4): 689-691.
- Lindsey N. 2011. *West Nile* virus disease and other arboviral diseases United States. *CDC*, 60 (30): 1009-1013.
- Mattar S, Edwards E, Laguado J. (2005). West Nile virus in Colombian horses. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (9): 1497-1498.
- Morales M, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia J, Vissani A and Trono K. 2006. *West Nile* virus isolation from equines. *Emerging infectious diseases* 12 (10): 1559-1561.
- Morales M. (2013). West Nile virus ecology in a tropical ecosystem in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 88 (1): 116-26.
- OPS-OMS-CDC (2003). Taller de vigilancia y diagnóstico del virus del *Nilo Occidental*.
- Organización Mundial de Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS) and Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Pergamino, Argentina. 50p.
- OIE (2013)G. *West Nile* virus. Organización Mundial de Salud Animal. EUA. 12p.
- Rivera O. and Dan M. (2002). Fiebre del *Nilo del Oeste* (*West Nile Fever*): una nueva amenaza de los viejos continentes. *Rev. Med. Hond*, 70 (4): 194-7.
- Soler D. and Vera J. (2007). Intento de Detección del Virus del *Oeste del Nilo* en aves silvestres de San Andrés Isla. Universidad Nacional de Colombia. Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre. Bogotá, Colombia. Reporte técnico, 111p.
- Téllez I., Calderón O., Franco-Paredes C. and Del Río C. (2006). El virus del *Oeste del Nilo*: una realidad en México. *Medigraphic. Méd. Mex*, 142 (6): 493-8.
- Valles X and Sánchez F. (2000). *West Nile* virus: el virus de la fiebre del *Oeste del Nilo*. *Enfermedades Emergentes*, 2 (4): 232-238.
- Vázquez A. (2010). Búsqueda de *Flavivirus* en Mosquitos de Humedales Españoles: Análisis Moleculares del virus *West Nile* y otros *Flavivirus*. Universidad Complutense de Madrid. España, Tesis Doctoral, 93p.

# Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp*

Valeria, Barcia-Castilla<sup>1</sup>; Sunny, Sánchez-Giler<sup>2</sup>

## Resumen

La meningitis por *Cryptococcus spp* es un grave problema de salud pública en pacientes VIH +, por lo cual se determinó la utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para esta infección. Se obtuvieron los datos del líquido cefalorraquídeo de 252 pacientes VIH positivos admitidos de mayo a octubre del 2014 en el Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador. Los análisis se realizaron por cultivo y tinta china en 81 pacientes, cuyos resultados de sensibilidad y valor predictivo negativo fueron 80% y 93,55% respectivamente. Como conclusión se consideró la tinta china como una prueba de tamizaje relativamente buena por su buen valor predictivo negativo pero medianamente buen valor sensitivo.

**Palabras Clave:** *Cryptococcus spp*; meningitis criptocócica; prueba de tamizaje, VIH.

## Utility of indian ink as screening for meningitis by *Cryptococcus spp*

### Abstract

Meningitis by *Cryptococcus spp* is a serious public health problem in HIV + patients, therefore the Indian ink utility as screening test for this infection was determined. Cerebrospinal fluid data of 252 HIV + patients admitted from May to October 2014 at the Hospital de Infectología de Guayaquil was collected. Analysis from this cerebrospinal fluid was performed by Indian ink and culture in 81 patients, whose sensibility and negative predictive value were 80% and 93,55%, respectively. As conclusion the Indian ink was considered a relatively good screening test because of its good negative predictive value but moderately good sensibility.

**Keywords:** cryptococcal meningitis; screening test; HIV.; screening test; *Cryptococcus spp*.

**Recibido:** 20 de octubre de 2015

**Aceptado:** 1 de junio de 2016

<sup>1</sup>Estudiante de Medicina de la Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador. vmbarcia@uees.edu.ec

<sup>2</sup>Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador. sunsanchez@uees.edu.ec

**I. INTRODUCCIÓN**

Los *Cryptococcus spp* son basidiomicetos saprofiticos encapsulados identificados por Sanfelice en 1894 (Sloan, 2014). El *C. neoformans* serotipo A: *neoformans* causa el 30% de las meningitis en pacientes VIH positivo en Europa del norte (Sloan, 2014) y es el responsable del 85% de meningitis en Latinoamérica, de las cuales el 80% son pacientes VIH positivo (Sifuentes-Osornio, 2012).

*C. neoformans neoformans* causa enfermedades en pacientes inmunosuprimidos, mientras que *C. neoformans gattii* afecta preferentemente a los inmunocompetentes (Lizarazo, 2014). Encontrándose la meningitis por *Cryptococcus neoformans neoformans* no sólo en pacientes VIH+, sino también en pacientes inmunosuprimidos (Revest, 2006).

Se documentó que el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) afectó a 3438 ecuatorianos en el 2011, encontrándose el 58,24% de ellos en la provincia del Guayas (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2011) cuya capital es Guayaquil, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Casos notificados de VIH por sexo y edad Ecuador 2011**

Grupo etáreo	Hombre	Mujer	Total
< 1	2	0	2
1-4	72	70	142
5-9	13	15	28
10-14	9	7	16
15-19	81	70	151
20-24	253	161	414
25-29	285	164	449
30-34	251	132	384
35-39	173	87	260
40-44	121	62	183
45-49	84	34	118
50-54	66	20	86
55-59	40	16	56
60-64	24	8	32
65+	39	65	45
Sin datos			1.072
Total	1.514	852	3.438

Fuente: MSP, 2015

Según Schwab (1999) más de la mitad de los pacientes con VIH presentan síntomas neurológicos a lo largo de su enfermedad. Además, se ha encontrado que en el 60% de los pacientes este episodio clínico meníngeo es con el que debuta su infección por el VIH (Sifuentes-Osornio, 2012). En Estados Unidos la incidencia está alrededor del 10% y en el mundo el 90% de los síntomas neurológicos en estos pacientes se deben a este hongo (Brockmeyer, 1997).

La meningitis por *Cryptococcus spp.* es una infección oportunista que afecta a casi un millón de individuos, causando más de 500.000 muertes cada año y es la cuarta causa más común de infecciones graves en pacientes VIH positivo (Dominic, 2009). La presentación clínica en pacientes VIH positivo más común es la meningoencefalitis. La duración de las manifestaciones clínicas, tales como jaqueca subaguda y confusión pueden variar desde unos pocos meses hasta veinte años. De acuerdo con estudios realizados por Chiang y otros (2011), la cuarta enfermedad más prevalente en el Hospital de Infectología de Guayaquil es la criptococosis diseminada, precedida por la toxoplasmosis cerebral.

Esta infección es fatal si no es diagnosticada y tratada a tiempo y aunque fuese revertida exitosamente podría dejar graves secuelas neurológicas, entre las que se destacan ceguera e hidrocefalia (Sloan, 2014). Siendo oftálmicas muchas de las complicaciones de estos pacientes. Pudiéndose presentar además de la ceguera; diplopía binocular, parálisis del nervio abducens ya sea monocular o binocular, papiledema, hemorragias peripapilares, atrofia óptica, coroiditis multifocal, retinitis por citomegalovirus entre otros (Mao, 2015). Es por esto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda hacer pruebas de tamizaje de infecciones criptocócicas a pacientes VIH positivo con recuento de  $CD4 \leq 100/\mu L$ .

Para que una prueba de tamizaje sea eficiente se necesita que tenga una alta sensibilidad, que sea barata y que tenga un alto valor predictivo negativo. La prueba por tinta china (TCH) como tamizaje es barata y solo se necesita que el personal de laboratorio sepa reconocer levaduras encapsuladas en el microscopio. En este trabajo de investigación se busca determinar estos parámetros para poder establecer su calidad como prueba de tamizaje en Guayaquil.

A pesar de que el cultivo (CM) es el estándar de oro para el diagnóstico, su realización es costosa y

requiere de equipamiento e infraestructura, además de la cantidad de tiempo de espera para el resultado del cultivo (alrededor de las 48 horas), que en comparación con métodos de tinta china (TCH), aglutinación por látex (AL) y flujo lateral (FL), es demasiado largo.

El objetivo general de esta investigación es determinar si la prueba de tinta china es una eficiente prueba de tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp*, mientras que otros objetivos secundarios son identificar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de tinta china. Además, se busca definir la correlación entre los resultados de la TCH y el cultivo y comparar valores con otros métodos de tamizaje.

Con esta investigación se espera un aporte social a fin de crear una cultura de realización de pruebas de tamizaje por cualquier método recomendado en pacientes VIH con recuento de CD4  $\leq 100/\mu\text{L}$ . Se tiene como meta que con la información obtenida sobre la utilidad de la TCH como prueba de tamizaje, las autoridades sanitarias tomen decisiones a nivel hospitalario a fin de utilizar la prueba de TCH en comparación con otros métodos para lograr hacer un diagnóstico y tratamiento temprano y así conseguir evitar consecuentes secuelas.

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

Este estudio es de tipo no experimental, ya que no se manipuló ninguna variable, descriptiva, transversal, cualitativa, observacional, analítica y retrospectiva, por lo

que no necesita un diseño muestral. Los instrumentos de investigación fueron las fichas de laboratorio obtenidas en el Hospital de Infectología, a partir de las cuales se creó una base de datos en Excel, donde los datos fueron posteriormente tabulados y debidamente divididos.

El universo del estudio consta de 252 líquidos cefalorraquídeos (LCR) tomados de pacientes admitidos al Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador, de mayo a octubre de 2014. Los criterios de inclusión fueron; pacientes diagnosticados con síndrome meníngeo por sus doctores, mayores de 18 años, que no estén tomando antimicóticos y que sean VIH + por dos pruebas de ELISA positiva o una de Western Blot.

La muestra de LCR se fijó en una placa con dos gotas de tinta china. 5 minutos después se observó a 10x y 40x en el microscopio. Para que una prueba de TCH sea positiva, debía diferenciarse en el microscopio una forma levaduriforme con cápsula. Si no se encontraba, era tomado como negativo. Los cultivos en los que se estudiaban las muestras de LCR eran agar MacConkey, agar Löwenstein-Jensen, agar sangre y agar Sabouraud, siendo este incubado a 37°C y 25-27°C y para que estos sean positivos, se esperaron de 72 a 96 horas máximo.

Las variables estimadas una vez analizados los datos recolectados fueron prevalencia de meningitis por TCH y por cultivo, especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. En la Tabla 2 se muestran las fórmulas utilizadas para determinar las variables.

**Tabla 2. Fórmulas para determinar variables**

TCH	E	S	VPP	VPN
F	$= \frac{VN \times 100}{TS}$	$= \frac{VP \times 100}{TE}$	$= \frac{VP \times 100}{TP}$	$= \frac{VN \times 100}{TN}$

**Leyenda:** F: fórmula; R: resultado; E: especificidad; S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; P: prevalencia, VN: verdaderos negativos; TS: total sanos; VP: verdaderos positivos; TE: total enfermos; TP: total positivos; TN: total negativos

### 2. Resultados

De este universo de 252 LCR, 130 fueron estudiados por ambos métodos. El 91,54% (119) de los pacientes estudiados solo por cultivo fue negativo, el 8,46% (11) positivo. El 92,68% (38) de los pacientes estudiados solo por TCH fueron negativos y el 7,32% (3) positivos. De los 81 LCR estudiados por ambos métodos, el 71,6% (58) de los pacientes fueron hombres, mientras que el 28,4% (23) fueron mujeres, como se muestra en la Tabla 3. Además, el 71,6% (58) fue negativo para ambos y el

19,75% positivo (16). Solo 3 fueron positivos por TCH y negativos por cultivo y 4 negativos por TCH y positivos por cultivo, tal y como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 3. División de muestra por género de pacientes**

	Número	Porcentaje (%)
<b>Hombres</b>	58	71,6%
<b>Mujeres</b>	23	28,4%

**Tabla 4. División de métodos de diagnóstico del universo de pacientes con síndrome meningeo**

Un método: 171			
Solo TCH: 41		Solo CM: 130	
+ 3	- 38	+ 11	- 119
Dos métodos: 81			
TCH y CM		TCH + CM -	TCH - CM +
+ 16	- 58	3	4

Los números obtenidos al tabular la información se muestran agrupados en una tabla de 2x2 (Tabla 5) bajo criterios que se aplican a las fórmulas de especificidad, sensibilidad, valor predictivo negativo (VPN) y valor predictivo positivo (VPP), arrojados en la Tabla 6.

**Tabla 5. Resultados de prueba diagnóstica de TCH a grupos conocidos + (enfermos) y - (sanos) por CM**

CRY			
TCH	+ presencia enfermedad	- ausencia enfermedad	Total
+	VP	FP	TP
	16	3	19
-	FN	VN	TN
	4	58	62
<b>Total</b>	TE	TS	<b>81</b>
	20	61	(muestra)

**Leyenda:** CRY *Cryptococcus* VP verdaderos positivos, FP falsos positivos, FN falsos negativos, VN verdaderos negativos, TE total enfermos, TS total sanos, TP total positivos, TN total negativos.

**Tabla 6. Resultados según técnicas de TCH y CM**

TCH	E	S	VPP	VPN
R	95,02%	80%	84,21%	93,55%

**Leyenda:** F: fórmula; R: resultado; E: especificidad; S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Conociendo ya que la TCH es una prueba de bajo costo, se opta por determinar la sensibilidad y el valor predictivo negativo, para entonces establecerla como una eficaz prueba de tamizaje si tuviese estas tres características. Además, se calcularon los valores de sensibilidad y valor predictivo positivo (VPP) aplicando las fórmulas mostradas en la Tabla 2. La sensibilidad fue 80% y el VPN fue 98,438%.

### Análisis y Discusión de Resultados

En estudios previos se ha hablado de la sensibilidad de la TCH (Wang, 2015), que ha sido parecida a la obtenida

en esta investigación (73,2% vs 80%), a pesar de que las técnicas y los encargados de la técnica varían dependiendo del país y hospital. Comparando otros valores de la prueba de la TCH con la inmunocromatografía: flujo lateral, con la aglutinación por látex y con el cultivo, se encuentra que la prevalencia por aglutinación en látex en pacientes con CD4 menor a 100 es baja; entre 3,5% y 5% (Chipungu, 2015). Mientras que la prevalencia de las 81 muestras en este estudio con TCH fue de 23,45% y con cultivo fue de 24,7% pero a pesar de que el cultivo es el estándar de oro, este tiene 69,9% de sensibilidad, en comparación con el test de aglutinación en látex: 91,1% y TCH 73,2%. Aun así, la especificidad de la aglutinación en látex es del 96%, en comparación con 100% de TCH y cultivo (Wang, 2015).

Por un lado se podría asegurar que la TCH es una prueba eficaz como tamizaje para pacientes VIH +, pues su sensibilidad es alta pero tanto el cultivo como la TCH son bastante específicos, a pesar de que toman más tiempo y dedicación en realizarse. Por otro lado, la aglutinación en látex es más rápida, fácil, específica y más importante sensible en comparación con estos otros dos métodos convencionales (Dominic, 2009) pero se recomienda más bien el uso de la prueba de inmunocromatografía de flujo lateral CrAg como tamizaje en pacientes VIH + con recuento de CD4  $\leq 100/\mu\text{L}$ , pues el costo-beneficio es justo. En este estudio, también se recomienda el uso de la inmunocromatografía, pero no sin antes recomendar también rigurosos estudios comparativos de flujo lateral, TCH, cultivo y aglutinación en látex en Ecuador, ya que existen falsos negativos en el cultivo - lo cual podría ser a causa del tratamiento que sobrelleva el paciente en el momento de la toma de la muestra (Dominic, 2009) - y también por los falsos positivos presentados en la aglutinación por látex cuando hay infecciones por *Trichosporon beigelii* y bacilos DF-2 (bacilo fermentador disgónico 2, un bacilo gramnegativo) (Dominic, 2009).

### III. CONCLUSIONES

Los valores expuestos por la prueba de TCH en este estudio y comparando con otros sobre la misma técnica han sido altos al referirse a la sensibilidad pero medianamente altos en cuanto al valor predictivo negativo. Es por esto que se puede considerar una prueba de tamizaje buena, más no excelente, pues

la sensibilidad del 80% podría dejar escapar algunas muestras positivas.

Como futura investigación en Ecuador se deberían realizar estudios con otras pruebas de tamizaje como flujo lateral o aglutinación en látex, pues así se determinaría finalmente cuál es la mejor prueba a utilizar en este país y se marcaría un cambio drástico en el modus operandi de los hospitales y así también en el pronóstico de los pacientes, que depende del rápido y eficaz diagnóstico de esta infección.

#### IV. REFERENCIAS

- Arias, B. G. (2011). Cryptococcosis meníngeo: características clínicas y de laboratorio. *Acta Neurología Colombia*, 27(1), 19-27.
- Brockmeyer, N. (1997). HIV-Infektion. Berlin: Springer
- Chiang, H., & Tettamanti, D. (2011). Tinta china en orina como método de diagnóstico en criptococcosis diseminada asociado a VIH/SIDA. Estudio transversal realizado en el hospital de infectología "José Rodríguez M." durante el año 2009. *Revista de Medicina de la UCSG*, 16(2), 116-23.
- Chipungu, C. (2015, Julio 2). Feasibility and Acceptability of Cryptococcal Antigen Screening and Prevalence of Cryptocococemia in Patients Attending a Resource-Limited HIV/AIDS Clinic in Malawi. *Journal of International Association AIDS care*.
- Dominic, R. S. (2009). Diagnostic Value of Latex Agglutination in Cryptococcal Meningitis. *J Lab Physicians*, 1(2), 67-68.
- Lizarazo, J., & Escandón, P. (2014). Retrospective Study of the Epidemiology and Clinical Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infections in Colombia from 1997–2011. *Neglected Tropical Diseases*, N/A (N/A).
- Mao, F. (2015). Ophthalmic manifestations in acquired immune deficiency syndrome patients with cryptococcal meningitis. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 51(5), 364-8.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2011). *VIH/Sida e Infecciones de Transmisión Sexual en Ecuador*. Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Ministerio de Salud Pública. (2015, Agosto 14). Ministerio de Salud Pública. Retrieved from <http://www.salud.gob.ec>
- MW, T. (2015, Enero). The cryptococcal antigen lateral flow assay: A point-of-care diagnostic at an opportune time. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-9.
- Revest, M. (2006). Infections à cryptocoque chez des patients non VIH. À propos de quatre cas et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 27(3), 203-8.
- Schwab, S., & D., K. (1999). *Neurologische Intensivmedizin*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sifuentes-Osornio, J. (2012). Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*, 6, 23-34.
- Sloan, D. (2014). Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, 6, 169-82.
- Trombetta, L., & Amadeo, J. B. (2010). Diagnóstico de criptococcosis a partir de lesiones cutáneas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44 (1), 33-6.
- Wang, H. (2015). Latex agglutination: diagnose the early cryptococcus neoformans test of capsular polysaccharide antigen. *Pak J Pharm*, 1 (1), 307-11.

#### Agradecimientos

Al Dr. Washington Alemán por su asesoría académica, a María Paula Wills, Gianna Espinoza, Steven Montesdeoca, Héctor Sotomayor, y Roberto Santos por su colaboración en la recolección de datos que hicieron posible este trabajo. Además, al personal de laboratorio del Hospital de Infectología de Guayaquil por su predisposición para la obtención de datos

# Comportamiento de variedades cubanas y venezolanas de frijol común, cultivados en condiciones de sequía

Amalia, Domínguez-Suárez<sup>1</sup>; Yordany, Martínez-Dávalo<sup>2</sup>; Yunel, Pérez-Hernández<sup>3</sup>; Leticia, Fuentes-Alfonso<sup>4</sup>; Rodolfo, Darias-Rodríguez<sup>5</sup>; Maryla, Sosa-del Castillo<sup>6</sup>; Ramón, Rea-Suárez<sup>7</sup>; Daynet, Sosa-del Castillo<sup>8</sup>

## Resumen

En la mayoría de las zonas productoras de frijol común los rendimientos potenciales nunca son alcanzados, se debe a que esta leguminosa se cultiva en condiciones climáticas poco favorables. La identificación de variedades con buenos rendimientos, bajo condiciones de sequía, es todo un desafío. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar los indicadores productivos de cultivares de frijol común, en condiciones de sequía, en la Empresa Socialista Mixta Leguminosa del ALBA, en la zona de Urachiche, estado de Yaracuy, Venezuela. Todas las semillas utilizadas fueron evaluadas previamente en condiciones de sequía experimental y seleccionadas las más tolerantes. Se usó un diseño en bloque al azar con tres repeticiones y la siembra se hizo en tres hileras de 7 m de largo x 0,80 m de ancho, con una densidad de 357 semillas por variedad, por repetición. En el momento de la cosecha se determinó el peso promedio por parcela, número promedio de vainas por plantas, número promedio de semillas por vaina y el peso de cien semillas. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat versión 2011. Entre los genotipos venezolanos evaluados sobresalen por su rendimiento el Gen 15, Tacarigua y Gen 13. De los cultivares cubanos seleccionados sobresalen Bolita 42 y BAT 304.

**Palabras Clave:** frijol común; indicadores productivos; *Phaseolus vulgaris L.*; sequía.

## Yield of Cubans and Venezuelan genotypes of common bean, grown in drought conditions

### Abstract

In the majority of common-bean productive zones, the potential yields are never reached. This is because common bean is cultivated under non favorable climatic conditions. The identification of varieties with good yields, under conditions of drought, is all a challenge. For that purpose, the aim of the present work was to evaluate productive cultivar's indicators of common bean, in conditions of drought, at the "Empresa Socialista Mixta Leguminosas del ALBA" at Urachiche's zone, Yaracuy's state, Venezuela. All used seeds were previously evaluated in conditions of experimental drought, and the more tolerant candidates were detected. An in-bloc at random design with three repetitions was used, and planting was made in three rows of 7 m in length x 0.80 m in width, with a density of 357 seeds per variety, for repetition. The average weight per plot of land, average number of pods per plants, average number of seeds per pod, and the weight of one hundred seeds were determined upon harvest. The statistical analysis was carried out using InfoStat version 2011. Among the Venezuelan evaluated genotypes, Gen 13, Gen 15 and Tacarigua stand out for their yields. Among the Cuban selected cultivars, Bolita 42 and BAT 304 showed the best results.

**Keywords:** common bean; productive indicators; *Phaseolus vulgaris L.*; drought.

**Recibido:** 2 de agosto de 2016

**Aceptado:** 9 de septiembre de 2016

<sup>1</sup>Profesor Titular. Dr. en Ciencias de la Salud. Licenciada en Bioquímica. Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas, Cuba. amalia.dominguez@umcc.cu

<sup>2</sup>Ingeniera Agrónoma de la Facultad de Agronomía, especialista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas, Cuba. Yordanis.martinez@umcc.cu

<sup>3</sup>Profesor Auxiliar, Licenciado en Biología. Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas, Cuba. yunel.perez@umcc.cu

<sup>4</sup>Profesor Auxiliar, Dr en Ciencias Biológicas. Vice rectora docente de la Universidad de Matanzas, Cuba. leticia.fuentes@umcc.cu

<sup>5</sup>Profesor Auxiliar, Máster en Ciencias del Medio Ambiente. Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas, Cuba. rodolfo.darias@umcc.cu

<sup>6</sup>Profesor Asistente, Ingeniera Agrónoma, Máster en Ciencias Agrícolas. Investigador del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas, Cuba. maryla.sosa@umcc.cu

<sup>7</sup>Ingeniero Agrónomo, Dr. en Ciencias Agrícolas. Investigador Titular. Centro de Biotecnología de las Plantas del Instituto de Estudios Avanzados de Venezuela (IDEA). rrea@idea.gob.ve

<sup>8</sup>Ingeniera Agrónoma. Profesor Titular. CIBE, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador. UNEMI, Universidad Estatal de Milagro, Cdla. Universitaria Km. 1.5 vía Milagro Km. 26, Ecuador. daynet.sosa@gmail.com

## I. INTRODUCCIÓN

En América Latina el frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.), ha sido plantado tradicionalmente, encontrándose entre los cultivares más importantes no sólo por su alto valor nutricional sino también por su elevado consumo en la población, pero son varios los factores que influyen negativamente sobre su cultivo, dentro de ellos la sequía, la cual se incrementa cada vez más como consecuencia del cambio climático (Beebe, Rao, Cajiao & Grajales, 2008). La sequía conjuntamente con la salinidad de los suelos, constituye un grave problema que afecta el rendimiento de los cultivos y la sostenibilidad de la agricultura (Apáez-Barrios, Escalante-Estrada & Rodríguez-González, 2011). Cerca del 10 % de la superficie del planeta está afectada por esta forma de estrés y muchas hectáreas de tierras constantemente son abandonadas por esta causa (Frahm, Rosas, Mayek-Pérez, & López-Salinas, 2004).

Un estrés severo de sequía induce numerosas irregularidades metabólicas en las plantas, tales como, disminución de la tasa de crecimiento (Domínguez, Mita, Alemán, Pérez, Sosa & Fuente, 2012; Nieto-Garibay et al., 2010). Reducción en la capacidad de intercambio gaseoso, pérdida de turgencia y síntesis de algunos metabolitos secundarios (Alemán, 2010). Estas alteraciones y su impacto en la morfología y fisiología de las plantas, van a depender del grado de tolerancia de los tejidos a la deshidratación, principalmente en las hojas. (Gholami, Rahemi & Kholdebarin, 2010).

Es por ello que se han realizado significativos esfuerzos de investigación, en especial en las tres últimas décadas, para mejorar la adaptación del frijol común a la sequía, estos esfuerzos incluyen: estudios de los efectos de la sequía en el desarrollo de la planta, desarrollo de métodos de evaluación en campo, evaluación e identificación de germoplasma tolerante y evaluación de características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas relacionadas a la adaptación de la sequía (Domínguez, Mita, Alemán, Pérez, Sosa & Fuente, 2012; Beebe, Rao, Blair & Acosta, 2010; Domínguez et al, 2014).

Por otra parte, existen estudios de González (2007) y González (2008), que concluyen que el

estrés por sequía, causado por la baja disponibilidad de agua en el suelo, modifica negativamente la productividad del frijol. Esta puede ser más o menos afectada, dependiendo de la intensidad y duración de la escasez de agua, de la rapidez con la cual se alcance dicha intensidad y además de la etapa fenológica en que el efecto ocurra, así como el pre acondicionamiento de la planta.

Por lo antes expuesto el problema de la investigación lo constituye la necesidad de seleccionar las variedades más adaptadas y tolerantes a la sequía, que tengan un buen rendimiento.

## II. DESARROLLO

### 1. Materiales y Métodos

Se realizaron dos experimentos. El primero conformado con dos grupos de variedades de frijol común, sembrados en condiciones de sequía en la Empresa Socialista Mixta Leguminosa del ALBA, en la zona de Urachiche, estado Yaracuy, Venezuela. El primer grupo se sembró el 17 de octubre de 2011, constituido por los cultivares: Gen 15, Gen 13, Gen 3, Gen 6, Sivinera, sesentera, todos de grano negro (donadas por INIA-CENIAP de Venezuela). El segundo grupo se sembró el 3 de noviembre de 2011, conformado por los genotipos cubanos CC 25-9 colorado (grano rojo), Bolita 42 (negro), BAT 58 (negro), CC 25-9 blanco, CC 25-9 negro (negro) y BAT 304 (negro) (suministradas por la Empresa Provincial de Semillas de Jovellanos, Matanzas, Cuba).

El segundo experimento se sembró el 12 de septiembre de 2012, constituido por los cultivares Gen 15, Gen 13, Gen 3, Gen 6, Sivinera, sesentera (venezolanas de grano negro) y los cubanos: CC 25-9 colorado, Bolita 42 (negro), BAT 58 (negro), CC 25-9 blanco, CC 25-9 negro y BAT 304 (negro), con condiciones de riego diferentes (cuatro y 10 riegos). Todas las semillas fueron evaluadas su respuesta al déficit hídrico, previamente en condiciones de sequía experimental, en IDEA, a través de un proyecto de investigación Cuba-Venezuela (ver Figura 1), siguiendo la metodología reportada por Domínguez et al (2014).

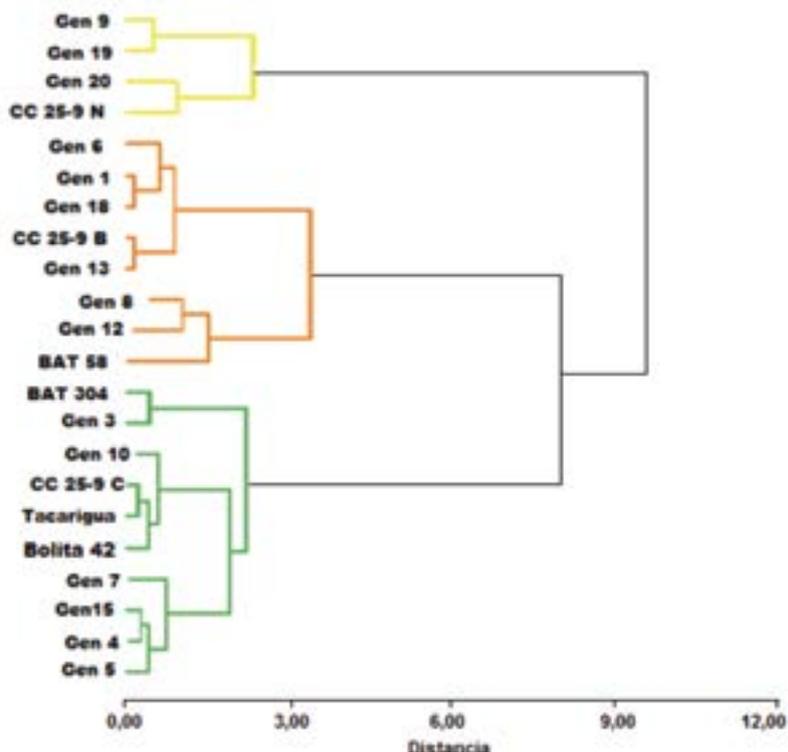


Figura 1. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados para las variables evaluadas en *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de estrés hídrico.

En ambos grupos se usó la variedad Tacarigua como control. Se utilizó un diseño en bloque al azar, con tres repeticiones y la siembra se hizo en tres hileras de 7 m de largo X 0,80 m de ancho, con una densidad de 357 semillas por variedad, por repetición. Se cosecharon tres hileras por variedad (4m<sup>2</sup>), para calcular los indicadores de productividad: número de vainas por plantas, número promedio de semillas por vaina y el peso de cien semillas, rendimiento (t.ha<sup>-1</sup>).

Para estimar la reducción del rendimiento por causa del estrés hídrico se aplicó la siguiente ecuación reportada por Acosta et al. (2008):

$$Pérdida\ de\ rendimiento\ (PR) = 1 - \left(\frac{Re}{Rr}\right) \times 100$$

Re= promedio general de rendimiento en sequía

Rr= promedio general de rendimiento en riego.

El Índice de susceptibilidad a la sequía (ISS) para cada variedad fue determinado con la ecuación:

$$ISS_i = [1 - (RS_i / RRS_i)] / IIS$$

Donde:

ISS<sub>i</sub>= Índice de susceptibilidad a sequía de la i-ésima variedad.

RS<sub>i</sub>= rendimiento promedio en sequía de la i-ésima variedad.

RRS<sub>i</sub>= rendimiento promedio en riego suplementario para la i-ésima variedad.

IIS= Índice de intensidad de sequía

## 2. Resultados

### Primer experimento

Los resultados obtenidos de los indicadores de rendimiento de los genotipos evaluados en el primer grupo se presentan en la Tabla 1, donde se puede apreciar que según los indicadores de rendimiento evaluados, en condiciones de sequía, sobresalieron los cultivares GEN 15 y Tacarigua, esto se corresponde con los resultados obtenidos en condiciones de sequía experimental realizado en IDEA (Figura1); allí se muestra la clasificación de estas variedades con respecto a la tolerancia al estrés hídrico, en dichas condiciones experimentales (Domínguez et al., 2014). En cuanto al resultado obtenido del peso de 100 semillas y el de semilla por vainas no hubo diferencias significativas entre los genotipos evaluados, lo que indica que tienen aproximadamente el mismo tamaño de grano y cantidades de semillas por vainas. En cambio en el número de vainas por plantas se destacaron los genotipos GEN 15, GEN 13 y Gen 6, clasificado, previamente, los dos últimos como medianamente tolerantes.

**Tabla 1. Primer grupo de cultivares de frijol común, sembradas el 17 de octubre 2011**

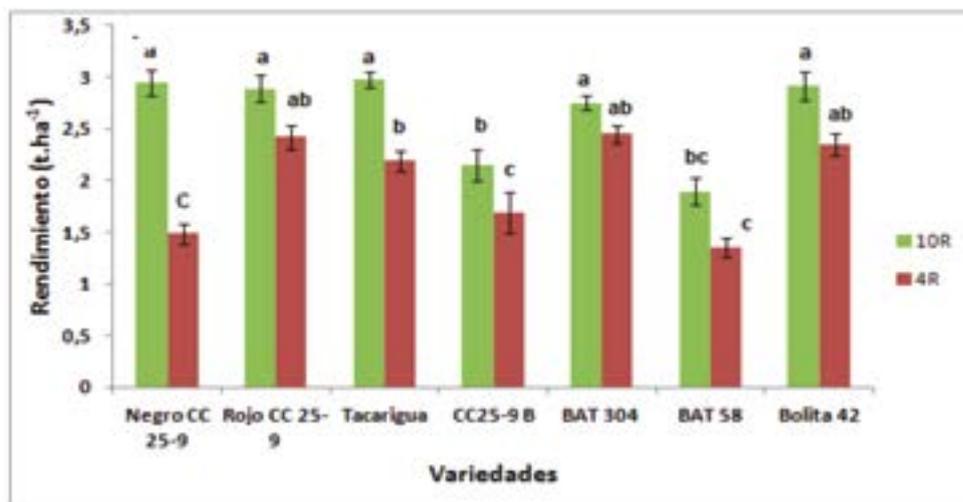
Cultivares	Peso total	Peso de 100 semillas	Número de vainas	Semillas por vainas
GEN 15	616,02 a	18,48 a	8,87 a	4,31 a
TACARIGUA	563,97 a	16,81 a	6,97 b	4,71 a
GEN13	399,65 b	18,19 a	9,93 a	4,68 a
SILVINERA	381,14 b	18,26 a	7,07 b	4,40 a
GEN 3	335,72 b	19,26 a	7,64 b	4,29 a
SESENTERA	285,92 b	18,35 a	6,80 b	4,48 a
GEN6	201,16 b	16,52 a	9,07 a	4,54 a

Letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  según Test de Duncan

El segundo grupo, conformado por las variedades Cubanas (Figura 2), sobresalen Bolita 42 y BAT 304. Estas variedades clasificadas como tolerantes en condiciones de sequía experimental (Figura 1), para lo cual se tuvo en cuenta el comportamiento de indicadores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, en condiciones de sequía experimental reportados. (Domínguez et al., 2014)

En el segundo grupo, el análisis de varianza y comparación de medias del rendimiento obtenido,

en las diferentes condiciones de riego, mostró que existen diferencias significativas en la repuesta al déficit hídrico de las variedades (Figura 2). Todas las variedades redujeron el rendimiento como consecuencia a la sequía en diferentes porcentajes, lo que se relaciona con la tolerancia o no al déficit hídrico. La variedad que presentó la mayor diferencia fue CC 25-9 negro. Las de menor afectación del rendimiento en condiciones de sequía, al compararla con el control (10R), fueron Tacarigua, CC 25-9 colorado y BAT 304.



**Figura 2. Rendimiento de las variedades (t.ha<sup>-1</sup>) bajo las dos condiciones de riego. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupo con diferentes riego, para  $P \leq 0.05$  según Test de Tukey.**

Con los resultados de rendimiento obtenidos en ambas condiciones de riego se calculó la pérdida de rendimiento (PR) y el índice de susceptibilidad a la sequía (ISS) de cada variedad (Figura 3). De forma general hubo una disminución en todos los

indicadores estudiados. El número de vainas por plantas disminuyó 11,7 %, el número de semillas por vainas 15,99%, semillas por plantas 25,10% y en el rendimiento total 24,14%.

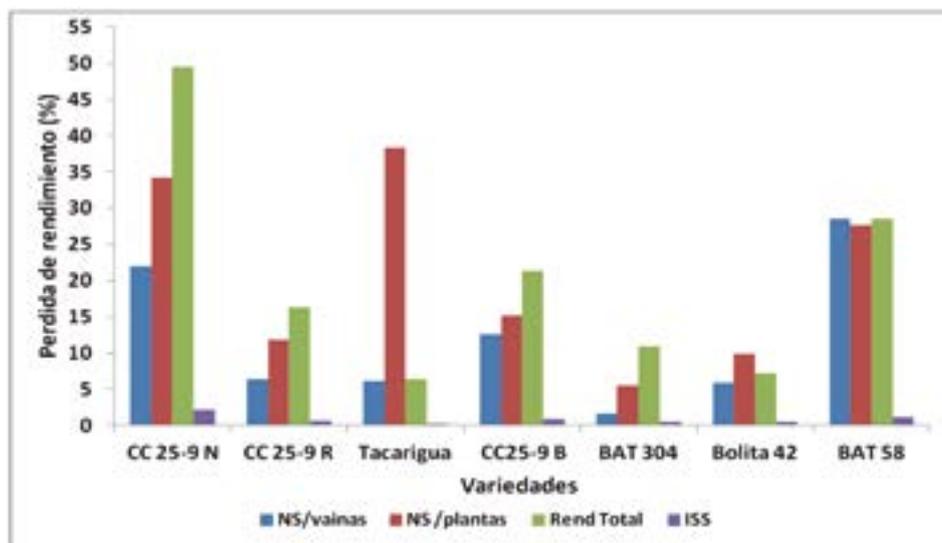


Figura 3. Índices de rendimiento evaluados y respuesta de las variedades a la sequía (ISS), bajo las dos condiciones de riego.

### El segundo experimento

El segundo experimento se realizó, en condiciones de secano, con los genotipos venezolanos y cubanos que obtuvieron los mejores resultados en el primer experimento. En la Tabla 2 se puede apreciar los resultados obtenidos de los indicadores de rendimiento, en condiciones de sequía.

Los genotipos GEN 15, Tacarigua, Gen 13 y Bolita 42 presentaron los mejores resultados en el rendimiento. En cuanto al peso de 100 semillas se observa que de nuevo la variedad CC 25-9 blanco mostró el menor valor. El resto de los genotipos presentó tamaño de grano intermedio, entre 19 y 21.

Tabla 2. Primer grupo de variedades de Frijol común sembradas el 12 de Septiembre del 2012

Cultivares	Peso total	Peso de 100 semillas	Número de vainas	Semillas por vainas
GEN 15	1000,13 a	20,77 b	11,44 a	5,56a
TACARIGUA	727,91 a	21,42 b	13,22 a	5,75 a
GEN13	769,88 a	19,46 b	15,22 a	6,11 a
SILVINERA	587,24 b	19,14 b	13,05 a	5,47 a
GEN 3	623,99 b	22,60 b	10,13 a	5,46 a
SESETERA	617,55 b	20,93 b	12,28 a	5,52 a
GEN6	389,78 b	20,70 b	8,95 a	5,46 a
NEGRO CC 25-9	475,01 b	19,62 b	13,88a	5,41 a
BAT 58	471,27 b	21,64 b	9,25a	5,53 a
BAT 304	588,66 b	21,30 b	14,55 a	6,10 a
BLANCO CC 25-9	319,67 b	17,31 c	11,05a	5,72 a
ROJO CC 25-9	626,66 b	21,15 b	15,43a	4,69 a
BOLITA 42	825,83 a	19,98 b	13,05 a	5,65 a

Letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  según Test de Duncan

Al igual que en el experimento 1 no hubo diferencias significativas para las variables número de vainas por plantas y número de semillas por vaina entre los genotipos evaluados (Tabla1).

### 3. Discusión

En cuanto a los indicadores de rendimiento existen discrepancias, ya que en la literatura hay autores que plantean que el déficit hídrico disminuye el rendimiento (Boicet et añ., 2011; López, 2011) y otros plantean que existen variedades que pueden hasta incrementar el rendimiento bajo estrés hídrico (Cabrera, 2011). En estudios realizados en la estación experimental “Los Palacios” Provincia Pinar del Río [Cuba], bajo condiciones edafoclimáticas, se corroboró un aumento del rendimiento en el cultivo del frijol al ser sometido a un déficit de agua, en la fase vegetativa (Polón, Miranda, Ramírez, & López, 2014).

En el experimento realizado con frijol Caupí se observó que el estrés por sequía causó disminución de 57,72%, del rendimiento de grano por planta, 49,40%, del número de vainas por planta, 32,07% del número de semillas por vaina y 13,9% de la longitud de la vaina, con una correlación altamente significativa entre los dos primeros caracteres mencionados. También, en trabajos realizados en campo, se reporta la disminución del rendimiento/ ha entre 50 y 74% en dicha leguminosa. (Cardona et al., 2014)

En las condiciones de experimentación de sequía se logró un índice de intensidad a la sequía (IIS) de 0,24. Estos resultados fueron semejantes a los reportados por Jiménez & Acosta (2013), en experimento, con ocho variedades de frijol común, en la Estación Experimental del INIFAP en México, bajo riego y sequía, donde se demostró una reducción en el rendimiento de todos los genotipos en comparación con el tratamiento de riego, a una intensidad de sequía representada por un valor de 0,27.

Probablemente la pérdida de rendimientos en estos indicadores de productividad estudiados, obedezca a la limitada actividad fotosintética y a una menor absorción de nutrientes por la reducida movilidad de iones en el suelo y toma de agua por las raíces. Los resultados alcanzados en este trabajo evidenciaron variabilidad entre genotipos en cuanto a la reducción del rendimiento, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (Ishiyaku &

Aliyu, 2013; Cardona, Jarma & Araméndiz, 2013); algunas variedades presentaron mayor reducción del rendimiento, simultáneamente a un menor índice de susceptibilidad a la sequía (ISS).

Según García (2009), cuando las precipitaciones están por debajo de las necesidades del cultivo, los rendimientos disminuyen drásticamente, fundamentalmente si coinciden con la floración y el llenado de las vainas del cultivo, es decir, que la precipitación acumulada durante la etapa reproductiva es determinante para el rendimiento de frijol (Beebe, Rao, Blair & Acosta, 2010; Padilla, Osuma, Martínez & Acosta, 2011). En varios estudios se ha reiterado el efecto deletéreo de la sequía sobre el crecimiento, el rendimiento y la nutrición mineral de las plantas. (Afshar, Hadi, & Pirezard, 2013)

La medida del rendimiento relativo de genotipos en ambientes de sequía y ambientes favorables, parece un punto de partida común en la identificación de los genotipos deseables para las condiciones de ambientes con lluvias impredecibles (Mohammadi, Armion, Kahrizi, & Amri, 2010). Por tal razón, la pérdida de rendimiento es la preocupación principal de los mejoradores de plantas, debido a lo cual se enfatiza en el estudio del rendimiento obtenido bajo condiciones de sequía. (Nazari & Pakniyat, 2010)

La reducción del rendimiento alcanzado en las condiciones experimentales de sequía concuerda con los obtenidos por Osuna et al. (2013), en el cultivo de 10 genotipos en diferentes condiciones de siembra y riego. La reducción de rendimiento por falta de humedad fue evidente en todos los genotipos. La mayoría de los genotipos presentaron moderada tolerancia al estrés hídrico, debido a que obtuvieron índices de susceptibilidad a la sequía menores a uno. Los resultados de índices de susceptibilidad para los genotipos estudiados en este trabajo estuvieron entre 0,90 y 1,07. Estos fueron similares a los obtenidos por López, Tosquy, Ugalde & Acosta (2008) y Padilla, Osuma, Martínez & Acosta (2011), quienes sugirieron la utilización combinada de índice que provoque la reducción del rendimiento en este tipo de estudio.

Diversos estudios concluyen que el ISS podría considerarse como un criterio para caracterizar y seleccionar genotipos; sin embargo deben tenerse en cuenta otras características, ya que no siempre las variedades más tolerantes son las que presentan mayor rendimiento, pero sí las que menos reducen su

rendimiento al variar la disponibilidad de agua (Rosales et al., 2000). La variación en el peso de las 100 semillas puede explicarse por la incidencia del déficit hídrico sobre el contenido relativo de agua, ya que este indicador fisiológico se demostró que presenta correlación con la tolerancia a la sequía, lo que concuerda en las variedades clasificadas como tolerantes, que fueron las que presentaron los mayores pesos, esto puede significar mayor contenido de agua. (Domínguez et al., 2014)

Por otra parte el peso de 100 semillas, en el segundo experimento, revela que la mayoría de las variedades estudiadas tienen un tamaño intermedio, lo que difiere con lo reportado en experimentos realizados con otras variedades de frijol y BAT 304, en condiciones de sequía, donde las variedades estudiadas presentaron mayores valores del peso de las 100 semillas, entre 21 y 31. (Rodríguez et al, 2009; Acosta, E., Acosta, J.A., Amador & Padilla, 2008). Sin embargo el peso de las semillas de BAT 304, es semejante a las reportadas en este trabajo.

### III. CONCLUSIONES

Los genotipos Bolita 42, BAT 304, GEN 13, GEN 15 y Tacarigua fueron los de mejores resultados obtenidos en las condiciones de sequía experimental, lo que se relaciona con su tolerancia al déficit hídrico. El indicador de rendimiento que más se afectó en las condiciones de secano fue el peso de 100 semillas.

### IV. RECOMENDACIONES

Multiplicar los genotipos Bolita 42, BAT 304, GEN 13 y GEN 15 con la intención de obtener mayores cantidades de semillas y distribuir las entre los pequeños productores de la zona.

### V. REFERENCIAS

Acosta, E., Acosta, J.A., Amador, M.D. y Padilla, J.S. (2008). Relación entre índice de área foliar y rendimiento en frijol bajo condiciones de secano. *Agric. Téc. Méx.*, 34(1), 13-20.

Acosta, E.; Hernández, I.; Rodríguez, R.; Acosta J. A.; Pedroza J.; Amador, M.D. y Padilla, J.S. 2011. Efecto de la sequía en la producción de biomasa y grano de frijol. *Ciencia Agrícola. México.* 2 (2): 249-265.

Afshar, R.M., Hadi, H. y Pizard, A. (2013). Effect of nanoiron on the yield and yield component of cowpea under end season water deficit. *Int. J. Agric. Res. Rev.* 3 (1): 27-34.

Ahmed, F.E. y Suliman, A.S.H. (2010). Effect of water

stress applied at different stages of growth on seed yield and water-use efficiency of cowpea. *Agric. Biol.* 1 (4): 534-540.

Alemán, S., Domínguez, A., Fuentes, L., Pérez, Y., Pernía, B., Sosa, D..... Infante D. (2010). Estudio anatómico y bioquímico en materiales cubanos y venezolanos de *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de estrés hídrico. *RET*, 1(1), 89-99.

Apáez-Barríos, P., Escalante-Estrada, J. A. y Rodríguez-González M. T. (2011). Crecimiento y rendimiento del frijol chino en función del tipo de espaldera y clima. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3), 307-315.

Beebe, S.E., Rao, I.M., Blair M.W. y Acosta, J.A. (2010). Phenotyping common beans for adaptation to drought. In: J. M. Ribaut and P. Monneveux (eds.) Drought phenotyping in crops. From theory to practice. Generation Challenge Program Special Issue on Phenotyping; pp. 311-334

Beebe, S.E.; Rao, I.M. Cajiao C. y Grajales, M. (2008). Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci.* 48; 582-592.

Boicet, T., Secada, Y., Chaveco, O., Boudier, A., Gómez, Y., Barroso, Y. (2011). Respuesta a la sequía de genotipos de frijol común utilizando diferentes índices de selección. *Centro Agrícola*, 38(4): 69-73

Cabrera, M. (2011). Comportamiento de algunas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) bajo condiciones edafoclimáticas adversas. En: Libro Resumen. 5to Encuentro Internacional de Arroz. 1er Simposio de Granos. Palacio de las Convenciones de La Habana 2011. p 112.

Cardona -Ayala C., Jarma-Orozco A.J., Araméndiz-Tatis, H., Peña-Agresott M., y Vergara-Cordoba, C. (2014). Respuesta fisiológicas y bioquímicas del frijol caupi (*Vigna unguilata* L. Walp) bajo déficit hídrico. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 8(2):250-261.

Cardona, C.; Jarma, A.J. y Araméndiz, H. (2013). Mecanismo de adaptación a sequía en frijol Caupi (*Vigna unguilata* L Walp). *Ciencia Hortícola.* 7 (2): 277-286.

Di Rienzo, JA, Balzarini, M., Casanoves, F., González, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2011) InfoStat/ profesional versión 1.1. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.

Domínguez, A., Mita, N., Alemán, S., Pérez, Y., Sosa M. y

- Fuente, L. (2012). Algunos indicadores morfológicos y bioquímicos de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* L., bajo condiciones de sequía. *Revista Avanzada Científica*, 15 (2), 1-18. ISSN 1029-3450.
- Domínguez, A., Pérez, Y., Alemán, S., Sosa, M., Fuentes, L., Darias, R..... Sosa, D. (2014). Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. al estrés por sequía. *Rev. Biot Veg*, 14(1), 29 - 36, ISSN 2074-864.
- Frahm, M. A., Rosas, J.C., Mayek-Pérez, N. y López-Salinas, E. (2004). Breeding beans for resistance to Terminal drought in the lowland tropics. *Euphytica*, 136(2), 223-232.
- García, M.E. (2009). Guía técnica para el cultivo del frijol. Proyecto Innovaciones para mejorar la competitividad de la cadena agroindustrial de granos y semillas de frijol de los socios de ASOPROL. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA); Managua. Nicaragua. 28 p.
- Gholami, M., Rahemi, M. y Kholdebarin, B. (2010). Effect of drought stress induced by polyethylene glycol on seed germination of four wild almond species. *Australian J. Basic Appl. Sci.*, 4, 785-791.
- González, A. (2007). Ecofisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. Recuperado: <http://www.flc.fao.org/es/agricultura/produccion/contenido/libro07/Cap>
- González, A. M. (2008). Morfología de Plantas Vasculares. Tema 13. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema13/13-6clasif.htm> [Consulta: Diciembre, 03, 2011].
- Ishiyaku, M.E. y Aliyu, H. (2013). Field evaluation of cowpea genotypes for drought tolerance and striga resistance in the dry savanna of the North-West Nigeria. *Int. J. plant. Breed. Genet.* 7 (1): 45-56
- Jiménez, J.C. y Acosta, J.A. (2013). Rendimiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) y Tépari (*Phaseolus acutifolius* A Gray) bajo el método riego-sequía en Chihuahua. *Mex. Cienc. Agríc.* ISSN 2007-0934. 4:4
- López, A. (2011). Manejo del riego y nitrógeno en frijol común cultivado en sistemas de plantío directo. *Ciencia Agronómica*, 42 (1): 51-56.
- López, S., Tosquy, O.H., Ugalde, F.J. y Acosta, J.A. (2008). Rendimiento y tolerancia a sequía de genotipos de frijol negro en el estado de Veracruz. *Revista Fítotecnia Mexicana*. 31(3): 5-39.
- Mohammadi, R.; Armion, M.; Kahrizi, D. y Amri, A. (2010). Efficiency of screening techniques for evaluating durum wheat genotypes under mild drought conditions. *Int J Plant Pro* .4 (1): 11-24
- Nazari, L. y Pakniyat, H. 2010. Assessment of drought tolerance in barley genotypes. *J. Applied Sciences*. 10: 151-156.
- Nieto-Garibay, A., Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E., García-Hernández, J. L. y Ruíz-Espinoza, F. H. (2010). Water stress in two capsicum species with different domestication grade. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 353-360.
- Osuna, E.S., Reyes, L., Padilla, J.S., Rosales, R., Martínez, M.A., Acosta, J.A. y Figueroa, B. (2013). Rendimiento de genotipos de frijol con diferentes métodos de siembra y riego-sequía en Aguascalientes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4 (8): 1209-1221.
- Padilla, J.S.; Osuna, E.S.; Martínez, M.A. y Acosta, J.A. 2011. Rendimiento de grano frijol bajo temporal y riego en dos fechas de siembra. In: memoria del XI simposio Internacional y VI congreso nacional agricultura Sostenible 2011. San Luis Potosí. p1-6.
- Polón, R.; Miranda, A.; Ramírez, M.A. y López, L.A. (2014). Efectos del estrés de agua sobre el rendimiento de granos en la fase vegetativa en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. ISSN -1010-2760, RNPS-0111. 23: 4
- Rodríguez, O., Chaveco, O., Ortiz, R., Ponce, M., Ríos, H., Miranda, S..... Cedeño, L. (2009). Líneas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a la sequía. Evaluación de su comportamiento frente a condiciones de riego, sin riego y enfermedades. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 13(38), 17 – 26.
- Rosales, R.; Ramírez, P., Acosta, J.A; Castillo, F. y Kelly J.D. (2000). Grain yield and drought tolerance of common bean under field conditions. *Agrociencia* 34(2):153-165.

#### Agradecimientos

Agradecemos a la Empresa Provincial de Semillas de Matanzas, la donación de las semillas cubanas de *Phaseolus vulgaris* y al Banco de germoplasma del INIA-CENIAP de Venezuela, la donación de los materiales venezolanos, que permitieron la realización del estudio y a la Empresa Mixta de Semillas de Leguminosas del ALBA, que sin su colaboración este trabajo no hubiese sido posible. *Fuente de financiamiento:* Proyecto Cuba-Venezuela: Utilización de herramientas biotecnológicas para la identificación y caracterización de variedades de leguminosas resistentes a estrés abiótico (2007-2011).

# CIENCIA

UNEMI

## Ciencia e Ingeniería de Alimentos

---

Caracterización físicoquímica de miel de angelita  
*Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) producida  
en Esmeraldas, Ecuador

---

Efecto de la adición de ácido ascórbico en la  
degradación de nitratos y nitritos en mortadela

---

Efecto de la nisina sobre la conservación del  
helado tipo italiano

---

Procesamiento del Té Verde, enriquecido con  
Vitamina C y Superóxido Dismutasa para la  
obtención de una bebida funcional antioxidante

---

# Caracterización físicoquímica de miel de angelita *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) producida en Esmeraldas, Ecuador

Patricia, Vit <sup>1,2</sup>, Isbelia, González <sup>3</sup>; Lita, Sorroza <sup>4</sup>; Silvia, R.M. Pedro <sup>5</sup>

## Resumen

En Ecuador la megabiodiversidad está presente también en las mieles producidas en potes de cerumen, las cuales no están incluidas en las normas técnicas de calidad del Instituto Ecuatoriano de Normalización NET INEN 1572. Las normas de miel sólo se refieren a la miel producida por la abeja comercial *Apis mellifera*. “Angelita” es el nombre étnico de la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula* en Ecuador y en otros países latinoamericanos. A fin de singularizar las mieles de *T. angustula*, se realizó su caracterización físicoquímica según los métodos clásicos de indicadores de calidad en las normas para miel de abejas. El contenido de nitrógeno se determinó por microKjeldahl. Son mieles claras de color ámbar entre 75 y 102 unidades Pfund. La composición físicoquímica varió así: acidez libre 22,50 – 25,20 meq/kg, azúcares reductores 56,43 – 63,83 g/100g, cenizas 0,50 – 0,16 g/100 g, color 75 – 102 unidades Pfund, hidroximetilfurfural 0,44 – 1,41 mg/kg, humedad 23,1 – 25,2 g/100 g, nitrógeno 33,66 – 85,78 mg/100 g, pH 3,66 – 4,22, sacarosa aparente 1,46 – 2,36 g/100 g y sólidos insolubles en agua 0,03 – 0,07 g/100g.

**Palabras Clave:** análisis físicoquímicos; angelita; Ecuador; miel; *Tetragonisca angustula*.

## Physicochemical characterization of “angelita” *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) honey produced in Esmeraldas, Ecuador

### Abstract

In Ecuador the mega-biodiversity is also present in the honey produced in cerumen pots, which are not included in the technical quality norms of the Ecuadorian Institute of Norms NET INEN 1572. The honey norms only refer to the honey produced by the commercial honey bee *Apis mellifera*. “Angelita” is the ethnic name of the stingless honey bee *Tetragonisca angustula* in Ecuador and in other Latin-American countries. In order to single out the honey of *T. angustula*, its physicochemical characterization was carried out according to conventional methods of quality indicators in standards for honey. The nitrogen content was determined by microKjeldahl. These are clear amber color honeys from 75 to 102 Pfund units. The physicochemical composition varied as follows: free acidity 22.50 – 25.20 meq/kg, reducing sugars 56.43 – 63.83 g/100g, ash 0.50 – 0.16 g/100 g, color 75 – 102 Pfund units, hydroxymethylfurfural 0.44 – 1.41 mg/kg, moisture 23.1 – 25.2 g/100 g, nitrogen 33.66 – 85.78 mg/100 g, pH 3.66 – 4.22, apparent sucrose 1.46 – 2.36 g/100 g and water insoluble solids 0.03 – 0.07 g/100g.

**Keywords:** physicochemical analysis; angelita; Ecuador; honey; *Tetragonisca angustula*.

**Recibido:** 1 de julio de 2015  
**Aceptado:** 20 de abril de 2016

<sup>1</sup>Licenciada en Biología, MSc Ciencia de Los Alimentos, Doctor of Philosophy, Coordinadora del Grupo Apiterapia y Bioactividad, Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Profesora Jubilada de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. vitolivier@gmail.com

<sup>2</sup>Licenciada en Biología, MSc Ciencia de Los Alimentos, Doctor of Philosophy, Profesora Asociada Honoraria en la Disciplina de Ciencias Biomédicas, Escuela de Ciencias Médicas, The University of Sydney, Sydney, Australia. vitolivier@gmail.com

<sup>3</sup>Farmacéutica, MSc Biotecnología de Microorganismos, Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Profesora Jubilada de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. gisbelia@yahoo.com

<sup>4</sup>Ingeniera Acuicultora, Licenciada en Ciencias del Mar, Doctora en Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria, Coordinadora de la Carrera de Ingeniería Acuicola, Profesora Auxiliar, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala, El Oro, Ecuador. slita@utmachala.edu.ec

<sup>5</sup>Especialista de Laboratorio, Curso Técnico Profesionalizante en Bioquímica, Graduación en Ciencias Biológicas, Maestría en Ciencias Entomológicas, Doctora en Ciencias Entomológicas, Departamento de Biología, Facultad de Filosofía, Ciencia y Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. silviamp@ffclrp.usp.br

## I. INTRODUCCIÓN

En Ecuador y Venezuela hay normas de calidad sólo para la miel de abejas producida por la abeja *Apis mellifera* (INEN, 1988; COVENIN, 1984a,b). En Venezuela las normas no han sido revisadas desde el año 1984 y en Ecuador hay una revisión en curso; sin embargo, también se produce y se comercializa la miel de abejas sin aguijón. Estas abejas habitan en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Crane, 1990), pertenecen a la tribu Meliponini, y están representadas por un poco más de 400 especies en el Neotrópico (Camargo y Pedro, 2007). En Colombia, la norma de miel fue revisada en el año 2006, cuando se incluyó un anexo para las mieles producidas por abejas nativas (ICONTEC, 2007) y Brasil es el único país que cuenta con una norma estatal para miel producida por abejas del género *Melipona*, en el estado de Bahia (ADAB, 2014).

El primer registro de abejas sin aguijón fue publicado en el año 1557 por el mercenario alemán Hans Staden en Brasil (Engels, 2009). Las abejas del género *Tetragonisca* son las más extendidas en la geografía neotropical, desde México hasta el norte de Argentina (Camargo y Pedro, 2007). En la Provincia de Esmeraldas en Ecuador, esta abeja se conoce como “angelita”.

Apenas hay un estudio de composición de mieles de pote ecuatorianas en una tesis de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador, del año 1989 (Chieruzzi Löwenstein, 1989), donde se incluye la miel producida por la abeja *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811). Su composición ha sido estudiada también en Venezuela (Vit, 1997), Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008), Colombia (Fuenmayor et al., 2012), Bolivia (Ferrufino y Vit, 2013) y Brasil (Almeida Muradian, 2013). Estos estudios son indispensables para recomendar los estándares de calidad, tan necesarios para promover su comercialización e impulsar la meliponicultura de Ecuador, ya que la miel de angelita tiene numerosos usos medicinales, siendo el más notable su aplicación oftálmica tópica para tratar pterigios y cataratas oculares (Vit, 2004; Vit et al., 2004).

En esta investigación se caracterizaron diez indicadores de calidad fisicoquímica en cuatro mieles ecuatorianas de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), recolectadas en la provincia de Esmeraldas.

## II. DESARROLLO

### 1. Materiales y Método

#### Abejas

Se recolectaron unas 10 abejas en la entrada de las colmenas y se conservaron en alcohol isopropílico durante su transporte, luego se evaporó el alcohol a temperatura ambiente y se conservaron en papel dentro de una caja rígida con algodón antes de su envío a Brasil, para su identificación entomológica en el Departamento de Biología de la Facultad de Filosofía, Ciencia y Letras, en la Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

#### Miel

Se recolectaron aproximadamente 50 g de miel por compresión de potes de cerumen de la reserva de miel en cuatro nidos de la abeja “angelita” *Tetragonisca angustula*, San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, desde diciembre 2014 hasta junio 2015, la cual se almacenó en envase plástico hermético y se congeló hasta su análisis.

#### Análisis físico-químicos

Se evaluó color en unidades Pfund, con el colorímetro Hanna Honey Color 221; pH y acidez libre por método titrimétrico; humedad por método refractométrico; azúcares reductores y sacarosa aparente, por el método de Lane y Eynon; cenizas por incineración y gravimetría según se indica en las normas para miel de abejas (INEN, 1988; COVENIN, 1984b). El contenido de nitrógeno se midió por microKjeldahl (Vit, 1987). Se realizaron mediciones espectrofotométricas de hidroximetilfurfural, según la norma chilena (INN, 2006). Y los sólidos insolubles por gravimetría según la norma brasilera (Brasil, 2000).

#### Análisis estadísticos

Se realizó estadística descriptiva con medias  $\pm$  desviación estándar, utilizando SPSS 12.0.

### 2. Resultados

En la Tabla 1 se presenta la composición fisicoquímica de la miel de *Tetragonisca angustula* recolectada en la provincia de Esmeraldas.

### 3. Discusión

La especie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) está extendida desde México hasta Brasil y *Tetragonisca bulchwaldi* (Friese, 1925), es una especie nativa de esta región ecuatoriana (Camargo y Pedro, 2007); sin embargo, no corresponde a la especie de San Lorenzo. Si bien la abeja “angelita” de este trabajo se identificó como *Tetragonisca*.

**Tabla 1. Composición fisicoquímica de la miel de angelita *Tetragonisca angustula* (n=4)**

Indicadores de calidad (unidades)	Media ± DE	Min - Max
Acidez libre (meq/kg)	23,83 ± 1,24	22,50 – 25,20
Azúcares reductores (g/100 g)	60,18 ± 3,35	56,43 – 63,83
Cenizas (g/100 g)	0,36 ± 0,15	0,50 – 0,16
Color (unidades Pfund)	87,5 ± 11,96	75 – 102
Hidroximetilfurfural (mg/kg)	1,21 ± 0,91	0,44 – 1,41
Humedad (g/100 g)	23,83 ± 1,24	23,1 – 25,2
Nitrógeno (mg/100 g)	61,21 ± 24,12	33,66 – 85,78
pH	3,95 ± 0,25	3,66 – 4,22
Sacarosa aparente (g/100 g)	2,00 ± 0,39	1,46 – 2,36
Sólidos insolubles (g/100 g)	0,06 ± 0,02	0,03 – 0,07

*angustula* (Latreille, 1811), es probable que hay una especie nueva *Tetragonisca* sp. gr. *angustula*, según hipótesis de distribución al oeste de Los Andes por el Profesor JMF Camargo<sup>†</sup> (comunicación personal). Las especies nuevas sólo pueden nombrarse luego de una revisión taxonómica extensiva del grupo, incluyendo información morfológica, biológica y molecular. Cabe destacar que esta especie tiene hábitos antrópicos y es cultivada en Colombia. Considerando que la provincia de Esmeraldas limita con la frontera colombiana, podría tratarse de una especie introducida para la meliponicultura.

En la revisión de composición de miel de pote para sugerir estándares de calidad para diversas especies de abejas sin aguijón (Souza et al., 2006), se incluyó la miel de *Tetragonisca angustula* de Brasil, México y Venezuela (Vit et al., 2004), se usaron diez referencias, de los cuales siete se evaluaron en el presente trabajo para acidez libre (7,7 – 109,0 meq/kg), azúcares reductores (58,0 – 70,0 g/100 g), cenizas (0,38 a 0,45 g/100 g), HMF (5,0 a 39,1 mg/kg), humedad (23,2 – 26,7 g/100 g), nitrógeno (142,27 a 144,00, mg/100 g), pH (3,69 a 4,35), y sacarosa aparente (2,1 – 2,4 g/100 g). Otros tres parámetros indicadores de la calidad de la miel, no evaluados aquí son la actividad de la diastasa (17,9 – 23,0 ND), la actividad de la invertasa (50,1 UI) y la conductividad eléctrica (0,78 – 7,32 mS/cm). Las variables de color (unidades Pfund), y sólidos insolubles en agua (g/100 g) no se consideraron en esa revisión. Los valores de la revisión presentan un rango más amplio y son ligeramente mayores que en las mieles ecuatorianas de *Tetragonisca angustula*,

según valores de la Tabla 1 para acidez libre (22,50 – 25,20 meq/kg), azúcares reductores (56,43 – 63,83 g/100 g), cenizas (0,16 – 0,50 g/100 g), HMF (0,44 – 1,41 mg/kg), humedad (23,1 – 25,2 g/100 g), nitrógeno (33,66 – 85,78 mg/100 g), pH (3,66 – 4,22), y sacarosa aparente (1,46 – 2,36 g/100 g).

Los resultados obtenidos en este trabajo se compararon con indicadores de calidad en la norma ecuatoriana para Miel de Abejas (INEN, 1988) y con la norma venezolana para Miel de Abejas (COVENIN, 1984b), que se refieren a miel de *Apis mellifera*: 1. Humedad (max 20%). 2. Azúcares reductores (min 65 %). 3. Sacarosa aparente (max 5%). 4. Acidez libre (max 50 meq/kg 1, max 4 meq/100 g 3). 5. Cenizas (max 0,5 %). 6. Hidroximetilfurfural (max. 40 mg/kg 1, negativo 3). Además del color, el contenido de nitrógeno y de sólidos insolubles que no figuran en la norma ecuatoriana (INEN, 1988) ni en la norma venezolana (COVENIN, 1984b) para miel de abejas.

En la Tabla 2 se presenta una síntesis de parámetros evaluados en investigaciones previas sobre la composición de miel de *Tetragonisca angustula* por (Chieruzzi Löwenstein (1989) en Ecuador, Vit (1997) en Venezuela, Dardón y Enríquez (2008) en Guatemala, Fuenmayor et al. (2012) en Colombia, Ferrufino y Vit (2013) en Bolivia, y Almeida-Muradian (2013) en Brasil.

Al comparar la Tabla 1 con la Tabla 2, se puede observar que estas mieles de angelita cumplen con el requisito de la norma NTE INEN 1572 (INEN, 1988) para un máximo de acidez libre de 50 mg/kg, e inclusive de la norma venezolana COVENIN 2194-84 (COVENIN, 1984b) que permite un máximo de 40 meq/kg miel. Las mieles ecuatorianas presentaron una acidez libre de 23,83 ± 1,24 meq/kg, similar a las de Guatemala, aproximadamente la mitad que las mieles de Venezuela, Colombia, Bolivia y Brasil. Para efectos de la norma se sugiere mantener el máximo de acidez libre en 50 mg/kg, mientras se justifique un valor menor en futuras investigaciones con miel de angelita ecuatoriana recolectada en otras provincias del Ecuador. La norma ecuatoriana permite un máximo de 50 meq/kg miel mientras que El pH no aparece en las normas de calidad (INEN, 1988; COVENIN, 1984b), pero cuando se mide la acidez libre se puede medir el pH de inicio para tener un descriptor adicional. Las variaciones de pH observadas para estas mieles presentaron un rango entre 3,95 y 5,18.

**Tabla 2. Indicadores de calidad de miel de *Tetragonisca angustula* producida en Ecuador, Venezuela, Guatemala, Colombia, Bolivia y Brasil.**

Indicadores de calidad (unidades)	Países de origen de la miel de "angelita"					
	Ecuador (Chieruzzi Löwenstein, 1989)	Venezuela (Vit, 1997)	Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008)	Colombia (Fuenmayor et al., 2012)	Bolivia (Ferrufino y Vit, 2013)	Brasil (Almeida Muradian, 2013)
Acidez libre (meq/kg)	-	48,27 (4,08)	17,39 (10,35)	39,2 (22,9)	43,8	37,34 (16,74)
Azúcares reductores (g/100 g)	62,7	65,00 (2,61)	65,78	53,6	58,6	57,09 (7,83)
Cenizas (g/100 g)	-	0,38 (0,04)	0,35 (0,26)	0,205 (0,07)	0,33	0,28 (0,11)
Color (unidades Pfund)	-	-	-	49 (19)	-	-
Hidroximetilfurfural (mg/kg)	-	9,83 (5,28)	0,20 (0,00)	1,3 (2,1)	-	0,65 (0,25)
Humedad (g/100 g)	24,4	23,17 (0,37)	17,45 (2,8)	24,3 (2,3)	25,1	24,37 (0,77)
Nitrógeno (mg/100 g)	-	142,27 (3,47)	-	-	-	-
pH	-	-	5,18 (1,35)	4,2 (0,3)	4,5	-
Sacarosa aparente (g/100 g)	0,00	2,05 (0,86)	4,83	-	1,8	2,14 (1,80)
Sólidos insolubles (g/100 g)	-	-	-	-	-	0,06 (0,03)
Conductividad eléctrica (mS/cm)	-	7,32 (0,23)	-	658* (57)	-	-
Actividad diastasa (ND) <sup>1</sup>	-	23,00 (6,30)	12,27 (10,29)	16,7 (9,2)	-	16,93 (3,94)
Actividad invertasa (UI) <sup>2</sup>	-	50,13 (11,53)	-	-	-	-

Los valores de la Tabla representan la media ± (DE).

\*μS/cm

<sup>1</sup>ND = Número de Diastasa.

<sup>2</sup>UI = Unidades de Invertasa.

El contenido promedio de azúcares reductores observado ( $68,18 \pm 3,35$ ) es inferior al mínimo de 65 g/100g indicado en la norma NTE INEN 1572 (INEN, 1988), similar al valor de Colombia (Fuenmayor et al., 2012), pero inferior a Bolivia (Ferrufino y Vit, 2013), Brasil (Almeida Muradian, 2013) y Ecuador (Chieruzzi Löwenstein, 1989), los cuales tampoco cumplen con la norma, a diferencia del valor para Venezuela (Vit, 1997) y Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008) que sí cumplen con este requisito. Este indicador de calidad muestra variaciones según el origen geográfico de la

miel de *Tetragonisca angustula*. Para el contenido de sacarosa aparente, la norma ecuatoriana (INEN, 1988) establece un máximo de 5 g/100g, el cual se cumple en todas las mieles analizadas de la Tabla 1 ( $2,00 \pm 0,39$ ) y la Tabla 2, por lo tanto se puede mantener este requisito. El perfil de azúcares por cromatografía proporciona información sobre los tipos y sus concentraciones en las mieles (Bogdanov et al., 1996; Vit et al., 1998), lo cual no es posible con los análisis cuprimétricos de la normas para Miel de Abejas de Venezuela (COVENIN, 1984b), del Ecuador (INEN, 1988), de Brasil (Brasil, 2000), y

de Colombia (ICONTEC, 2007). Para ello, se requiere armonización con análisis cromatográficos en el futuro, a fin de obtener espectros de azúcares.

Respecto al contenido de cenizas, la norma ecuatoriana (INEN, 1988) y la norma venezolana (COVENIN, 1984b) establecen un máximo de 0,5 g/100g, el cual también se cumple en todas las mieles analizadas de la Tabla 1 ( $0,36 \pm 0,15$ ) y la Tabla 2, por lo tanto se puede mantener este requisito de la miel de *Apis mellifera* en la miel de *Tetragonisca angustula*.

El color de la miel no figura en la norma ecuatoriana (INEN, 1988) ni en la norma venezolana (COVENIN, 1984b). En la Tabla 1 se puede observar un valor promedio de  $87,5 \pm 11,96$  unidades Pfund para la miel de Ecuador y en la Tabla 2 un valor de 49 unidades Pfund para la miel de Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008), los cuales junto con otro valor de 150 unidades Pfund para la miel de angelita peruana (Rodríguez-Malaver et al., 2009) constituyen los referenciales disponibles. Esta variación, al igual que la de otros indicadores, puede ser debida al tipo de flora visitada por las abejas y justifica aumentar el muestreo en otras provincias ecuatorianas para conocer la variabilidad de colores de mieles de *Tetragonisca angustula* en Ecuador. Las mieles de Guatemala presentaron un color ámbar más claro que las mieles de Ecuador estudiadas en este trabajo, y la miel de Perú fue la más oscura.

El hidroximetilfurfural es un indicador de calentamiento y de envejecimiento de la miel, y se permite un máximo de 40 mg/kg en la norma ecuatoriana (INEN, 1988) aunque los laboratorios oficiales del ARCSA en Ecuador no miden este parámetro en miel. En Venezuela la norma para miel de abejas (COVENIN, 1984b) tiene un referencial cualitativo con otro método, por este motivo se usó el método de la norma chilena (INN, 2006). Los valores promedio de hidroximetilfurfural ( $1,21 \pm 0,91$  mg/kg) obtenidos en el actual estudio con miel ecuatoriana (Tabla 1) y en estudios previos con mieles de Venezuela (Vit, 1997), Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008), Colombia (Fuenmayor, 2012) y Brasil (Almeida Muradian, 2013) son muy inferiores al máximo permitido en la norma ecuatoriana (INEN, 1988), lo cual justifica disminuir este valor si luego de muestrear mieles de *Tetragonisca angustula* en otras provincias de Ecuador, se mantiene esta tendencia. La experiencia previa de esta decisión fue observada en mieles de pote producidas por abejas *Melipona* en el estado de Bahía, en Brasil, donde se indica un máximo permitido de 10

mg HMF/kg miel en la norma para miel de abejas del género *Melipona* (ADAB, 2014).

La humedad es un indicador que merece especial atención ya que suele ser mayor en mieles de meliponinos que en las mieles comerciales de *Apis mellifera*, en las cuales se permite un máximo de 20 g/100 g (INEN, 1984; COVENIN, 1984b) para prevenir la fermentación post-cosecha. Nuevamente hay mucha variabilidad entre países donde se produce miel de *Tetragonisca angustula*; por ejemplo, en la Tabla 2 se puede observar que sólo Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008) cumple con este requisito de calidad. Definitivamente será necesario aumentar el valor de este requisito para la máxima concentración de humedad permitida, según la Tabla 1 y la Tabla 2. Los promedios reportados para humedad de miel de angelita en este trabajo ( $23,83 \pm 1,24$  g/100 g) y en publicaciones previas (Chieruzzi Löwenstein, 1989; Vit, 1997; Fuenmayor et al., 2012; Almeida Muradian, 2013; Ferrufino y Vit, 2013) pueden cumplir con un máximo de 25 g agua/100 g miel; sin embargo, en el análisis de mieles de pote peruanas producidas por diez especies de meliponinos, se encontraron valores superiores a los del presente estudio, con una humedad de 28,9 g/100g para la miel de angelita (Rodríguez-Malaver et al., 2009). Se reitera la necesidad de estudiar mieles de angelita producidas en otras provincias de Ecuador, porque la modificación del requisito podría ser un máximo de 30 g/100 g en caso de encontrarse valores similares a las mieles peruanas.

El contenido de nitrógeno tampoco figura como indicador de calidad en la norma ecuatoriana (INEN, 1988) ni en la venezolana (COVENIN, 1984b); sin embargo, su utilidad para controlar la autenticidad de la miel (Vit, 1987) justifica considerar su inclusión en la norma. Valores de 142,27 mg N/100 g miel en Venezuela (Vit, 1997) y de  $61,21 \pm 24,12$  mg N/100 g miel en el actual estudio, permiten observar la variabilidad de este parámetro en las mieles de *Tetragonisca angustula*.

El contenido de  $0,06 \pm 0,02$  g de sólidos insolubles en agua/100 g miel encontrado en la Tabla 1, coincide con el publicado para las mieles de Brasil (Almeida Muradian, 2013). La norma estatal de Bahía (ADAB, 2014) sugiere un máximo de 0,1g/100g, lo cual se cumple. Se recomienda incluir este indicador en la norma ecuatoriana para miel porque es sencillo de medir, es indicador de higiene y permite conocer el tipo de extracción (succión, decantación o prensado).

En algunos estudios se logró medir la conductividad

eléctrica de la miel, la cual es directamente proporcional al contenido de cenizas en la miel. En la Tabla 2 se muestran referenciales de conductividad eléctrica para mieles de Venezuela (Vit, 1997) y de Colombia (Fuenmayor et al., 2012). Este parámetro no figura en las normas para miel de abejas de Ecuador (INEN, 1988) ni de Venezuela (COVENIN, 1984b), pero es valioso incluirlo ya que su medición es más sencilla que la de cenizas.

La evaluación de la actividad de la enzima diastasa fue realizada en las caracterizaciones de mieles producidas en Venezuela (Vit, 1997), Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008) y Colombia (Fuenmayor et al., 2012), donde se obtuvieron valores del número de diastasa (ND) comprendidos entre 12,27 y 23,00. La actividad de la invertasa sólo se midió en las mieles de angelita producidas en Venezuela (Vit, 1997), con un referencial de 50,13 unidades de invertasa (UI). Al igual que la concentración del hidroximetilfurfural, la actividad enzimática se usa como indicador del grado de frescura de la miel y de calentamiento, pero su comportamiento es inverso, el HMF aumenta con el tiempo y en mieles calentadas, mientras que la actividad de las enzimas disminuye a medida que envejecen las mieles y en las mieles calentadas.

Tratándose de mieles medicinales usadas para tratar cataratas oculares (Vit y Jacob, 2008); además de la caracterización con indicadores de calidad de la miel de angelita, es necesario identificar el origen botánico (Vit y Ricciardelli D'Albore, 1994; Vit, 2005) junto con la evaluación de indicadores de bioactividad mediante perfiles de compuestos fenólicos (Vit et al., 1997; Vit y Tomás-Barberán, 1998), mediciones de actividad antioxidante (Vit et al., 2009) y asociaciones con bioelementos presentes en la miel (Vit et al., 2010). Asimismo, es importante considerar los efectos de la forma de extracción y el almacenamiento de la miel (Ríos et al., 2001) para optimizar sus propiedades medicinales.

Considerando la megabiodiversidad de meliponinos ecuatorianos, con 89 especies en apenas tres de sus provincias sureñas de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe (Ramírez et al., 2013), cabe destacar la complejidad del estudio de sus mieles producidas en pote, donde la presente caracterización aporta información para

una de esas especies de abejas neotropicales, la *Tetragonisca angustula*. Una vez más se demuestra la necesidad del control de calidad de la miel de pote producida por abejas sin aguijón (Vit et al., 2006). Si bien son las abejas más antiguas del planeta (Vit, 2010; Engel y Michener, 2013), las mieles precolombinas presentes en los saberes ancestrales de Latinoamérica, aún no tienen requisitos de calidad en las normas de ningún país tropical donde se producen (Vit, 2008); sin embargo, forman parte de la farmacopea popular con sus tradicionales usos medicinales (Vit et al., 2015).

En Ecuador, la *Tetragonisca angustula* es muy abundante en diversas provincias donde hace nidos en zonas urbanas (P. Vit, observación personal) (Vit, 2015), pero la producción de miel requiere de capacitación para el manejo de las colmenas, quizás por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador (MAGAP), a fin de optimizar el rendimiento y promover su industrialización. Como indica el Viceministro del MAGAP, la apicultura y la meliponicultura han sido actividades agropecuarias que no han recibido la atención que merecen en el Ecuador (P. Jácome Estrella, comunicación personal). Una mujer meliponicultora de la provincia de Esmeraldas es quizás la depositaria del saber ancestral para cuidar la angelita en Ecuador: la Sra. Marlenis Valencia, quien mantiene esta abeja en colmenas especialmente diseñadas para ese tamaño de abejas y de potes de miel (P. Vit, observación personal) (Vit, 2015). La inclusión de las mieles de pote en una norma ecuatoriana para tal fin, también implica la inclusión y la participación en la economía nacional de quienes cuidan estas abejas y su biodiversidad.

### III. CONCLUSIONES

Las caracterización de la miel de pote producida por la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula* de la provincia de Esmeraldas, es la primera contribución para las autoridades de normalización ecuatorianas para la elaboración de la norma de calidad "Miel de Pote". El inicio de esta base de datos permitirá expandir el alcance de la norma de control de calidad de miel de abejas NTE INEN 1572 (INEN, 1988) producida por las diferentes

especies de abejas sin aguijón de Ecuador. La riqueza entomológica de las mieles ecuatorianas permite valorizar su megabiodiversidad.

## V. REFERENCIAS

- ADAB. Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia. (2014). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero *Melipona* (pp. 1-9), Bahia, Brasil: Portaria ADAB N° 207 DE 21/11/2014.
- Almeida-Muradian, L.B. (2013). *Tetragonisca angustula* pot-honey compared to *Apis mellifera* honey from Brazil. En: P. Vit, S.E.M. Pedro, D.W.Roubik (Eds.), Pot-honey. A legacy of stingless bees (pp. 375–382), New York, USA: Springer.
- Bogdanov, S., Vit, P., Kilchenmann, V. (1996). Sugar profiles and conductivity of stingless bee honeys from Venezuela. *Apidologie*. 27(5), 445-450.
- Brasil. (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis – Sistema de Consulta à Legislação. Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta>
- Camargo, J.M.F.; Pedro S.R.M. (2007). Meliponini Lepeletier 1836. En: J.S. Moure, D. Urban, G.A.R. Melo (Eds.), Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region (pp. 272-578), Curitiba, Brasil: Sociedade Brasileira de Entomologia [versión online <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34135> actualizada 17 jun 2013, consultada 14 oct 2015].
- COVENIN. Comisión Venezolana de Normas Industriales. (1984a). Miel de Abejas. Métodos de Ensayo. COVENIN 2136-84 (pp. 1-36), Caracas: Fondonorma.
- COVENIN. Comisión Venezolana de Normas Industriales. (1984b). Miel de Abejas. COVENIN 2194-84 (pp. 1-5), Caracas: Fondonorma.
- Crane, E. (1990). Bees and Beekeeping. Science, Practice and World Resources (pp. 614), Bath, UK: Heinemann Newnes, pp. 614.
- Chieruzzi Löwenstein, M.C. (1989). Etnomeliponicultura y análisis químico de las mieles de cinco especies de abejas sin aguijón (Meliponinae). Tesis para Licenciatura de Biología. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica de Ecuador. 192 pp.
- Dardón, M.J., Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia* 33: 916–922.
- Engel, M.S., Michener, C.D. (2013). Geological history of the stingless bees (Apidae: Meliponini). En P. Vit, D.W. Roubik (Eds.) Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. (pp. 1-7), Mérida, Venezuela: Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>
- Engels, W. (2009). The first record on Brazilian stingless bees published 450 years ago by Hans Staden. *Genetics and Molecular Research* 8 (2), 738-743.
- Ferrufino, U., Vit, P. (2013). Pot-honey of six species of Meliponini from Amboró National Park in Bolivia. En: P. Vit, S.R.M. Pedro, D.W.Roubik (Eds.), Pot-honey. A legacy of stingless bees (pp. 409-416), New York, USA: Springer.
- Fuenmayor, C.A., Zuloaga-Domínguez, C.M., Díaz-Moreno, A. C., Quicazán, M.C. (2012). ‘Miel de angelita’: Nutritional composition and physicochemical properties of *Tetragonisca angustula* honey. *Interciencia* 37(2): 142-147.
- ICONTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2007). Norma Técnica Colombiana. Miel de Abejas. NTC 1273. ICONTEC (pp. 1-6), Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- INEN. Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1988). Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria. Miel de Abejas, Requisitos. NTE INEN 1572 (pp. 1-4), Quito, Ecuador: INEN.
- INN. Instituto Nacional de Normalización. (2006). Miel de Abejas. Determinación del contenido de hidroximetilfurfural. Método de espectrofotometría UV. NCh3046-2006 (pp. 1-6). Puerta Sur de Santiago, Chile: INN PTI CORFO.
- Ramírez, J.A., Ureña, J., Camacho, A. (2013). Las abejas sin aguijón de la Región Sur del Ecuador (119 pp.), Loja, Ecuador: Consejo Nacional de Educación Superior.
- Ríos, A.M., Novoa, M.L., Vit, P. (2001). Effects of extraction, storage conditions and heating

- treatment on antibacterial activity of *Zanthoxylum fagara* honey from Cojedes, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias LUZ*. XI(5), 397-402.
- Rodríguez-Malaver, A.J., Rasmussen, C., Gutiérrez, M.G., Gil, F., Nieves, B., Vit, P. (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Natural Product Communications* 4(9), 1221-1226.
- Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., Villas-Boas, J., Enríquez, E., Marchini, L., Locatelli, J., Persano-Oddo, L., Almeida-Muradian, L. Bogdanov, S., Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia* 31(12), 867-875.
- Vit, P. (1987). Utilidad de la determinación del contenido de nitrógeno en el control de calidad de mieles venezolanas. *Acta Científica Venezolana* 38 (4), 511–512.
- Vit, P. (1997). Quality factors and approach to the putative anticataract properties of stingless bee (Apidae; Meliponinae) honey from Venezuela”. PhD Thesis, School of Pure and Applied Biology. Cardiff, UK: University of Wales, 233 pp.
- Vit, P. (2004). Stingless bee honey and the treatment of cataracts. En P. Munn, R. Jones (Eds.), *Honey and Healing* (pp. 37-40), Cardiff, UK: International Bee Research Association.
- Vit, P. (2005). *Melissopalynology, Venezuela* (205 pp.) Mérida, Venezuela: APIBA-CDCHT, Universidad de Los Andes.
- Vit, P. (2008). La miel precolombina de abejas sin aguijón (Meliponini) aún no tiene normas de calidad. *Revista Boletín Centro Investigaciones Biológicas* 42(3), 415-423.
- Vit, P. (2010). Estudio incesante de Meliponini al estilo de JMF Camargo. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 41(1), 50-60.
- Vit, P. (2015). Valorización de mieles de pote producidas por abejas Meliponini en Ecuador. Ecuador: Proyecto Prometeo – Universidad Técnica de Machala.
- Vit, P., Enríquez, E., Barth, O.M., Matsuda AH, Almeida-Muradian LB. (2006). Necesidad del Control de Calidad de la Miel de Abejas sin Aguijón. *MedULA* 15, 789-796.
- Vit, P., Fernández-Maeso, M.C., Ortiz-Valbuena, A. (1998). Potential use of the three frequently occurring sugars in honey to predict stingless bee entomological origin. *Journal of Applied Entomology* 122(1), 5-8.
- Vit, P., Gutiérrez, M.G., Rodríguez-Malaver, A.J., Aguilera, G., Fernández-Díaz, C., Tricio, A.E. (2009). Comparación de mieles producidas por la abeja yateí (*Tetragonisca fiebrigi*) en Argentina y Paraguay. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 43(2), 219-226.
- Vit, P., Jacob, T. (2008). Putative anticataract properties of honey studied by the action of flavonoids on a lens culture model. *Journal of Health Science* 54(2), 196-202.
- Vit, P., Medina, M., Enríquez, E. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World* 85(1), 2-6.
- Vit, P., Ricciardelli D’Albore, G. (1994). Melissopalynology for stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) in Venezuela. *Journal of Apicultural Research* 33(3), 145-154.
- Vit, P., Rodríguez-Malaver, A., Rondón, C., González, I., García, M.Y., Di Bernardo M.L. (2010). Bioactive indicators related to bioelements of eight unifloral honeys *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60(4); 405-410.
- Vit, P., Soler, C., Tomás-Barberán, F.A. (1997). Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela. *Zeitung Lebensmittel Unters Forschung* 204(1), 43-47.
- Vit, P., Tomás-Barberán, F.A. (1998). Flavonoids in Meliponinae honey from Venezuela, related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract properties. *Zeitung Lebensmittel Unters. Forschung* 206(4), 288-293.
- Vit, P., Vargas, O., López, T.V., Maza, F. (2015). Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6), 502-506.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA), por el apoyo recibido para el grupo de investigación Apiterapia y Bioactividad (APIBA) ADG-FA-97-08. A la beca Prometeo-UTMACH junio 2014 – junio 2015 recibida por P. Vit. A la meliponicultora Sra. Marlenis Valencia (San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador) por haber donado una miel de angelita.

# Efecto de la adición de ácido ascórbico en la degradación de nitratos y nitritos en mortadela

Humberto, Ayala-Armijos<sup>1</sup>; Carlos, García González<sup>2</sup>; Raquel, Sánchez-Prado<sup>3</sup>; Yiceth Jirón-Velez<sup>4</sup>; Washington, Espinoza-Ramón<sup>5</sup>

## Resumen

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la adición de ácido ascórbico para reducir la concentración de nitritos y nitratos en mortadela. Se realizaron tres formulaciones de mortadela a las cuales se añadió tres concentraciones diferentes de ácido ascórbico (F1: 0,25 g/kg, F2: 0,50 g/kg y F3: 0,75 g/kg) y un testigo. Mediante espectrofotometría UV-Visible se cuantificó la concentración inicial y la final de nitratos y nitritos y la formación de color, y mediante voltametría se cuantificó el ácido ascórbico residual. El análisis de varianza indicó que si existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres tratamientos. Se alcanzó reducción de nitratos del 30,78% en la F1, 50% en la F2 y 76% en la F3 y valores de nitrito formado de 0,41 mg/kg en la F1, 0,24 mg/kg en la F2 y 0,04 mg/kg en la F3, en la formación de nitritos. La F3 presentó el mayor porcentaje de reducción de nitratos y la menor cantidad de formación de nitritos. En conclusión la adición de ácido ascórbico a la mortadela reduce la concentración residual de nitratos al cabo de tres días, donde ya no se presentó reducción significativa de este conservante.

**Palabras Clave:** ácido ascórbico; espectrofotometría UV-Visible; mortadela; nitritos; nitratos; voltametría.

## Effect of addition of ascorbic acid in the degradation of nitrate and nitrite in mortadella

### Abstract

The aim of this research was to evaluate the effect of the addition of ascorbic acid to reduce the concentration of nitrites and nitrates in mortadella. Three formulations of mortadella were tested to which three different concentrations of ascorbic acid (0.25 g / kg, F2: 0.50 g / kg and 0.75 g / kg F1) were added. Through UV-visible spectrophotometry it was quantified the initial and final concentration of nitrates and nitrites and color formation, and the residual ascorbic acid was quantified by voltammetry. The analysis of variance indicated that there was significant difference ( $p < 0,05$ ) among the three treatments. Nitrate reduction of 30.78% in F1, F2 50% at 76% and the values of F3 and formed nitrite 0.41 mg / kg in F1 0.24 mg / kg was achieved in F2 and 0.04 mg / kg in F3, in the formation of nitrite. F3 showed the highest percentage reduction of nitrates and the least amount of formation of nitrite. In conclusion, the addition of ascorbic acid to mortadella reduces the residual nitrate concentration after three days, where no longer significant reduction of this preservative was presented.

**Keywords:** ascorbic acid; spectrophotometry UV-Visible; mortadella; nitrites; nitrates, voltammetry.

**Recibido:** 15 de marzo de 2016

**Aceptado:** 12 de julio de 2016

<sup>1</sup>Ingeniero en Alimentos. Máster en Procesamiento de Alimentos. Docente titular de la Universidad Técnica de Machala. [jayala@utmachala.edu.ec](mailto:jayala@utmachala.edu.ec)

<sup>2</sup>Bioquímico Farmacéutico. Máster en Química Farmacéutica. Docente titular de la Universidad Técnica de Machala. [cgarcia@utmachala.edu.ec](mailto:cgarcia@utmachala.edu.ec)

<sup>3</sup>Bioquímica Farmacéutica - Universidad Técnica de Machala. [raquelsanchezprado40@gmail.com](mailto:raquelsanchezprado40@gmail.com)

<sup>4</sup>Bioquímica Farmacéutica - Universidad Técnica de Machala. [yicenandajironv@gmail.com](mailto:yicenandajironv@gmail.com)

<sup>5</sup>Ingeniero químico. Docente de la Universidad Técnica de Machala. [wespinoza@utmachala.edu.ec](mailto:wespinoza@utmachala.edu.ec)

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en octubre de 2015, basada en estudios realizados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) declaró los embutidos como cancerígenos (OMS, 2014). El uso de conservantes químicos como nitratos y nitritos en la elaboración de productos cárnicos, es imprescindible, por su acción antimicrobiana y por la coloración rosada que forma en los embutidos. La utilización de estos compuestos aunque está justificada, hay que señalar que se ha descrito para estos aditivos una problemática de tipo toxicológico, que hace cuestionar su uso en este tipo de alimento (Jakszyn, 2006).

La acción que tienen los nitritos y nitratos al inhibir a *Clostridium botulinum* (bacteria causante del Botulismo), es un argumento poderoso acerca de la necesidad de utilizarlo sin tomar en cuenta la salud del consumidor. Un factor determinante en la incidencia de la toxicidad del nitrito es la concentración de nitratos, ya que estos últimos pueden reducirse a nitritos por la acción de bacterias nitrato-reductasas. De acuerdo a estudios efectuados por la OMS y otras instituciones de salud, se ha detectado que los nitratos, al reducirse a nitritos, puede provocar la enfermedad conocida como metahemoglobinemia (Cabrera et al., 2003) (Rodríguez et al., 2012).

Aunque la formación de metahemoglobina es un proceso reversible, si puede llegar a provocar la muerte, especialmente en los lactantes. Ésta es una población de alto riesgo por tener una acidez estomacal baja, lo que permite el crecimiento de ciertos tipos de bacterias en el estómago y los intestinos, facilitando la reducción de nitratos a nitritos.

Además los nitritos originan compuestos cancerígenos denominados nitrosaminas, al reaccionar con aminas secundarias o terciarias presentes en el embutido. Las cuales pueden surgir, en el producto cárnico, lo que se conoce como nitrosación exógena y en el organismo, de manera fundamental, en la saliva y el estómago, lo que se conoce como nitrosación endógena.

Las nitrosaminas pueden ser metabolizadas a fuertes agentes alquilantes (radicales libres). Dichos agentes tienen la capacidad de reaccionar con el ADN alterando la configuración de sus bases. Investigaciones realizadas por la OMS revelan que la acumulación de radicales libres en el organismo,

puede conducir al deterioro y muerte celular, envejecimiento, estrés oxidativo, y algunos tipos de cáncer.

Las nitrosaminas han probado favorecer el cáncer oral. La producción de nitrosaminas, y su metabolismo a nivel de la cavidad oral, se relaciona íntimamente con la absorción de nitratos presentes en la dieta. En la cavidad oral, los nitratos (NO<sup>-3</sup>) son transformados en nitritos (NO<sup>-2</sup>) por la acción de bacterias nitrato-reductasas, estos reaccionan con aminas y amidas para formar nitrosaminas. La carcinogenicidad de estos compuestos puede resultar de una exposición de corta duración, a una dosis elevada o a exposición crónica a dosis relativamente bajas.

En vista de la complejidad del problema, lo que interesa es restringir la presencia de nitrosaminas y sus posibles precursores, tanto como sea posible, en los alimentos. Esto no debería ir acompañado de una pérdida de protección frente al botulismo u otros atributos y, por ello, probablemente la mejor alternativa sea la utilización de inhibidores de la nitrosación, como el ácido ascórbico.

El consumo de alimentos con ácido ascórbico disminuye el riesgo de desarrollar algunos tipos de cánceres: gástrico, y colorrectal (Zamora, 2007), considerado como uno de los más potentes agentes antioxidantes del organismo. Es una vitamina hidrosoluble y esencial. Los antioxidantes de la dieta como el carotenos, vitamina E y vitamina C pueden inhibir la formación intragástrica de esos compuestos N-nitrosos, como también neutralizar o “barrer” radicales libres y de esta manera proteger contra el cáncer gástrico.

En consecuencia, podría estudiarse la posibilidad de reducir los niveles de nitratos y nitritos adicionados hasta niveles en que solo fuesen necesarios, para desempeñar sus funciones tecnológicas. Se recomienda utilizar ácido ascórbico en la formulación de las sales del curado.

La actuación frente a la formación de nitrosaminas en los alimentos se basa en el empleo de sustancias inhibitoras y bloqueantes de la nitrosación, tales como el ácido ascórbico o vitamina C y el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E.

También ha sido observado en productos cárnicos curados, por lo que se recomienda que las mezclas empleadas en el curado de estos productos presenten ascorbatos o eritrobatos en concentraciones de 550

ppm (Ventanas & Ruiz, 2004). Rywotycki observó el aumento de los niveles de nitrosaminas en jamones pasterizados como consecuencia del empleo de polifosfatos y nitrito sódico, los cuales se reducían considerablemente con el empleo de ascorbato sódico (Ventanas & Ruiz, 2004) (Rywotycki, 2002).

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

**Localización de la Investigación.** El presente trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, localizado en el km 5 ½ vía Pasaje.

Latitud 3°17' 07,19"

Longitud 79°54' 46,17"

**Tipo de investigación.** Por ser un estudio explicativo experimental, consecuentemente, consistió en realizar una explicación del comportamiento de las concentraciones de nitratos y nitritos al variar la concentración de ácido ascórbico en el embutido. El desarrollo del diseño experimental se fundamentó en los beneficios obtenidos al reducir la concentración de NaNO<sub>3</sub>- y NaNO<sub>2</sub>- en los productos cárnicos al variar la concentración de ácido ascórbico (vit C) a tres diferentes concentraciones (0,25, 0,5 y 0,75 g/kg) (Souvik, 2016).

**Diseño del experimento.** Para el desarrollo del experimento, se elaboró una muestra testigo de mortadela la cual contuvo los ingredientes estándar para este tipo de embutido (Carne de res sin tejido conjuntivo 64%; grasa de cerdo 15%; hielo triturado 19%; sal curante 2%; azúcar 0,2%; ajo en polvo 1g/Lb; condimentos para mortadela 1g/Lb; polifosfatos 1g/Lb; emulsificantes 1g/Lb) (FAO, 2000), y tres formulaciones de mortadela en la cual solo se varió la concentración de ácido ascórbico (F1= 0,25 g/kg; F2= 0,5 g/kg; F3= 0,25 g/kg). Ver Tabla 1.

**Tabla 1. Diseño del experimento.**

Tipo de muestra	Concentración de ácido ascórbico (g/kg)
Testigo	0,0
Formulación 1	0,25
Formulación 2	0,50
Formulación 3	0,75

### Métodos analíticos

**Determinación de Nitratos en Mortadela.** El método empleado para la determinación de nitratos fue diazotación mediante de espectrofotometría UV-Visible. (INEN - 785, 2012)

La cuantificación de los nitritos mediante espectrofotometría UV-visible, se la realizó previo tratamiento de la muestra: 10 g de muestra en 90 mL de agua desionizada, se licúa, se filtra y se coloca la emulsión obtenida en tubos de 10 mL. Posteriormente se añade el reactivo (ferrocianuro potásico al 15% y acetato de zinc al 30 %) y después de 5 minutos se realiza la lectura en el equipo a 410 nm. La formación de coloración marrón indica la presencia cualitativa de nitratos (Hach Company, 2005).

**Determinación de Nitritos en Mortadela.** El método empleado para la determinación de nitritos fue la reducción de cadmio método de espectrofotometría UV-Visible (INEN - 784, 2012).

La cuantificación de los nitratos, mediante espectrofotometría UV-visible, se la realizó previo tratamiento de la muestra: 10 g de muestra en 90 mL de agua desionizada, se licúa, se filtra y se coloca la emulsión obtenida en tubos de 10 mL. Posteriormente se añade el reactivo (ferrocianuro potásico al 10% y acetato de zinc al 22 %) y después de 5 minutos se realiza la lectura en el equipo a 410 nm. La coloración verde indica la presencia cualitativa de nitritos (Hach Company, 2005).

**Determinación del Color.** El método empleado para la determinación de color fue el método de espectrofotometría UV-Visible basados en la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 784.

Se realizó el tratamiento previo a la muestra, de acuerdo a Hach Company (2005): se tritura y pesa 10 g de muestra, en 100 mL de agua desionizada, se coloca 1 mL de la solución sobrenadante en tubos de 10 mL y añade 9 mL de acetona, se deja reposar por 24 horas y mide las unidades de color a una absorbancia a 538 nm.

**Determinación de ácido ascórbico mediante Voltametría lineal.** Este método comprende un grupo técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable en la solución que se analiza.

En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, el cual

comprende: reacción de la especie electroactiva en el electrodo y mecanismo de transferencia de masa. Estos últimos pueden ser por migración (movimiento de especies por diferencia de carga), convección (movimiento de la materia por cambios físicos) y difusión (movimiento de las especies por gradiente de concentración). El equipo utilizado fue el Potenciostato Princeton Applied Research (Ortiz & Martínez, 2013). Ver Figura 1.



Figura 1. Potenciostato marca Princeton Applied Research

El método establece la concentración desconocida del analito (Ácido ascórbico) en la muestra que es analizada, agregando una cantidad definida de una solución estándar de concentración conocida. Para ello se establece una relación entre el volumen de estándar agregado y la respuesta del análisis (corriente máxima).

## 2. Resultados y discusión

### Cuantificación Inicial de la Concentración de Nitratos y Nitritos en la Mortadela

Los nitratos son empleados como conservantes de productos cárnicos. Además de proporcionar color adecuado a la carne, los nitritos tienen otros efectos sobre los alimentos: retarda el proceso de oxidación de los lípidos, con la consecuente disminución del característico olor de enranciamiento, produce una mayor firmeza en la textura, y provee a los alimentos de un importante efecto antimicrobiano (especialmente frente a *Clostridium botulinum* y sus toxinas) (Usinger, et al., 2016; Caballero, et al., 2016). En la Figura 2 se muestra las concentraciones iniciales de nitritos y nitratos del testigo y las tres formulaciones estudiadas.

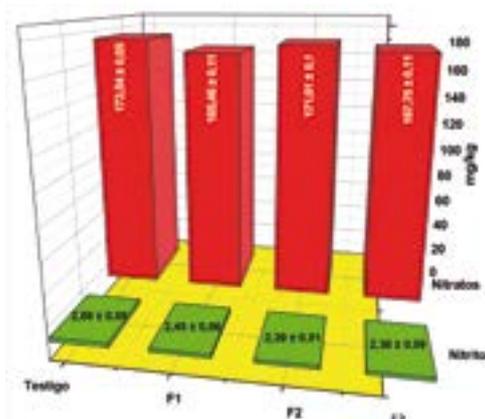


Figura 2. Concentraciones iniciales de nitratos y nitritos.

La Figura 2 indica las concentraciones iniciales de nitrato de sodio que se obtuvieron en el experimento, el testigo alcanzó la mayor concentración con 173,54 mg/kg, mientras que la F1 obtuvo 165,46 mg/kg. Además, existió una mínima degradación de los nitratos a nitritos, produciéndose 2,45 mg/kg de nitritos en la Formulación 1. (Ruíz & Jiménez, 2008; Ruíz & Jiménez, 2008)

### Cuantificación de la Concentración de Nitratos y Nitritos Después de Tres Días de Experimentación

Las normas del Codex Alimentarius para los productos cárnicos elaborados, establecen que la dosis máxima añadida de sales de nitrito de sodio y/o potasio es 175 ppm. Sin embargo, la cantidad precisa para un control efectivo del botulismo depende de cada tipo de producto en particular, siendo el nivel de nitrito residual presente en el producto determinante para impedir el crecimiento del *C. botulinum* (Dos Santos, 2010). En las Figuras 3 y 4 se muestran las concentraciones constantes a las cuales llegaron los nitritos y nitratos, de las tres formulaciones estudiadas.

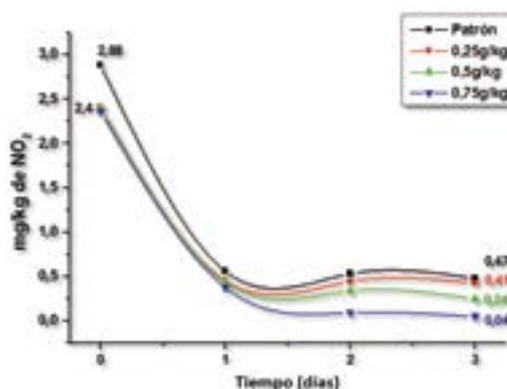


Figura 3. Concentración constante de nitritos

La Figura 3 indica las concentraciones constantes a las cuales llegaron los nitritos después de tres días de experimentación. Evidenciándose que el embutido que presentaba en su formulación 0,75 gr de ácido ascórbico degradó más a los nitritos, ya que éste inició con una concentración de 2,36 mg/kg y finalizó el día 3 con 0,04 mg/kg, en comparación al patrón (que no contiene ácido ascórbico), éste inició con una concentración de 2,88 mg/Kg y finalizó el día 3 con 0,47 mg/Kg. El ácido ascórbico y sus sales permiten una reducción en las cantidades de nitrito necesarias para el óptimo desarrollo del color. (Fatemeh, et al., 2016; Minh, et al., 2014; Chang, et al., 2016; Eric, et al., 2016)

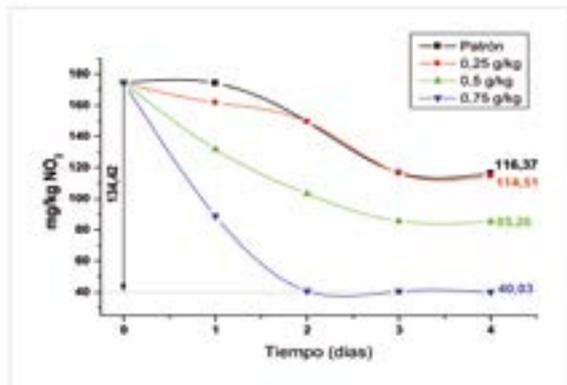


Figura 4. Reducción de la concentración nitratos hasta concentración constante.

La Figura 4 indica que el experimento, después de tres días llegó a concentraciones constantes de nitratos, alcanzando el patrón 116,37 mg/kg y la F3 40,03 mg/kg. Cuando se utiliza el nitrato como conservante este es reducido hasta óxido nitroso (NO), debido a la acción reductora que poseen las bacterias nitrato-reductasas presentes en la carne. El ácido ascórbico acelera ésta transformación (Díaz, 2002).

No se evidencia diferencia significativa en la concentración de nitrato entre el 3er y 4to día de experimentación. Los valores presentes en la Tabla 2 indican que las concentraciones de nitratos analizadas entre el día 3 y 4 no presentan diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ), entre la variable antes mencionada.

Tabla 2. ANOVA de una vía del experimento

Fuente	Día	Media NO <sup>-3</sup>	Varianza	Significancia
Testigo	3	31,31	0,01	F = 0,73
	4	31,28	0,44	<b>p = 0,43</b>
Formulación 1	3	30,75	0,41	F = 2,84
	4	30,79	0,01	<b>p = 0,16</b>
Formulación 2	3	30,75	0,41	F = 7,51
	4	30,78	0,01	<b>p = 0,05</b>
Formulación 3	3	14,10	0,30	F = 2,16
	4	10,78	0,58	<b>p = 0,21</b>

### Determinación del Porcentaje de Acidez

La acidificación es un fenómeno importante en los embutidos, ya que contribuye al enrojecimiento del producto final (Jiménez & Carballo, 1989). En la Figura 5 se muestran los porcentajes de acidez alcanzados en el experimento.

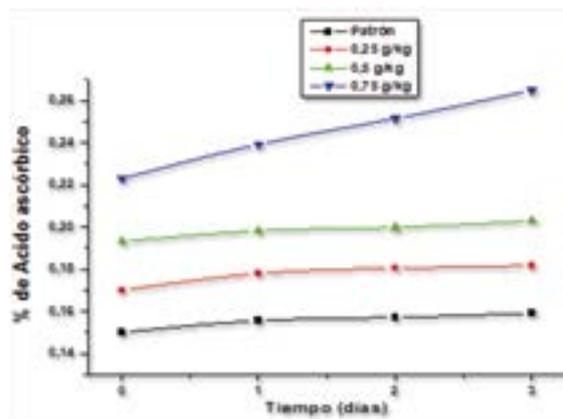


Figura 4. Reducción de la concentración nitratos hasta concentración constante.

La Figura 5 indica el % de acidez en cada una de las formulaciones durante tres días de experimentación, observándose que existió una acidez de 0,265 % que corresponde a la formulación 3 del día 3 y el porcentaje menor fue de 0,1536% que corresponde al patrón del día 0. Se evidenció que el porcentaje de acidez aumentó al transcurrir los días. Además de las bacterias que contribuyeron al enrojecimiento, se desarrolla otro importante grupo de gérmenes (bacterias acidolácticas, debido a que se degrada el glucógeno presente en la carne dando lugar a la formación de ácido láctico), acidificándose de este modo el producto final.

### Determinación del pH

La disminución de la concentración de iones hidrógenos en un embutido indica que este alimentos se está acidificando (Mansilla, 2014). En la Figura 6 se muestra los valores de pH y acidez respectivamente.

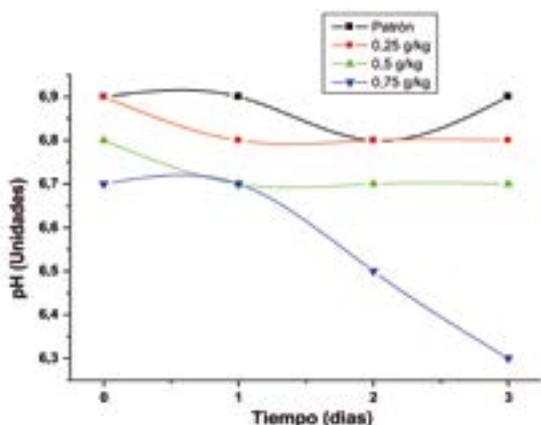


Figura 6. Comportamiento del pH durante el tiempo de experimentación

La Figura 6 indica el pH en el patrón y las tres formulaciones, durante los tres días de experimentación, observándose que el pH mayor obtenido fue de 6,9 que correspondió al patrón del día 3 y en el menor de los casos un pH de 5,6 a la formulación 3 del día 3.

### Determinación del Color

El problema práctico al que se enfrenta esta parte de la óptica es especificar los colores, es decir, que dado un color, se le pueda asignar una denominación inequívoca que dé las bases para reproducirlo con exactitud, o bien que dada una fuente de luz (primaria transmitida o reflejada por un cuerpo), se disponga de los métodos científicos para determinar su color una vez establecida la norma de especificación (Yong, 2008). En la Figura 7 se muestra los valores de las unidades de color determinados mediante espectrofotometría UV-Visible, en el patrón y las tres formulaciones.

La Figura 7 indica la formación de una gran variedad de colores en el patrón (muestra sin ácido ascórbico), mientras que en las tres formulaciones donde se incorporó el ácido ascórbico existió menos formación de colores y el color predominante en el experimento fue el rosado, alcanzando mayor intensidad en la formulación 3 (741 unidades).

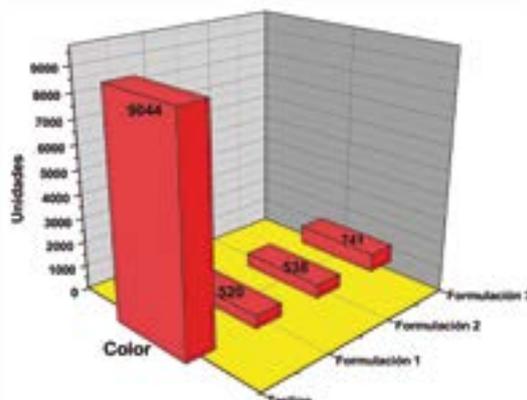


Figura 7. Medición de color en la mortadela.

### Determinación del Color

La Figura 7 indica la formación de una gran variedad de colores en el patrón (muestra sin ácido ascórbico), mientras que en las tres formulaciones donde se incorporó el ácido ascórbico existió menos formación de colores y el color predominante en el experimento fue el rosado, alcanzando mayor intensidad en la formulación 3 (741 unidades).

### Cuantificación del Ácido Ascórbico Residual en el Experimento

Las reacciones de nitrosación pueden verse afectadas por diversos agentes, como ciertos aniones y ácidos débiles, fenoles,  $\alpha$ -tocoferol propilgalato, piperacina, sin lugar a dudas el más estudiado y utilizado en la elaboración de alimentos es el ácido ascórbico, que se comporta como un potente inhibidor de la nitrosación (Ordoñez, et al., 2008). En la Figura 8 se muestra la concentración de ácido ascórbico residual.

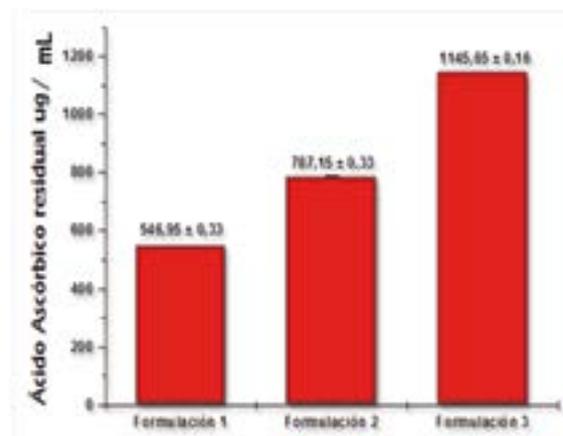


Figura 8. Concentración residual de ácido ascórbico.

La Figura 8 da cuenta que el residual de ácido ascórbico presente en la Formulación 1 (0,25 g de ácido ascórbico/kg) fue de 546,95 µg/mL, para la Formulación 2 (0,5 g de ácido ascórbico/kg) se obtuvo un residual de 787,15 µg/mL y para la Formulación 3 (0,75 g de ácido ascórbico/kg) su residual fue de 1145,65 µg/mL.

### III. CONCLUSIONES

Mediante espectrofotometría UV-visible se analizaron cuatro diferentes formulaciones, obteniéndose concentraciones finales de nitratos, en el caso de la muestra patrón fue de 116,37 mg/kg, esto representa una reducción aproximada del 33 %, mientras que para la formulación 3 se obtuvo 30,05 mg/Kg, esto representa una reducción del 75 %. Con esto puede concluirse que la adición de ácido ascórbico en la mortadela favorece a la reducción de los niveles residuales de nitratos y nitritos, limitando así el potencial de formación de nitrosaminas cancerígenas. (Ibañez, et al., 2003; Butler, 2015)

Al reducir las concentraciones de nitratos y nitritos en un 75% en la mortadela, se bloquea el mecanismo químico para la formación de nitrosaminas, en la F3 (0,75 g/kg) el ácido ascórbico se disminuyó en 99,84%, lo cual indica que casi en su totalidad reaccionó con el nitrato, debido a su alto poder reductor y gran efectividad como aceleradores de la oxidación de los nitratos y nitritos y se transformó en dihidroascorbato (Honikel, 2008; Redondo, et al., 2013).

El pH disminuyó al transcurrir los días de experimentación, observándose un pH de 6,9 en la muestra patrón en el día 3 y Ph 5,6 correspondiente a la formulación 3 en el día 3. El pH desciende con el aumento de la acidez y de la concentración de ácido ascórbico, contribuyendo a la formación del color, olor y sabor característicos del producto, a pH menores a 5,5 se bloquea la reducción de nitratos a nitritos y la coloración es nula. (Holmgaard, et al., 2013)

La F3 presentó el mayor % de reducción de nitratos y la menor cantidad de formación de nitritos. En conclusión la adición de ácido ascórbico a la mortadela reduce la concentración residual de nitratos al cabo de tres días, donde ya no se presentó reducción significativa ( $p > 0,05$ ) de este conservante.

El análisis del colorimetría en la muestra patrón (muestra sin ácido ascórbico), presentó una gran variedad de colores mientras que en las tres formulaciones donde se incorporó el ácido ascórbico existió menos formación de colores y el color predominante y de mayor intensidad

fue el rosado.

### IV. REFERENCIAS

- Butler, A. (2015). Nitrites and nitrates in the human diet: Carcinogens or beneficial hypotensive agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 167, 105-107.
- Caballero, B., Fingla, P., & Toldra, F. (2016). Nitrites and Nitrates. *Encyclopedia of Food and Health*.
- Cabrera, E., Hernández, L., Gómez, H., & Cañizares, M. (2003). Determinación de nitratos y nitritos en Agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 47(1), 88-93.
- Calderón, D., Villegas, M., Rodríguez, R., Hernández, E., & Santamaría, D. (2005). Nuevo método de cromatografía de líquidos para medición de nitritos y nitratos en cerebro de rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(2), 10-15.
- Chang, S., Ismail, A., & Daud, D. (2016). Ascorbic Acid: Properties, Determination and Uses. *Encyclopedia of Food and Health*, 275-284.
- Díaz, O. (Enero de 2002). Efecto de la adición de proteasas en el proceso madurativo de los embutidos crudos curados. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.
- Dos Santos, M. (2010). Cuantificación espectrofotométrica de nitritos en embutidos de carne producidos en Angola. *Revista Cubana de Química*, 22(3), 99-102.
- Eric, P., Viv, B., Sorn, N., Hopkins, D., Tim, P., & Jacobs, J. (2016). Muscle antioxidant (vitamin E) and major fatty acid groups, lipid oxidation and retail colour of meat from lambs fed a roughage based diet with flaxseed or algae. *Meat Science*, 111, 154-160.
- FAO. (2000). Procesamiento de carnes. *PRODAR-IICAc*.
- Fatemeh, R., Fariba, Z., Ebrahim, H., Homa, B., & Sobhan, S. (2016). Oxidation phenomena and color properties of grape pomace on nitrite-reduced meat emulsion systems. *Meat Science*, 121, 350-358.
- Hach Company. (2005). Determinación de Nitritos, Nitratos y Color. Manual del Espectrofotómetro UV-Visible.
- Holmgaard, K., Lindahl, G., Karlsson, A., Lloret, E., Gou, P., Arnau, J., & Orlien, V. (2013). The effect of high pressure and residual oxygen on the color stability of

- minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 95(2), 433–443.
- Honikel, K.-O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68–76.
- Ibáñez, F. C., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). *Aditivos Alimentarios*. Universidad Pública de Navarra-Área de Nutrición y Bromatología, 7.
- INEN - 784. (2012). *Productos carnicos: Determinación de nitratos*. Norma Técnica Ecuatoriana INEN 785.
- Jakszyn, P. (2006). *Nitrosaminas y riesgo de cáncer gástrico*. Tesis de doctorado. Universidad de Pompeu Fabra. Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud.
- Jiménez, F., & Carballo, J. (1989). *Principios básicos en la elaboración de embutidos*. Madrid: Rivadcneyra, S. A.
- Mansilla, G. (2014). Potencial de hidrogeniones pH. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 40(40), 2076-2082.
- Minh, H., Bekhit, A. E.-D., & Carne, A. (2014). Effects of L- and iso-ascorbic acid on meat protein hydrolyzing activity of four commercial plant and three microbial protease preparations. *Food Chemistry*, 149, 1-9.
- OMS. (2014). *La OMS declara cancerígena la carne procesada*. Ginebra, Suiza.
- Ordoñez, J., Anadón, A., Arboix, M., Centrich, F., Juárez, M., Palou, A., Suárez, L., Blanch, A., Marín, M. (2008). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN en relación con el riesgo de la posible presencia de N-Nitrosaminas en productos cárnicos crudos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 8, 9-40.
- Ortiz, R., & Martínez, Y. (2013). *Voltimetría*. Mérida: Universidad de los Andes-Laboratorio de Análisis Instrumental.
- Redondo, S. M., Valenzuela, M. C., Cassada, D., Snow, D., Juneja, V., Burson, D., & Thippareddi, H. (2013). Effect of meat ingredients (sodium nitrite and erythorbate) and processing (vacuum storage and packaging atmosphere) on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in ham during abusive cooling. *Food Microbiology*, 35(2), 108-115.
- Rodríguez, S., Gauna, L., Martínez, G., Acevedo, H., & Romero, C. (2012). Relación del nitrato sobre la contaminación bacteriana del agua. *Terra Latinoamericana*, 30(2), 111- 119.
- Ruiz, C., & Jiménez, F. (2008). Aplicación del análisis de inyección de flujo (FIA) a la determinación de nitratos y nitritos en productos cárnicos. *Eurocarne*, 18(171), 51-58.
- Ruiz, C., & Jimenez, F. (2008). Review: Determination of preservatives in meat products by flow injection analysis (FIA). *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25(10), 1167 - 1178.
- Rywotycki, R. (2002). The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham. *Revista Meat Sci.*, 60(4), 335-339.
- Souvik, C. R. (2016). Sequential experimental design based generalised ANOVA. *Journal of Computational Physics*, 317, 15-32.
- Usinger, E., Larson, E., Niebuhr, S., Fedler, C., Prusa, K., Dickson, J., Rodrigo, T., Sebranek, J. (2016). Can supplemental nitrate in cured meats be used as a means of increasing residual and dietary nitrate and subsequent potential for physiological nitric oxide without affecting product properties. *Meat Science*, 121, 324-332.
- Ventanas, S., & Ruiz, J. (Octubre de 2004). Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (II). Estrategias de actuación y métodos de análisis de nitrosaminas. *Revista Eurocarne*, 14(130), 37-49.
- Yong, K. L. (2008). Influence of filler on the difference between the transmitted and reflected colors of experimental resin composites. *Dental Materials*, 49(254), 1243–1247.
- Zamora, J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1), 17-26.

# Efecto de la nisina sobre la conservación del helado tipo italiano

Efrain, Romero-Machado<sup>1</sup>; Eduardo, Héctor-Ardisana<sup>2</sup>

## Resumen

La nisina, antibiótico sintetizado por *Lactococcus lactis*, se ha empleado en la conservación de numerosos alimentos; sin embargo, no existen antecedentes de su uso en la preservación de helados. En este trabajo se investiga el efecto de la nisina en la conservación del helado tipo italiano. Se diseñaron cuatro tratamientos (control sin nisina, y nisina 10, 50 y 100 ppm). A los 0, 30, 60 y 90 días se determinó la presencia de *E. coli*, *Salmonella*, coliformes y aerobios mesófilos por técnicas microbiológicas. Se evaluaron las siguientes propiedades organolépticas: aspecto superficial, dureza, presencia de hielo, cremosidad, gomosidad, presencia de grasa, presencia de espuma, sabores extraños y dulzura. La evaluación fue realizada por un panel de 15 catadores, mediante escalas hedónicas. No se detectó *Salmonella*, *E. coli* o coliformes en las muestras, al parecer por la asepsia de las materias primas, el proceso de elaboración y el almacenamiento a bajas temperaturas. La nisina redujo el crecimiento de los aerobios mesófilos, particularmente a los 90 días. El tratamiento con nisina no provocó cambios importantes en las propiedades organolépticas, excepto en la dulzura a partir de los 60 días, probablemente debido a la incorporación al helado de productos de la desintegración celular microbiana.

**Palabras Clave:** conservación; control de microorganismos; helado tipo italiano; nisina; propiedades organolépticas.

## Effects of nisin on the preservation of italian style ice cream

### Abstract

Nisin, antibiotic synthesized by *Lactococcus lactis*, has been widely used in food conservation; however, there is no history of its use in the preservation of ice cream. This study aimed to investigate the effect of nisin in preserving Italian style ice cream. Four treatments (control without nisin, and nisin 10, 50 and 100 ppm) were designed. The presence of *E. coli*, *Salmonella*, coliforms and mesophilic aerobics was determined by microbiological techniques at 0, 30, 60 and 90 days. The following organoleptic properties were evaluated: surface appearance, hardness, presence of ice, creamy, gumminess, presence of fat, presence of foam, strange flavors and sweetness. The evaluation was carried out by a panel of 15 tasters, using hedonic scales. No *Salmonella*, *E. coli* or coliforms were detected in the samples, apparently for the cleanliness of raw materials, the process of preparation and storage at low temperatures. Nisin reduced the growth of aerobic mesophilic bacteria, particularly at 90 days. Nisin treatment did not cause significant changes in the organoleptic properties, except for sweetness after 60 days, probably due to the incorporation into the ice cream of products from microbial cell disintegration.

**Keywords:** nisin; Italian style ice cream; conservation; microorganisms control; organoleptic properties.

**Recibido:** 15 de agosto de 2015

**Aceptado:** 3 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Docente investigador de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, (ESPOCH), Ecuador. Licenciado en Gestión Gastronómica, Máster en Procesamiento de Alimentos. rodrigoromerom@hotmail.es

<sup>2</sup>Docente investigador de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, (ESPOCH), Ecuador. Ingeniero Agrónomo. PhD en Ciencia Agrícolas. ehectorardisana@gmail.com

## I. INTRODUCCIÓN

El helado tipo italiano se elabora con ingredientes como leche, nata, varios azúcares y aromas, incluyendo frutas y frutos secos (Correu, 2010). Se diferencia del resto de los helados por varias razones como: posee un menor contenido de grasa butírica, de 4 a 8 %; suele ser bajo en azúcar, entre 16 y 22 %, estando esta cantidad cuidadosamente equilibrada con el agua para evitar que ésta se hiele; los tipos de azúcar empleados son la sacarosa y la dextrosa, usándose azúcar invertido para controlar el dulzor del producto final, y contiene una base estabilizadora, que suele ser yema de huevo, en los sabores basados en crema amarilla.

Los productos alimenticios son un medio propicio para el crecimiento de microorganismos que dañan su composición y en muchos casos son nocivos para el consumidor. De ahí que se utilicen diversas técnicas y sustancias de diferente naturaleza, para lograr su preservación del ataque de microbios. Entre los compuestos más usados en la conservación de alimentos se encuentra la nisina, que es un antibiótico peptídico policíclico sintetizado de forma natural por la bacteria *Lactococcus lactis*. Esta molécula contiene diversos aminoácidos (como la lantionina y el  $\beta$ -metil-lantionina). Única aplicada a nivel comercial como bio-conservador de alimentos, en más de 50 países, con una efectividad comprobada, es además considerado como producto seguro con nivel GRAS (Generally Recognized As Safe) y con autorización para su aplicación por la FDA (Food and Drug Administration) (Chen & Hoover, 2003).

La nisina se ha empleado con éxito en la conservación de alimentos cárnicos, vegetales y principalmente en la industria quesera (Ross, 2005). Sin embargo, no existen antecedentes de su uso en la preservación de helados. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la nisina en el control de microorganismos y las propiedades organolépticas del helado tipo italiano, con vistas a su posible uso como conservante de este alimento.

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

#### Materiales y Métodos

La formulación del helado se realizó según una variante de lo propuesto por Villacís (2010), (Figura 1).



Figura 1. Procedimiento para la formulación del helado

La nisina empleada fue la comercializada por Lactocomerce S.A, se añadió en proporciones de 0 (tratamiento control), 10, 50 y 100 ppm, en el momento de la pasteurización. El helado fue almacenado a -170 C. A los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento, se evaluó el efecto de la nisina sobre el control de microorganismos, para lo cual se utilizaron los procedimientos descritos en las normas técnicas ecuatorianas:

- Microorganismos coliformes: NTE INEN 1 529-7 (INEN, 1990a)
- *E. coli*: NTE INEN 1 529-8 (INEN, 1990b)
- *Salmonella*: NTE INEN 1 529-15 (INEN, 2009)
- Aerobios mesófilos: NTE INEN 1 529-5 (INEN, 2006)

En los mismos momentos de muestreo se evaluaron las siguientes propiedades organolépticas: aspecto superficial, dureza, presencia de hielo, cremosidad, gomosidad, presencia de grasa, presencia de espuma, sabores extraños y dulzura. El panel estuvo compuesto por 15 miembros, profesores de Gastronomía de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ESPOCH

(Ecuador). Las muestras se tomaron con una cuchara para helado; se tomó y colocó una bola de helado en una copa y entregó a cada miembro del panel, a una temperatura ambiente entre 16 y 270 C. La temperatura de servicio del helado fluctuó entre -60 y -100 C. Para la evaluación se emplearon escalas hedónicas (Tabla 1).

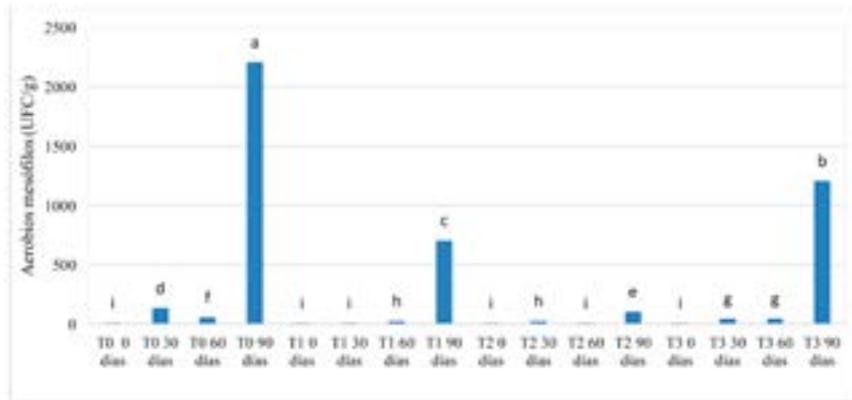
**Tabla 1. Escalas hedónicas para la evaluación de las propiedades organolépticas**

Propiedad	Escalas				
Aspecto superficial	Mate (5)	Brillante (3)	Con líquido (2)		
Dureza	Muy Duro (1)	Poco Duro (3)	Adecuado (5)	Blando (3)	Muy Blando (1)
Presencia de hielo	Nulo (5)	Muy Ligero (4)	Ligero (3)	Definido (2)	Pronunciado (1)
Cremosidad	Adecuado (5)	Poco Cremoso (3)	Acuoso (1)		
Gomosidad	Nula (5)	Ligera (3)	Pronunciada (1)		
Presencia de grasa	Nula (5)	Ligera (3)	Pronunciada (1)		
Presencia de espuma	Muy Compacto (1)	Compacto (3)	Adecuado (5)	Espumoso (3)	Muy Espumoso (1)
Derretimiento	Muy Rápido (1)	Rápido (3)	Adecuado (5)	Lento (3)	Muy Lento (1)
Sabores extraños	Ninguno (5)	Ligero (3)	Pronunciado (1)		
Dulzura	Muy Dulce (1)	Dulce (3)	Adecuada (5)	Poco Dulce (3)	Desabrido (1)

Los datos de control de microorganismos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación doble (4 tratamientos x 4 tiempos de almacenamiento); se tomaron 4 muestras (repeticiones) por cada combinación tratamiento x tiempo de almacenamiento; las medias se compararon a través de la prueba de Tukey con  $p \leq 0,05$ . Para las propiedades organolépticas se consideraron 15 repeticiones (miembros del panel); los datos se procesaron a través de la prueba de Kruskal-Wallis con  $p \leq 0,05$ . En el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistic v. 20.

**2. Resultados**

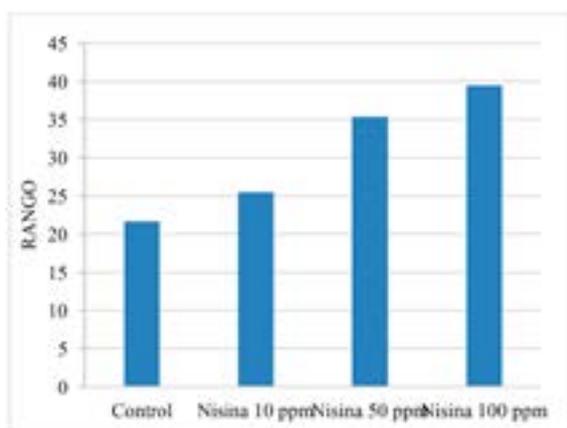
**Efecto de la nisina sobre el control de microorganismos:** los exámenes microbiológicos en el laboratorio, a partir de las muestras tomadas a los 0, 30, 60 y 90 días, en los tratamientos que contenían nisina y el control sin el antibiótico, evidenciaron total ausencia de *Salmonella*, coliformes y *E. coli*. Ello demostró que el producto fue elaborado con todas las normas de seguridad e higiene. En cambio, se observó el crecimiento de aerobios mesófilos en todos los casos (Figura 2), con los valores más altos, en las muestras tomadas a los 90 días, en cada uno de los tratamientos.



Legenda: T0: sin nisina; T1: nisina 10 ppm; T2: nisina 50 ppm; T3: nisina 100 ppm a los 0, 30, 60 y 90 días (letras desiguales indican diferencias significativas para la prueba de Tukey con  $p \leq 0.05$ ).

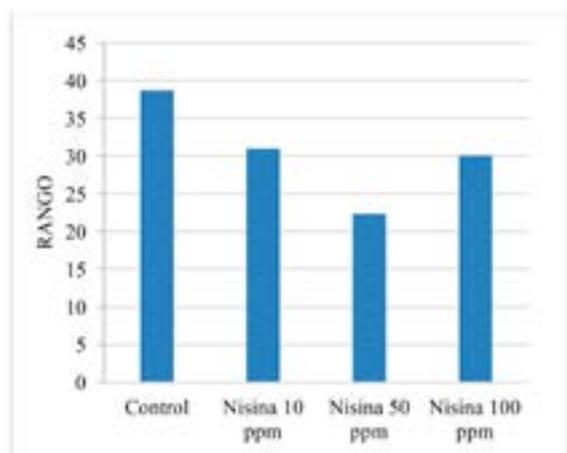
**Figura 2. Presencia de aerobios mesófilos en las muestras tomadas de los tratamientos**

**Efecto de la nisina sobre las propiedades organolépticas:** no se encontraron variaciones entre el control y los tratamientos con nisina en las variables dureza, presencia de hielo, cremosidad, gomosidad, presencia de grasa y derretimiento. Para la variable “aspecto superficial”, a los 60 días se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores mayores de esta variable ocurrieron en los tratamientos con mayor concentración de nisina, clasificando como “adecuado”, dentro del rango de la correspondiente escala hedónica (Figura 3).



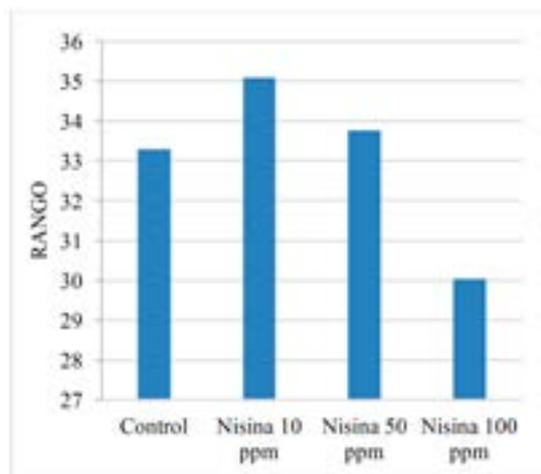
**Figura 3. Aspecto superficial del helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 60 días.**  $X^2: 11,653$   $A: 0,009$ .

Para la variable “presencia de espuma” a los 90 días se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El menor valor se obtuvo con el tratamiento de nisina 50 ppm, clasificando dentro del rango de la escala hedónica como “espumoso” (Figura 4).



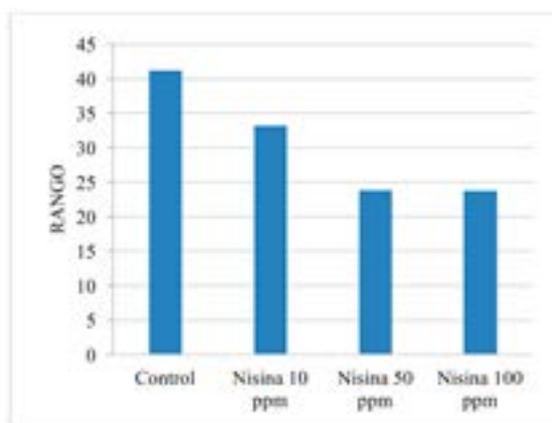
**Figura 4. Presencia de espuma en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 90 días.**  $X^2: 8,578$   $A: 0,035$ .

A los 0 días, se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos para la variable “sabores extraños”. El menor valor otorgado por los panelistas se obtuvo con el tratamiento de nisina 100 ppm, clasificándolo en la categoría “ligeros”, en la escala hedónica (Figura 5).

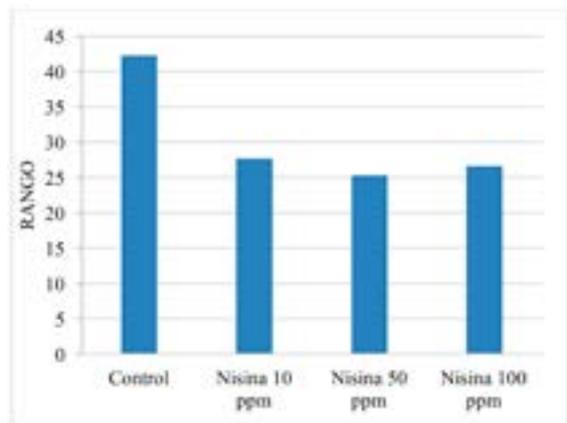


**Figura 5. Presencia de sabores extraños en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 0 días.**  $X^2: 10,934$   $A: 0,012$ .

No se encontraron diferencias significativas para la variable “dulzura” entre el control y los tratamientos con nisina a los 0 y 30 días. Sin embargo, a los 60 y 90 días hubo diferencias entre los tratamientos, correspondiendo en ambos casos los mayores valores (categoría “adecuada” de la escala hedónica) al tratamiento control (Figuras 6 y 7).



**Figura 6. Dulzura en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 60 días.**  $X^2: 13,318$   $A: 0,004$ .



**Figura 7. Dulzura en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 90 días.  $\chi^2$ : 10,684 A: 0,014.**

### 3. Discusión

**Efecto de la nisina sobre el control de microorganismos:** en los análisis efectuados no se detectó, en ninguna de las muestras estudiadas, la presencia de *E. coli*, *Salmonella* o coliformes.

Otros autores, que han estudiado el efecto de la nisina sobre el crecimiento de estos géneros microbianos en otros alimentos, han obtenido resultados similares. La nisina inhibe el crecimiento de *Staphylococcus* y *Salmonella* en carne de cangrejo (De Lima & Goriach-Lira, 2005); impide el desarrollo de *Staphylococcus* en queso de mano preservado con este antibiótico natural (Maldonado & Llanca, 2007). En el queso “telita” tratado con nisina, no se detectó *Salmonella* ni *L. monocytogenes*, y las cantidades de *Staphylococcus* presentes fueron significativamente menores que en el control no tratado (Márquez & García, 2007); tampoco se observó crecimiento de *Staphylococcus* ni de coliformes en queso blanco tratado con nisina (Castro et al, 2009).

Los resultados de estos autores pueden parecer contradictorios, lo cual se debería al hecho que los *Staphylococcus* son bacterias Gram positivas, mientras *Salmonella* y *E. coli* son bacterias Gram negativas, y dado que la nisina no tiene efecto sobre este último tipo de microbios (QuimiNet, 2006), es poco probable esperar que de haber estado presentes, ésta bacteriocina hubiera podido controlarlos. Pero esta afirmación tampoco es absoluta: se ha demostrado también, que un choque térmico puede aumentar la sensibilidad de la célula bacteriana Gram negativa a la nisina, aunque el efecto ocurre mayormente cuando la bacteriocina está presente durante el tratamiento

térmico y no cuando se adiciona después, debido a que las células pueden recuperarse del efecto negativo causado por las temperaturas elevadas (Boziaris & Adams, 2001). Bajo estos supuestos, la pasteurización del helado junto con la nisina, desarrollada en la formulación del helado para esta investigación, podría haber contribuido al control de estas bacterias Gram negativas.

No obstante, como no se advirtió presencia de microorganismos de estos géneros en ninguna de las muestras tomadas y en los controles en los diferentes tiempos de almacenamiento, es imposible, partiendo de los resultados experimentales, señalar a la nisina como causante del control de estos géneros microbianos. La ausencia de estos microorganismos, parece más probable, sea consecuencia de las adecuadas condiciones higiénicas de las materias primas, la preparación de la mezcla y conservación del helado. Estas bacterias, además, son termotróficas (Mossel, Moreno & Struijk, 2003), por lo que su presencia era poco probable, dado las bajas temperaturas a las que se almacena el helado (si la pasteurización ha sido adecuada). Por último, un estudio más detallado a través de la inoculación de cantidades conocidas de estos microorganismos, podría contribuir al análisis del efecto de la nisina sobre ellos.

En cambio, llama la atención que los mayores valores de microorganismos aerobios mesófilos se hayan alcanzado en todos los tratamientos a los 90 días (el máximo tiempo de conservación estudiado), y que el empleo de la nisina, en las tres concentraciones ensayadas, haya conducido a valores significativamente menores que los alcanzados por el control sin nisina, a los 90 días de almacenamiento.

En investigaciones realizadas sobre la conservación de otros alimentos, el efecto inhibitorio de la nisina sobre la cantidad de aerobios mesófilos presentes en el queso blanco, persistió durante los 10 días de almacenamiento del producto (Castro et al, 2009); en salchichas tratadas con nisina, aparecían menos aerobios mesófilos que en el control no tratado (Villarreal, 2006); resultados similares se obtuvieron al emplear la nisina como preservante en hamburguesas (Gómez et al, 2013).

Los aerobios mesófilos son microorganismos que viven en presencia de oxígeno, a temperaturas de rango medio. Según Food News Latam (2015),

un crecimiento elevado de estos microbios puede significar:

- . Excesiva contaminación de la materia prima.
- . Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
- . La posibilidad que existan patógenos, pues estos son mesófilos.
- . La inmediata alteración del producto.

El recuento de mesófilos, por lo tanto, es un indicador de las condiciones de salubridad de los alimentos. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento es posible que la cantidad de unidades formadoras de colonias de estos se incremente, y el hecho que a los 90 días el empleo de la nisina haya conducido a conteos significativamente menores, que los del control sin nisina, abre una posibilidad para la conservación del helado tipo italiano con la ayuda de esta bacteriocina. No obstante, se requerirán estudios más detallados sobre las concentraciones de nisina a emplear y los tiempos a los que es efectiva para llegar a una mayor precisión sobre sus posibilidades de uso generalizado.

**Efecto de la nisina sobre las propiedades organolépticas:** aunque se encontraron diferencias entre el control y los tratamientos con nisina en las propiedades “presencia de espuma” a los 90 días, y “sabores extraños” a los 0 días de almacenaje, los resultados más preocupantes a los efectos del empleo de esta bacteriocina en la conservación del helado italiano, están relacionados con los cambios en la dulzura a los 60 y 90 días de almacenaje, en los tratamientos con nisina.

Una vez más, los resultados obtenidos por otros autores, en cuanto a la acción de la nisina sobre las propiedades organolépticas de productos alimenticios son contradictorios. En salchichas, el tratamiento conservante con nisina no causó variaciones significativas en el color, sabor y apariencia (Villarreal, 2006). Tampoco se produjeron alteraciones en el sabor del queso “telita” elaborado con nisina con respecto al control (Sangronis & García, 2007). Sin embargo, en hamburguesas, el empleo de nisina redujo los valores de textura y sabor a rangos intermedios, aunque los mantuvo dentro de los límites aceptables (Gómez et al, 2013). Al utilizarla en la carne de pollo no se encontraron diferencias en el olor y el color, pero sí en la textura, el sabor y la aceptabilidad (Moreno, 2012).

Aunque en esta investigación no se realizaron estudios en este sentido, una posible causa de este cambio

en la dulzura puede buscarse en el propio modo de acción bactericida de la nisina. Se conoce que esta bacteriocina provoca la vesiculación del citoplasma, la formación de poros y la desintegración de la célula microbiana (Bizani et al, 2005), como resultado de lo cual el jugo celular se incorpora al medio exterior, en este caso el helado. Los productos celulares así incorporados y acumulados en el tiempo –obsérvese que las diferencias aparecieron a partir de los 60 días- podrían ser los responsables de la variación en la dulzura en el helado.

En todo caso, la ausencia de estudios previos en helados, y en particular en los de tipo italiano, sugieren precaución en el empleo de la nisina para propósitos de conservación de este producto alimenticio, y realizar investigaciones más amplias y detalladas con este fin.

### III. CONCLUSIONES

La ausencia de *Salmonella*, *E. coli* y coliformes en las muestras de helado tipo italiano, al parecer no es consecuencia de la aplicación de la nisina como agente conservante, sino de las adecuadas condiciones asépticas de las materias primas, el proceso de elaboración y el almacenamiento del producto a bajas temperaturas. El empleo de nisina fue efectivo en la reducción del crecimiento de los aerobios mesófilos, en particular a los 90 días de almacenamiento del helado tipo italiano. El tratamiento con nisina no provocó variaciones importantes desde el punto de vista práctico en las propiedades organolépticas del helado tipo italiano, excepto por la variación en su dulzura a partir de los 60 días, lo cual probablemente se deba a la incorporación al helado de productos de la desintegración celular microbiana que causa esta bacteriocina.

### IV. REFERENCIAS

- Bizani, D., Motta, A. S., Morrissy, J. A., Terra, R. M., Souto, A. A. y Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8 (2), 125-131.
- Bozariis, I. S. y Adams, M. R. (2001). Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 715-724.
- Castro, G., Valbuena, E., Bríñez, W., Sánchez, E., Vera, H. y Tovar, A. (2009). Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la biopreservación de queso blanco. *Revista*

- Científica FCV-LUZ*, XIX (2), 201-209.
- Chen, H. y Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (3), 82-106.
- Correu, A. (2010). ¿Cuál es la diferencia entre el gelato italiano y el helado tradicional? Recuperado de <http://www.lagourmandise.org/>
- De Lima, T. C. S., y Gorlach-Lira, K. (2005). Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 151-156.
- FoodNewsLatam(2015). ¿Qué son los aerobios mesófilos? Recuperado de <http://www.foodnewslatam.com/inocuidad/53-control-calidad/2499-%C2%BFque-son-los-aerobios-mesofilos.html>
- Gómez, L., Ponce-Alquizira, E., Freitas, R. E. y Rubio, M. S. (2013). Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4 (3), 255-270.
- INEN (1990a). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-7:1990. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias. Recuperado de <http://archive.org/details/ec.nte.1529.7.1990>
- INEN (1990b). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-8:1990. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E. coli*. Recuperado de <http://archive.org/stream/ec.nte.1529.8.1990#page/no/mode/2up>
- INEN (2006). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-5:2006. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Recuperado de <http://www.google.com.ec/#q=nte+inen+1529-5>
- INEN (2009). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-15:2009. Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*. Método de detección. Recuperado de <http://archive.org/stream/ec.nte.1529.15.1996#page/no/mode/2up>
- Maldonado, R. y Llanca, L. (2007). Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*, 33, 147- 163.
- Márquez, J. G. y García, C. E. (2007). Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo 'telita' elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27, 108-111.
- Moreno, C. P. (2012). Estudio del efecto combinado de nisina y ácido láctico en la vida útil de carne de pollo (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Mossel, D. A. A., Moreno, B. y Struijk, C. B. (2003). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acrivia.
- QuimiNet (2006). La nisina como conservador alimenticio. Recuperado de <http://www.quiminet.com/articulos/la-nisina-como-conservador-alimenticio-5120.htm>
- Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Sangronis, E. y García, J. (2007). Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". *Anales Venezolanos de Nutrición*, 20(1), 12-16.
- Villacís, E. A. (2010). Formulación de helados aptos para diabéticos (tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Guayaquil, Ecuador.
- Villarroel, P. A. (2006). Evaluación de tres tratamientos postpasteurización en salchichas tipo hot dog marca Zamorano (tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

# Procesamiento del Té Verde, enriquecido con Vitamina C y Superóxido Dismutasa para la obtención de una bebida funcional antioxidante

Carlos, Rivera-Loja<sup>1</sup>; María, Carrillo-Rodríguez<sup>2</sup>; Nibia, Novillo-Luzuriaga<sup>3</sup>; Roddy, Peñafiel-León<sup>4</sup>; Fernando, Landines-Vera<sup>5</sup>.

## Resumen

Existen estudios que analizan el impacto de los antioxidantes frente a los radicales libres, los cuales neutralizan el exceso de los mismos para proteger las células de sus efectos dañinos y prevenir el desarrollo de enfermedades. En este trabajo se presentan los resultados de la elaboración de una bebida funcional a base de té verde, a la cual se añadió Superóxido Dismutasa y Vitamina C, con el fin de determinar el efecto antioxidante. Se estudiaron los principales componentes antioxidantes del té verde. Una vez elaborado el producto se valoró su estabilidad, natural y acelerada, con resultados dentro de los rangos establecidos. Se usó como instrumento de análisis el HPLC, para la determinación de Superóxido Dismutasa y para la valoración de ácido ascórbico se usó el método volumétrico, ambos establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Se concluye que es posible desarrollar la bebida, debido a que la estabilidad de la SOD fue adecuada para el producto desarrollado a lo largo de los tres meses de su estudio.

**Palabras Clave:** enfermedades; estabilidad; radicales libres; superóxido dismutasa.

## Processing of Green Tea, enriched with Vitamin C and Superoxide dismutase for the obtainment of an antioxidant functional Drink

### Abstract

There are studies that analyze the impact of antioxidants against free radicals which neutralize their excess, to protect cells from its harmful effects and prevent the development of disease. In this paper, the results of the development of a functional drink based on green tea, which was added with superoxide dismutase and vitamin C in order to determine the antioxidant effect are presented. The main antioxidant components of green tea were studied. Once the product was developed its stability was assessed, both natural and accelerated, giving results according to required specifications; HPLC was the equipment used for determination of Superoxide Dismutase and for the assessment of ascorbic acid, the volumetric methods were used, both established in the United States Pharmacopeia (USP). It is concluded that it is possible to develop the drink, because the stability of the SOD was suitable for the product developed over three months of study.

**Keywords:** free radicals; stability; diseases; superoxide dismutase.

**Recibido:** 15 de junio de 2016

**Aceptado:** 28 de julio de 2016

<sup>1</sup>Químico Farmacéutico. Jefe de Producción, Laboratorios Rocnarf. leosrivera1983@outlook.com. Docente de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

<sup>2</sup>Químico Farmacéutico. maria.carrillor@ug.edu.ec

<sup>3</sup>Docente de la Universidad Estatal de Milagro, Ecuador. Directora de la Carrera Licenciatura en Nutrición Humana. nnovillo@unemi.edu.ec

<sup>4</sup>Docente de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Guayaquil, Ecuador. Director Maestría en Procesamiento y Conservación de Alimentos. rigoberto.penafiel@ug.edu.ec

<sup>5</sup>Docente de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Guayaquil, Ecuador. edgar.landinesv@ug.edu.ec

## I. INTRODUCCIÓN

Las múltiples actividades cotidianas y el estrés del ritmo de vida actual, junto con el crecimiento demográfico, la vida sedentaria, además del consumo de alimentos procesados, y otros factores son algunos de los causantes que el organismo sea sometido a situaciones que lo exponen a la generación de radicales libres. Para Cheesman & Slater (1998), desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generadora gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar.

Para Naqui, et. al. (1986) desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno.

Varios estudios científicos confirman que existe una clara relación entre la producción de radicales libres y el cáncer, además de otras patologías degenerativas. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN. Asimismo él indica que en América Latina y el Caribe existen por cada 100.000 habitantes, 163 cuadros de cáncer en toda la región. Además, las investigaciones estiman que si no se hace algo pronto, para 2030 habrá 1,7 millones de casos de cáncer diagnosticados y que un millón de individuos morirán al año por alguna forma de esta enfermedad. El cáncer en Ecuador es desde hace algunos años un

problema importante de Salud Pública; en el país, en 1980, “seis de cada 100 defunciones eran provocadas por cáncer”. En 2010, ese porcentaje subió a 16 casos por cada 100 habitantes; de estos, la mayor parte se concentra en Quito y Guayaquil (Lupera, 2013).

Entre los estudios que han analizado el impacto de los antioxidantes frente a los radicales libres, se encuentra el Estudio Demográfico General de Linxian (SIIC, 2002) sobre Intervención en la Nutrición; el cual, fue el primer estudio aleatorizado a gran escala para investigar los efectos de complementos de antioxidantes en el riesgo de cáncer. En 2009, se dio un informe de los resultados de este estudio a 15 años (10 años después de dejar de tomar los complementos de antioxidantes). En los resultados actualizados, “ya no se encontró un riesgo menor de morir por cáncer de estómago para quienes tomaron los complementos de antioxidantes en comparación con quienes no los tomaron”.

Con tales antecedentes, se planteó la idea de desarrollar una bebida funcional antioxidante a base de té verde, añadido de Superóxido Dismutasa; ingrediente que coadyuva en la prevención de enfermedades degenerativas causadas por el estrés oxidativo que generan los radicales libres. Para la European Food International Council (EUFIC, 2005), los alimentos funcionales “son aquellos alimentos que son elaborados no solo por sus características nutricionales, sino también para cumplir una función específica como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ello se les agregan componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia o antioxidantes, etc.”.

### Antioxidantes

Según Zamora (2007): “los Antioxidantes son sustancias que previenen o retardan el daño oxidativo producido por los radicales libres. Para que una sustancia actúe como antioxidante debe ser capaz de reaccionar fácil y específicamente con un radical libre, neutralizándolo e impidiendo el daño oxidativo a las células”. En otras palabras, se trata de un grupo de vitaminas, minerales, colorantes naturales y otros compuestos de vegetales y enzimas, que bloquean el efecto perjudicial de los radicales libres; la mayoría se encuentran en alimentos vegetales como: frutas, legumbres, verduras y hortalizas.

Somoza (2009) señala respecto a los antioxidantes lo siguiente: "Los antioxidantes se han clasificado principalmente en dos sistemas: enzimáticos y no enzimáticos también conocidos como endógenos y exógenos respectivamente, los cuales pueden actuar en el espacio intra y extra celular. El sistema exógeno lo conforman principalmente vitaminas como la A,C,E, carotenoides, minerales como el selenio y zinc, entre otros. El sistema endógeno lo conforman enzimas del cuerpo humano como la SOD, GPX y la CAT". El mismo autor destaca que las concentraciones de antioxidantes, que presente la alimentación de cada individuo, dependerá en gran medida de cuan balanceada y correcta sea la misma; así como de la forma como se prepare y el nivel de nutrimentos que contenga al momento de ser consumida.

### Té Verde

El té verde es un tipo de té (*Camellia Sinensis*) que no ha sufrido una oxidación durante su procesado, a diferencia del té negro, ya que las hojas se recogen frescas y después de someterse a la torrefacción, se prensan, enrollan, trituran y se secan. El té verde supone entre una cuarta y una quinta parte del total de té producido mundialmente.

Según el Código Alimentario Argentino, C.A.A (1985), define al té de la siguiente manera:

"Con la denominación genérica de Té, se entiende exclusivamente el producto obtenido por el procesamiento conveniente de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos de la especie *Camellia sinensis L.* El té destinado a la preparación de infusiones podrá ser:

1. Té o té negro, que corresponde al producto obtenido mediante marchitado, enrulado, fermentado y secado de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos.

2. Té verde, que corresponde al producto obtenido por calentado, enrulado, secado de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos sin que hayan experimentado ningún proceso de fermentación".

### Superóxido Dismutasa (SOD)

Según Berg, et. al., (2006) las SOD constituyen un grupo de metaloenzimas que pueden dividirse en 2 familias filogenéticas diferentes: cobre-zinc superóxido dismutasas (Cu/Zn-SOD), y hierro-manganeso superóxido dismutasas (Fe/MnSOD).

Todos los tipos de SOD catalizan la conversión del anión superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno ( $O_2$ ). Estas proteínas constituyen las únicas enzimas conocidas que actúan sobre un radical y todas las isoformas catalizan la reacción de dismutación del  $O_2^-$  con similar eficiencia. Aunque el  $O_2^-$  puede dismutar espontáneamente a  $O_2$  y  $H_2O_2$  a una velocidad de aproximadamente  $10^5 M^{-1}s^{-1}$ , la enzima cataliza la dismutación a una velocidad de  $7 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ , lo que garantiza la eliminación de este radical, siendo una de las enzimas más eficientes conocida.

La SOD, tiene otros mecanismos de acción, tales como: la intervención en procesos de envejecimiento celular, por lo que puede estar relacionada con procesos de apoptosis y de la replicación viral. Según Bannister et. al., científicamente se ha comprobado que junto con la catalasa y la glutatión peroxidasa, es una de las más representativas defensas naturales frente al exceso de radicales libres y al estrés oxidativo. También actúa reduciendo el daño de los superóxidos, los radicales libres más comunes en el cuerpo, y reparando las células. Estos son los radicales más reactivos que se producen cuando el oxígeno gana un electrón negativo, esto ocurre en los procesos metabólicos normales.

Bannister et al (1987), indican que las funciones de la SOD es contribuir con ayuda al cuerpo a usar el zinc, cobre y manganeso; por ello, existe dos tipos de SOD: la Cu/Zn SOD y la Mn SOD. Ambas tienen un papel diferente en mantener las células sanas, así como la Cu/Zn protege el citoplasma celular, el Mn protege la mitocondria del daño de los radicales libres.

Los radicales libres ROS pueden alterar el ADN y la membrana de las células resultando en un código genético mutado dentro de la célula; esto finalmente puede convertirse en cáncer. Sin embargo, la SOD puede inhibir la metástasis; es decir, la SOD puede retrasar el crecimiento tumoral y prevenir el daño celular inicial que puede llevar al cáncer.

### Vitamina C

La Vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble. Mientras que la mayoría de los animales son capaces de sintetizar la vitamina C en su organismo, los humanos no tienen la capacidad de generar su propio ácido ascórbico; para conseguirlo, el hombre debe obtenerla a través de la dieta. La

Vitamina C, es un ácido de azúcar con propiedades antioxidantes y su aspecto es de polvo o cristales de color blanco-amarillento; es completamente soluble en agua. La vitamina C según Padayatty et. al., (2006) es “un enantiómero L del ácido ascórbico o antiescorbútica, es un nutriente esencial, en particular para los mamíferos”.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los principales componentes antioxidantes y la estabilidad de una bebida funcional elaborada a base de té verde; a la cual se añade superóxido dismutasa y vitamina C con el fin de determinar el efecto antioxidante de los mismos.

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

El presente proyecto fue una investigación experimental, se analizó la elaboración de una bebida funcional a base de té verde, a la cual se añadió superóxido dismutasa y vitamina C con el fin de determinar el efecto antioxidante. Para ello, fue necesario realizar tres ensayos pilotos:

- En el primero se mezcló agua con superóxido dismutasa, los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Solubilidad de SOD**

MATERIA PRIMA	CANTIDAD	%
Superóxido dismutasa	171,88 mg	0,0344%
Agua	C.SP. 500 ml	99,966%

El objetivo de este piloto fue determinar la solubilidad de la SOD, la cual fue muy buena en medio acuoso, según las pruebas de solubilidad que se hicieron en el laboratorio, hasta 40 g / 100 mL de agua.

- En el segundo piloto se preparó un litro de té verde: Una vez comprobada la solubilidad de la SOD se hizo un litro de té verde sin sabor, para determinar la solubilidad de todos los demás ingredientes, la cual resultó muy buena. Una vez preparada la bebida se le agregaron 3 sabores diferentes: naranja, cereza y maracuyá. El objetivo es determinar cuál agrada más.
- En el último piloto, se realizó un análisis sensorial del producto terminado: Se pidió a un grupo de panelistas seleccionar el sabor que más les gusta. El sabor elegido fue el naranja (Tabla 2). Una vez seleccionado el sabor naranja, se

determinó la intensidad que debía tener este sabor, para esto dentro de este mismo piloto se le agregaron 3 concentraciones diferentes del sabor en mención (Tabla 3).

**Tabla 2. Elección del sabor de la bebida**

individuos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
NARANJA	1	1		1			1		1	1	6
CEREZA			1								1
MARACUYÁ					1	1		1			3

**Tabla 3. Elección de la intensidad del sabor de la bebida**

individuos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
8 GOTAS					1						1
13 GOTAS	1	1	1			1	1		1	1	7
18 GOTAS				1				1			2

Se estableció entonces que el sabor elegido es naranja a razón de 13 gotas (0,65 ml) / 500 mL. Una vez preparada la bebida final con las concentraciones indicadas, se procedió a realizar una última prueba organoléptica.

### 2. Procesamiento de la Bebida de Té Verde

#### Descripción del proceso

En un recipiente de acero inoxidable 12 litros de agua purificada se llevaron a su punto de ebullición. Luego, se colocaron 103 gramos de té verde, dejando en ebullición por un minuto. Se maceró la materia prima por 10 minutos y filtró esta solución.

Se disolvió 400 g de azúcar en el filtrado del paso anterior.

En otro recipiente se colocó 500 mL de agua a temperatura ambiente y se diluyeron 3,6 g de Vitamina C (exceso 20% de vitamina C). Se disolvió 20 gramos de sorbato de potasio en 800 ml de agua tibia (40-50°C), 12 gramos de ácido cítrico en 500 ml de agua y 3.2 gramos de citrato de sodio en 500 ml de agua. De igual manera, se diluyó 4,5 gramos de sucralosa en 700 ml de agua tibia (40-50°C). Se mezclaron los ingredientes disueltos al tanque de manufactura por 20 minutos, para finalizar 6,88 gramos de superóxido dismutasa fueron disueltos en 700 ml de agua tibia (40-50°C), fueron incluidos al tanque de manufactura y al finalizar se utilizó saborizante de naranja. El diagrama de flujo del proceso se lo puede apreciar en la Figura 1.

### 3. Resultados y discusión

#### Análisis Sensorial

Los resultados del análisis sensorial se revisaron en la Tabla 4. En la misma se evidencia cómo todos los parámetros sensoriales (olor, color, sabor, acidez, dulzor) con una escala del 1 al 9 el resultado fue favorable.

Este análisis, permitió asegurar las condiciones organolépticas de la bebida, se realizó una prueba doble ciego a 30 panelistas del laboratorio, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 4):

- De esta manera se tiene que el 866,7% de los

participantes señaló a la bebida como “buena” en escala general.

- Al igual que el olor, el 100% de los encuestados indicó que el color del producto es “bueno”. Analizado el sabor en general se puede decir que es bueno puesto que el 83,33% de las personas lo señalaron de esta manera.
- En términos generales se puede decir que el 100% de los encuestados le gustó el dulzor de la bebida.
- En términos generales se puede decir que el 100% de los encuestados le gustó la acidez de la bebida.

**Tabla 4. Calificación Organoléptica de la bebida**

Cualidades	Calificaciones									Total votantes	Suma calificaciones	Promedios
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Términos generales	0	0	0	0	1	3	8	8	10	30	233	7,77
Olor	0	0	0	0	0	0	5	18	7	30	242	8,07
Color	0	0	0	0	0	0	2	15	13	30	251	8,37
Sabor	0	0	0	0	2	3	6	9	10	30	232	7,73
Dulzor	0	0	0	0	0	0	7	8	15	30	238	7,93
Acidez	0	0	0	0	2	1	7	9	11	30	236	7,87

#### Análisis físicos - químicos y microbiológicos

En la Tabla 5 se puede resumir los resultados del primer lote luego de la manufactura. Todos los análisis están dentro de los parámetros establecidos inicialmente. Así se tuvo que la vitamina C con 120,23% de potencia cumple con la especificación, al igual que la SOD con 101,30% de concentración.

En el segundo lote inicialmente se tuvo 119,20% de concentración de vitamina C y 99,84% de SOD. Finalmente, el tercer lote muestra 115,68% de actividad de Vitamina C y 100,15% de concentración de SOD. De esta manera se puede indicar que todos los resultados cumplen con las especificaciones requeridas.

**Tabla 5. Resultados del primer lote, inicio**

Parámetros	Especificaciones*	Resultados
Aspecto	Líquido color café, dulce	Conforme
pH	4.00 – 6.00	4.80
Principio activo	90 – 150% Vit. C	120.23%
	90 – 110% SOD	101.30%
Volumen	Mayor o igual a 95% de volumen declarado	Cumple
Coliformes fecales NMP/CM3	< 3 UFC / ml	< 3 UFC / ml
Coliformes NMP/CM3	< 3 UFC / ml	< 3 UFC / ml
Recuento estándar en placa REP UFC/CM3	< 100 UFC / ml	< 100 UFC / ml
Recuento hongos y levaduras	< 10 UFC / ml	< 10 UFC / ml
E. coli	Ausente	Ausente

\* Los porcentajes son mayores al 100% en las especificaciones de los principios activos vitamina C y SOD debido a que la USP 36 permite cantidades hasta el 150% (exceso del 50%) en ácido ascórbico, debido a la degradación que puede sufrir, en caso de SOD el exceso es del 10%, basado en el mismo análisis para la vitamina C.

### **Estudios de estabilidad Natural**

Los estudios de estabilidad natural generalmente consisten en someter al producto a condiciones similares a las que estará expuesto. La cámara de estabilidad natural tiene los siguientes parámetros: Temperatura 30° C y Humedad: 50% – 60 %.

#### **Estabilidad primer mes**

El pH del lote 1 se mantuvo dentro de los rangos pre-establecidos, con un resultado de 4,75. Los dos principios activos a analizar estuvieron dentro de parámetro, puesto que tanto la SOD con un resultado de 99,50% y el ácido ascórbico con un resultado de 115,25% estaban dentro de las especificaciones iniciales.

El pH del lote 2 fue de 4,75. Los dos principios activos a analizar estuvieron dentro de parámetros, puesto que tanto la SOD con un resultado de 99,50% y el ácido ascórbico con un resultado de 110,25% estaban dentro de las especificaciones iniciales.

El pH del lote 3 se mantuvo en 4,69. Los dos principios activos analizados, se hallaron dentro de parámetro, puesto que tanto la SOD, con un resultado de 98,75% y el ácido ascórbico con un resultado de 109,25% estaban dentro de las especificaciones iniciales. Los resultados microbiológicos de los tres lotes permanecieron inalterables, sin presencia de microorganismos.

#### **Estabilidad segundo mes**

En el lote 1, el pH fue de 4,71. Respecto a los dos principios activos, éstos se encuentran dentro de parámetro. La SOD, con un resultado de 98,95%; un ligero incremento frente al lote anterior. En el caso de la vitamina C, en comparación al mes anterior, pasó 109,25% a 108,74%; es decir, 0,51% menos. El pH del lote 2 se mantuvo dentro de los rangos pre establecidos; su resultado fue de 4,49, los dos principios activos analizados se encontraron dentro de parámetro; tanto la SOD con un resultado de 99,14% y el ácido ascórbico con 100,58% se estuvieron dentro de las especificaciones iniciales. En el tercer mes, el pH se mantuvo dentro de los rangos pre-establecidos; su resultado en esta ocasión fue de 4,54. Los principios activos analizados, nuevamente, se encontraron dentro de parámetro; tanto la SOD con un resultado de 98,90% y el ácido ascórbico con

96,10% se estuvieron dentro de las especificaciones requeridas. Los resultados microbiológicos de los tres lotes permanecieron inalterables, sin presencia de microorganismos.

#### **Estabilidad tercer mes**

En el lote 1, el pH fue de 4,80. Respecto a los dos principios activos, estos se encontraron dentro de parámetro. La SOD, con un resultado de 101,30% tuvo un ligero incremento frente al lote anterior.

En el lote 2, su pH se mantuvo dentro de los rangos pre-establecidos; su resultado fue de 4,54. Los dos principios activos analizados se encontraron dentro de parámetro; tanto la SOD con un resultado de 98,90% y el ácido ascórbico con 96,10% se encontraron dentro de las especificaciones iniciales.

En el lote 3, el pH fue de 4,40, se mantuvo conforme. Los principios activos analizados, nuevamente, se encontraron dentro de parámetro; tanto la SOD con un resultado de 94,52% y el ácido ascórbico con 95,90% se hallaron dentro de las especificaciones requeridas. Los resultados microbiológicos de los tres lotes permanecieron inalterables, sin presencia de microorganismos.

### **Estudios de estabilidad acelerada**

Los estudios de estabilidad acelerada son diseñados para aumentar la velocidad de cambios en las propiedades físicas y de degradación química de una sustancia o un producto farmacéutico, o un alimento, usando condiciones de almacenamiento extremas. Estos estudios tienen como objetivo determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir la vida útil del producto farmacéutico en condiciones normales de almacenamiento.

Estos datos pueden también emplearse para evaluar efectos químicos a largo plazo en condiciones no aceleradas y para valorar el impacto de desviaciones de corta duración de las condiciones de almacenamiento declaradas en el rótulo, como las que pueden ocurrir durante el transporte y distribución. Los resultados de estudios acelerados no siempre predicen los cambios físicos.

Las condiciones a las que se sometió el producto fueron Temperatura: 45° C y Humedad: 70%. A continuación en la Tabla 6 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 6. Resultados de la estabilidad acelerada**

Parámetros	Especificaciones*	Resultados
Aspecto	Líquido color café, dulce	Conforme
pH	4.00 – 6.00	4.52
Principio activo	90 – 150% Vit. C	101.28%
	90 – 110% SOD	94.57%
Volumen	Mayor o igual a 95% de volumen declarado	Cumple
Coliformes fecales NMP/CM3	< 3 UFC / ml	< 3 UFC / ml
Coliformes NMP/CM3	< 3 UFC / ml	< 3 UFC / ml
Recuento estándar en placa REP UFC/CM3	< 100 UFC / ml	< 100 UFC / ml
Recuento hongos y levaduras	< 10 UFC / ml	< 10 UFC / ml
E. coli	Ausente	Ausente

\*Los porcentajes son mayores al 100% en las especificaciones de los principios activos vitamina C y SOD debido a que la USP 36 permite cantidades hasta el 150% (exceso del 50%) en ácido ascórbico, debido a la degradación que puede sufrir, en caso de SOD el exceso es del 10%, basado en el mismo análisis para la vitamina C.

La propuesta de bebida funcional a base de té verde fue sometida 24 horas a 45°C con una humedad de 70% por 23 días. Este dato se calculó en base al informe 32 de la Organización Mundial de la Salud, OMS, el cual indica que un estudio de estabilidad acelerada para producto de 2 años de vida útil debe ser sometido a mínimo 6 meses en este procedimiento. La relación fue 1 en 4, es decir 23 días equivaldrían a 92 días. De esta forma, la propuesta cumple con la estabilidad acelerada.

Por lo expuesto, resulta de gran importancia la neutralización de radicales libres ya que son potencialmente mutágenos. Se forman epóxidos, y esta reacción puede dar lugar a citotoxicidad, alergia, mutagénesis o carcinogénesis, lo cual dependerá de las propiedades del epóxido en cuestión. Al analizar los principales componentes antioxidantes del té verde y relacionarlos con la prevención de enfermedades degenerativas, se determinó que las Isoflavonas y catequinas contenidas en el té verde son potentes antioxidantes. Los estudios científicos revelan que las isoflavonas son capaces de influenciar en el metabolismo de las hormonas sexuales y su actividad en el organismo, así como intervienen en la producción de proteínas y de enzimas intracelulares.

### III. CONCLUSIONES

En la presente experimentación se comprobó que es posible desarrollar la bebida inicialmente planteada. La estabilidad de la SOD fue adecuada para el producto desarrollado a lo largo de los tres meses de su estudio. El análisis sensorial determinó que entre la muestra tomada se prefirió el sabor a naranja, puesto que este es el que generó mayor aceptación por parte de los panelistas seleccionados. Su aspecto y su color, resultaron favorables a la apreciación de los panelistas.

Se exhorta a la comunidad académica continuar con la investigación y desarrollo de productos funcionales, para que de esta forma el consumidor tenga acceso a productos que les permita gozar de una mejor calidad de vida.

### IV. REFERENCIAS

Bannister J.V.; Bannister, W.H.y Rotilio, G. (1987). Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. *CRC Critical Review in Biochemistry*, 22 (2),111-180.

Berg, J., Timockzco, J., & Stryer, L. (2006). *Biochemistry* (5th ed.).New York. W. H. Freeman.

- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (Eds.). (1993). Free radicals in medicine. Churchill Livingstone.
- Código Alimentario Argentino, C.A.A. (1985). Té. Capítulo 15, Artículo No. 1181. Recuperado de [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_XV.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XV.pdf)
- Doyon M. y Labrecque J. (2008). Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal*, 110 (11), 1133 – 1149
- EFIC (2005). “Backgrounder on functional foods”, European Food Information Council, Brussels. Recuperado de [//www.eufic.org/en/quickfacts/functional\\_foods.htm](http://www.eufic.org/en/quickfacts/functional_foods.htm)
- Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de E.E.U.U. (2014). Antioxidantes y prevención del cáncer
- Lupera H. (2013). Ecuador: de cada 100 tipos de cáncer registrados, tres se producen en niños y jóvenes (2 de Junio de 2013). Diario La Hora, 2 de junio de 2013. Recuperado de [http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101515272/-1/Ecuador%3A\\_de\\_cada\\_100\\_tipos\\_de\\_cancer\\_registrados,\\_tres\\_se\\_producen\\_en\\_ni%C3%B1os\\_y\\_j%C3%B3venes.html#.V6S8U9LhDIU](http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101515272/-1/Ecuador%3A_de_cada_100_tipos_de_cancer_registrados,_tres_se_producen_en_ni%C3%B1os_y_j%C3%B3venes.html#.V6S8U9LhDIU)
- Muñoz, M. E., Galan, A. I., Palacios, E., Diez, M. A., Muguerza, B., Cobaleda, C., (...) & Jimenez, R. (2010). Effect of an antioxidant functional food beverage on exercise-induced oxidative stress: A long-term and large-scale clinical intervention study. *Toxicology*, 278(1), 101-111.
- Naqui, A., Chance, B., & Cadenas, E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 137-166.
- Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., & Lee, J. et al. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal Of The American College Of Nutrition*, 22(1), 18-35.
- Somoza M. Elena, (2009) Cuidado Nutricional en dislipidemias. 3era edición, Buenos Aires, Argentina.
- Zamora J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1),17-26.

# CIENCIA

UNEMI

## Ingeniería Ambiental

---

Calidad del agua destinada al consumo  
humano en un cantón de Ecuador

---

Técnicas analíticas para el control de la  
contaminación ambiental

---

# Calidad del agua destinada al consumo humano en un cantón de Ecuador

Renato, Baque-Mite<sup>1</sup>; Luis, Simba-Ochoa<sup>2</sup>; Betty, González-Ozorio<sup>1</sup>; Pedro, Suatunce<sup>1</sup>; Eduardo, Díaz-Ocampo<sup>1</sup>; Lorena, Cadme-Arevalo<sup>1</sup>

## Resumen

El estudio evaluó la calidad del agua destinada al consumo humano en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, Ecuador. Se evaluaron parámetros físicos, químicos y microbiológicos del agua en nueve estaciones de bombeo del EPMAQAQ, en épocas lluviosa y seca. Se compararon los resultados obtenidos con los valores de referencia establecidos en las normativas (Acuerdo ministerial N° 097 Norma INEN 1108, TULSMA, EPA y OMS), bajo el criterio de calidad para aguas destinadas al consumo humano y uso doméstico. Se determinó el Índice de Calidad de Agua (ICA) y la correlación estadística entre los parámetros, usando la prueba de "t" de Student, con una significancia estadística de  $p = 0,05$  entre las dos épocas. Los parámetros: nitritos, nitratos, turbidez, sólidos disueltos totales, pH, dureza total, color y hierro, se encuentran en el rango de aceptabilidad de calidad ambiental. Los valores, manganeso y oxígeno disuelto sobrepasan los límites máximos permisibles por el TULSMA, al igual que los coliformes fecales, en época lluviosa. La mayoría de los parámetros presentaron diferencias significativas ("t" al 5%) entre las dos épocas. El agua del cantón Quevedo está levemente contaminada y requiere tratamiento de potabilización previo a su consumo.

**Palabras Clave:** calidad de agua; consumo; parámetros químicos-físicos y microbiológicos.

## Quality of water intended for human consumption in a canton of Ecuador

### Abstract

The study evaluated the quality of water intended for human consumption in the canton Quevedo, province of Los Ríos, Ecuador. Physical, chemical and microbiological parameters of water in nine EPMAQAQ pumping stations were evaluated, in rainy and dry seasons. The results obtained with the reference values set out in the regulations (Ministerial Agreement No. 097 Standard INEN 1108, TULSMA, EPA and WHO) under the quality criterion for water intended for human consumption and domestic use was compared. The Water Quality Index (ICA) and the statistical correlation between parameters were determined using the test "t" of Student, with a statistical significance of  $p = 0.05$  between the two periods. Parameters: nitrites, nitrates, turbidity, total dissolved solids, pH, total hardness, color and iron are in the range of acceptability environmental quality. Values, manganese, dissolved oxygen exceed the maximum permissible limits for the TULSMA, like fecal coliform in the rainy season. Most parameters showed significant differences ("t" 5%) between the two periods. Quevedo Canton water is slightly contaminated and requires purification treatment before consumption.

**Keywords:** water quality; consumption; chemical-physical parameters and microbiological.

**Recibido:** 2 de julio de 2016  
**Aceptado:** 22 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Campus Ing. Manuel Haz Álvarez, Km 1 ½ vía a Santo Domingo de Los Tsáchilas. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. rbaque@uteq.edu.ec; bgonzalez@uteq.edu.ec; jpsuatunce@uteq.edu.ec; ediaz@uteq.edu.ec; lcadme@uteq.edu.ec

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Campus Ing. Manuel Haz Álvarez, Km 1 ½ vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. lsimba@uteq.edu.ec

\*Autor para correspondencia: Betty González Osorio, bgonzalez@uteq.edu.ec

## I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia se conoce que el 71% de la superficie del planeta Tierra está cubierta de agua, de la cual el 0,75% (8 millones de km<sup>3</sup>) es agua dulce, repartida en aguas superficiales y subterráneas y el 0.2% flota en la atmósfera, es por esto que la calidad del agua potable es un factor determinante en el bienestar humano (Agudelo et al., 2005). Las enfermedades propagadas por agua potable contaminada con materia fecal, diezmaron a la población de ciudades enteras. Incluso actualmente, el agua insalubre contaminada por fuentes naturales o humanas sigue causando disminución en la calidad del agua y por ende la vida de los seres vivos (Morais, Resende, Palau, & Tiago, 2016); (UNESCO, 2003), se da la presencia de epidemias ocasionales, de enfermedades bacterianas y virales ocasionadas por agentes infecciosos transportados al ser humano mediante el consumo de agua potable, tales como el cólera, poliomielitis y otras enfermedades. (Cohn, Cox, & Beger, 2002)

Otro factor es la presencia potencial de contaminantes químicos, orgánicos e inorgánicos y metales pesados, procedentes de fuentes industriales, agrícolas y de la escorrentía urbana, los organofosforados y los carbonatos que al tomar contacto con el ser humano, probablemente, son la causa de enfermedades crónicas (cáncer, daños en órganos internos), alteraciones en el sistema nervioso e inmunológico, lesiones al genoma humano y producto de la reproducción (Borbolla, Cruz, Piña, Fuente, & Garrido, 2003). El exceso de fluoruros puede causar daños en la médula espinal (Novotny, 1996) en (Salomons, Förstner, & Mader, 1996); (Cotler, El manejo integral de cuencas en México: estudios y reflexiones para orientar la política ambiental. , 2004); (Cotler, El manejo integral de cuencas en México , 2007) (Howard, 2000).

Los parámetros (físicos, químicos y biológicos) como indicadores de calidad del agua, ofrecen múltiples ventajas (EPA-US., 2013), tales como: la presencia en la mayoría de los sistemas acuáticos continentales, la naturaleza sedentaria de los organismos, la simplicidad metodológica y una alta confiabilidad, lo que hace de estos métodos una herramienta idónea para la vigilancia rutinaria del estado ecológico en las aguas dulces; en este sentido se han desarrollado normas de calidad de aguas superficiales basadas en la determinación de concentraciones máximas permisibles de agentes químicos (Cohn, Cox, & Beger, 2002). Para ello se han propuesto el uso de herramientas en calidad de agua,

que consisten en analizar los contenidos, físico químico y biológicos. (Córdova, Gaete, & Aránguiz, 2009)

El ser humano requiere un mínimo de tres litros de agua potable por día para consumo y un total de veinte litros de agua potable, para las actividades antropogénicas. Ecuador presenta la gran ventaja de disponer agua dulce 22 500 m<sup>3</sup>/hab/año, lo cual es superior a 1 000 m<sup>3</sup>/hab/año considerados por la (OMS) Organización Mundial de la Salud y 1 700 m<sup>3</sup>/año/hab, (Soto & Reina, 2012); (PNUMA), Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente) (SENAGUA, 2009). Bajo este escenario la Constitución de la República de Ecuador 2008 y el Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017, garantizan el uso y aprovechamiento para los seres vivos (salud y vida), así como el cuidado de este recurso, por lo cual hay que cuidar y darle un buen uso. En este sentido, la investigación tiene como objeto evaluar la calidad del agua de las estaciones de bombeo de la EPMAQAQ, destinada al consumo humano en el cantón Quevedo, Ecuador, en las dos épocas del año (lluviosa y seca).

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

#### Localización

El estudio se realizó en las estaciones de bombeo de la Empresa Pública Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Quevedo, EPMAQAQ-Quevedo, en dos épocas, lluviosa y seca, este cantón está ubicado en la provincia de Los Ríos, Región 5, de la costa de Ecuador. Cuenta con 173 585 habitantes según datos del (INEC, 2010), su actividad económica es la agropecuaria y es la ciudad más grande y poblada de la provincia de Los Ríos. Está situada a orillas del río que lleva el mismo nombre de la ciudad, sus condiciones geográficas son: 01° 20' 30" de Latitud Sur y 79° 28' 30" de Longitud occidental, perteneciente a la zona subtropical; está situada a 74 metros sobre el nivel del mar.

La Empresa Pública Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Quevedo (EPMAQAQ), fue creado por Ordenanza Municipal el 01 de septiembre de 2010, de conformidad con lo que establece el numeral 1 del Art.14 del COOTAD (Código Orgánico de Organización Territorial, Autonomía y Descentralización.). Gestiona el agua de consumo para los habitantes del cantón, cuenta con nueve estaciones de bombeo de agua que alimentan a los sectores del área urbana del cantón en mención: El Guayacán, Parroquia 7 de Octubre, Parroquia 17

de Marzo, Parroquia Mi País, Parroquia Galo Plaza, Agrilsa, parroquia Venus del Río Quevedo, parroquia Playa Grande y parroquia San José.

**Metodología y análisis**

Las variables en estudio es la calidad del agua destinada al consumo humano (variable dependiente) y los parámetros físicos, químicos y microbiológicos (variable independiente). Se integró 27 muestras de agua por época (3 muestras y 9 sitios), los resultados se presentan del promedio de los nueve sitios en las dos épocas, el muestreo para el análisis de agua se estableció siguiendo los procedimientos en la toma de muestras de acuerdo a normas NTE 2169, 2176 y 2226 del Instituto Ecuatoriano de Normalización del Ecuador (INEC, 2010); (Brown, McClelland, Deininger, & Tozer, 1970). Los análisis correspondientes en el laboratorio se realizaron de acuerdo a las directrices y recomendaciones establecidas en los Standard Methods (APHA, 2005); (AWWA, 2012); American Public Health Association. El análisis consistió en encontrar una media en las variables (físicos, químicos y microbiológicos), de acuerdo al criterio de calidad de agua para consumo humano y uso doméstico Norma INEN 1107. Los resultados se compararon con los valores de referencia de la normativa nacional 1108 (INEN, 1998), Acuerdo ministerial N° 097; (TULSMA, 2015); (EPA, 2013); (OMS, 2006), para calidad de agua de consumo humano, bajo el criterio de calidad para aguas destinadas al consumo humano y uso doméstico.

La calidad de agua para consumo se estableció según el siguiente criterio: calidad de agua (GWQI) propuesta de (Vasanthavigar, Srinivasamoorthy, & Vijayaragavan, 2010), pero con la adaptación empleada por (Deepak, 2013), el cual utiliza la ecuación (1):

$$GWQI = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i W_i}{\sum_{i=1}^n W_i} \tag{1}$$

Donde,  $Q_i$  es el valor o índice de calidad para cada parámetro, y  $W_i$  es el peso de uno de los parámetros considerados.

El índice norteamericano (Dinius, 1987), se empleó con el promedio geométrico ponderado según el siguiente arreglo (2):

$$ICA (NSF, Dinius) = \left( \prod_{i=1}^n I_i \right) W_i \tag{2}$$

Donde,  $I_i$  es el subíndice del parámetro  $i$ , y  $W_i$  es el peso relativo o porcentaje asignado al parámetro  $i$ . en la Tabla 1 se observan los pesos relativos y la clasificación que considera cada índice

**Tabla 1. Valores del peso  $W_i$  para cada parámetro del ICA**

Parámetro	Dinius (1987)
Oxígeno Disuelto	0,109
pH	0,077
DBO	0,097
Nitratos	0,090
Coliformes Fecales	0,116
Temperatura	0,077
Conductividad	0,079
Color	0,063
Cloruros	0,074
Coliformes Totales	0,090
Alcalinidad	0,063
Dureza	0,065

Fuente: Torres et al, 2010

Una vez establecido el ICA se comparó los resultados con los valores asociados a la calidad del agua, ver Tabla 2.

**Tabla 2. Valores del ICA asociados a la calidad de agua para consumo humano**

Categoría	Rango	Descripción
Excelente	90-100	No requiere tratamiento para consumo
Aceptable	80-90	Tratamiento menor requerido
Levemente Contaminada	70-80	Dudoso consumo sin tratamiento
Contaminada	50-70	Tratamiento de potabilización necesaria
Fuertemente Contaminad	40-50	Dudoso para consumo
Extremadamente contaminada	0-40	Inaceptable para consumo

Fuente: Dinius (1987)

Y por último, con los promedios se realizó correlación estadística con una prueba de “t” de Student, cuya significancia estadística fue  $p = 0,05$  entre la época lluviosa y seca.

## 2. Resultados y discusión

### 2.1 Contaminación del agua

Teniendo en cuenta que los contaminantes del agua pueden provenir de una variedad de fuentes y que causan daño a la salud humana, es importante tener marcadores de contaminación del agua que sean indicativos de las fuentes. Algunos herbicidas pueden servir como marcadores de la escorrentía agrícola. Tradicionalmente se usan las bacterias

fecales coliformes provenientes de fuentes domésticas, como marcadores de contaminación microbiana o viral. Potencialmente, los metabolitos humanos endógenos así como los constituyentes de los alimentos, los productos farmacéuticos y los productos de cuidado personal, pueden indicar la entrada de contaminación desde fuentes del alcantarillado. La cafeína procedente del consumo de café, té y bebidas de cola, pueden ser un marcador de fuentes domésticas de contaminación del agua (Manahan, 2007), entre los principales contaminantes del agua están los que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Tipos generantes de contaminantes del agua

Tipo de contaminante	Impacto
Elemento traza	Salud, biota acuática, toxicidad
Metales pesados	Salud, biota acuática, toxicidad
Metales enlazados orgánicamente	Transporte de metales
Radionúclidos	Toxicidad
Contaminantes inorgánicos	Toxicidad, biótica acuática
Asbesto	Salud humana
Nutrientes de algas	Eutrofización
Sustancias que dan acidez, alcalinidad, salinidad (en exceso)	Calidad del agua, vida acuática
Contaminantes orgánicos traza	Toxicidad
Medicamentos, anticonceptivos, etc.	Calidad del agua, vida acuática
Bifenilos policlorados	Posibles efectos biológicos
Plaguicidas	Toxicidad, biota acuática, fauna
Residuos de petróleo	Efectos en la fauna, contaminación visual
Alcantarillados, residuo humano y de animales	Calidad del agua, niveles de oxígeno
Material orgánico medida como demanda bioquímica de oxígeno	Calidad del agua, niveles de oxígeno
Patógenos	Efectos en la salud
Detergentes	Eutrofización, fauna, contaminación visual
Compuestos carcinógenos químicos	Incidencia de cáncer
Sedimentos	Calidad del agua, vida acuática, fauna
Sustancias que dan sabor, olor y color	Calidad del agua, vida acuática, contaminación visual

Fuente: (Manahan, 2007)

### 2.2 Calidad del agua

Al realizar en análisis comparativo de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos del agua, con los valores de referencia de la normativa nacional (Acuerdo ministerial N° 097; (INEN, 1998); (TULSMA, 2015); (EPA, 2013); (OMS, 2006) para calidad de agua de consumo humano, se muestran en la Tabla 4, se

encontró que el oxígeno disuelto (% saturación) en época lluviosa fue de 14,84 y en época seca de 13,0 % de saturación, valores aceptables al compararlos con el TULSMA (Tabla 4). Al respecto Sierra (2016), indica que la solubilidad en el agua depende de la temperatura, a mayor temperatura menos oxígeno y se disuelve, en este caso la presencia de sólidos disueltos totales, y

coliformes fecales, hace que la actividad respiratoria se acelere y disminuya el oxígeno disuelto. Un indicador de agua de buena calidad es cuando el oxígeno presenta un nivel mayor que 80% de saturación, ya que permite descomponer todos los materiales biodegradables presentes en ella y con esto evitar su deterioro. Para Cotler (2004), la mayoría de las especies aerobias acuáticas no realizan sus actividades apropiadamente, si no se toman las medidas pertinentes para incrementar el oxígeno disuelto en el agua.

Los Nitritos y Nitratos en época lluviosa fueron 0,15 y 0,42 mg/l y, en época seca de 0,006 y 1,04 mg/l, siendo el límite máximo permisible de 0,2 mg/l para Nitritos y 50 mg/l para Nitratos. La presencia de nitratos en la época lluviosa posiblemente se debe al resultado de lixiviación de los fertilizantes que contienen nitrato de amonio, contaminación fecal de animales de sangre caliente y, contaminación fecal humana (Stevenson, 1999). Soto y Reina (2012), manifiestan que cuando el resultado de los Nitritos es muy bajo en el examen microbiológico, se observa una mínima presencia de Coliformes Fecales; en cambio en presencia de valores elevados de Nitritos y Nitratos existe abundante crecimiento de Coliformes Fecales.

Los nitratos son reducidos a nitritos por la ausencia de oxígeno, cuando se sobrepasa los límites permisibles de este elemento se convierten en aguas dañinas para la salud humana, la reducción de nitrito bloquea la hemoglobina, disminuye el transporte de oxígeno por la sangre, especialmente en menores de 6 meses (OMS, 1995). Otro problema es la posible formación de nitrosaminas, las cuales son potencialmente carcinógenas (Cohn, Cox, & Beger, 2002), por lo que es necesario la nitrificación y desnitrificación de estos dos elementos. (Martínez & García, 2009)

La época lluviosa presentó contaminación microbiológica, principalmente por Coliformes fecales, cuya presencia fue de 1 NMP/100ml, estando el agua no apta para el consumo humano desde el punto de vista microbiológico, ya que el valor estipulado en los decretos de la Normativa Ecuatoriana INEN 1108:2011, cuarta revisión para Coliformes Fecales y Totales, es de ausencia o número de microorganismos presente por 100 mililitros de agua. Los contenidos de Coliformes fecales son significativos con relación a la normativa vigente en el país, por lo que la población no debe consumir este líquido vital. En referencia a los microorganismos Manahan (2007), expresa que éstos

provocan serias lesiones en la salud humana, por lo tanto no se debe exponer a la población.

La temperatura alcanzó valores como 26,8 en época lluviosa y 25,60C en época seca. Según Arizabalo y Díaz (2010), al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad de gases y aumenta la de las sales. El pH se encuentra en el rango de aceptabilidad correspondiente a calidad ambiental satisfactoria, disminuyendo al pasar de época lluviosa a seca, es decir de 7.45 a 7.26, valor que se ubica en los límites permisibles que va de 6,0 a 9,0; este elemento es importante en el proceso químico que tiene lugar en el agua, por actuación de los floculantes.

Los valores que alcanzó el parámetro dureza obtuvo valores promedio de 149,2 mg/l y 115,6 mg/l de CaCO<sub>3</sub> en época lluviosa y seca, en su orden, ubicándose en clasificación de aguas blandas (<75 mg/l de CaCO<sub>3</sub>), de acuerdo al TULSMA y la OMS que refiere 500 mg/l de CaCO<sub>3</sub>.

El Hierro presentó valores promedio en época lluviosa de 0.413mg/l, mientras que en época seca de 0,835 mg/l, valores por encima de lo permitido 0,3 mg/l, por EPA y por debajo de los parámetros de Acuerdo Ministerial no. 97, OMS y TULSMA. Este elemento es muy común en la corteza terrestre, por lo que se encuentra naturalmente en el agua, al entrar en contacto con el oxígeno de la atmósfera, el hierro ferroso se oxida a férrico por lo que tiende a manchar las tuberías, en concentraciones superiores a 0,3mg/l, también provoca la aparición de bacterias que lo consumen y forman una biopelícula gelatinosa, degradando la calidad del agua al momento de la circulación.

Los valores promedio del Manganese alcanzaron, en época lluviosa 0,442 mg/l y en época seca 0,43mg/l, superando el límite máximo permisible (0,05 mg/l) de EPA, OMS y TULSMA; estas concentraciones en agua oxigenada forman sólidos insolubles, coloración del agua.

### **2.3. Índice de calidad de agua**

El índice de calidad del agua en época lluviosa fue de 73,00 y en época seca 76,00 (Tabla 5 y 6), se ubican en aguas levemente contaminadas, de dudoso consumo, sin tratamiento. No apta para consumo humano (Soto & Reina, 2012); (Córdova, Gaete, & Aránguiz, 2009); (González & Caballero, 2006); (Pickett & Cadenasso, 2002); (Andrade & Rivadeneira, 2014).

**Tabla 4. Criterios de calidad del agua para consumo humano**

Parámetros*	Época lluviosa	Época seca	NTE INEN 1108	EPA	Acuerdo Ministerial n° 097	OMS	TULSMA
Oxígeno disuelto (% Saturación)	14,843	13,0	-	-	-	-	no menor al 80% de saturación
Nitritos (mg/l)	0,154	0,006	50	10	50	50	< 2
Nitratos (mg/l)	0,42	1,04	50	10	50	50	50
Coliformes totales (NMP/100 ml)	1	1	-	-	200	-	200
Coliformes fecales (NMP/100 ml)	1	1	<1,1	-	1000	-	1000
Temperatura (°C)	26,8	25,6	-	-	-	-	-
pH	7,45	7,26	-	6,5-8,5	42619	6.5-9.2	6 – 9
Dureza (mg/l)	149,2	115,6	-	-	-	500	500
Cloruros (mg/l)	5,9	5,08	-	-	-	250	-
hierro (mg/l)	0,413	0, 835	-	0,3	1	1	1
manganeso (mg/l)	0,442	0,431	-	0,05	-	0,4	0,1
Sulfato SO4-2 (mg/l)	2,11	0,111	-	-	500	-	500
Color (UPC)	26	21	15	15	75	-	75
Turbidez (NTU)	1,4	1	5	-	100	5	100

\*Análisis de Laboratorio grupo químico Marcos ISO 17025 <http://www.grupoquimicomarcos.com/>

**Tabla 5. Índice de Calidad Agua en la época lluviosa**

Parámetros	Valor	Unidad	Subíndice	Peso relativo	w corregido	ICAm
Coliformes fecales	1	NMP/100 ml	100	0,116	0,143	1,93
Oxígeno disuelto	14,8	% Saturación	23	0,109	0,136	1,53
DBO5		mg/l		0,097		
Coliformes totales	1	NMP/100 ml	100	0,090	0,117	1,71
Nitratos	0,42	mg/l	100	0,090	0,117	1,71
Conductividad		uS/cm		0,079		
Temperatura	26,8	°C	86	0,077	0,104	1,59
Ph	7,45	—	100	0,077	0,104	1,61
Cloruros	5,9	mg/l	100	0,074	0,101	1,59
Dureza	149,2	mg/l	58	0,065	0,092	1,45
Alcalinidad		mg/l		0,063		
Color	26	UPC	58	0,063	0,090	1,44
ICA= 73,00						

**Tabla 6. Índice de Calidad Agua en la época seca**

Parámetros	Valor	Unidad	Subíndice	Peso relativo	w corregido	ICAm
Coliformes fecales	1	NMP/100 ml	100	0,116	0,143	1,93
Oxígeno disuelto	13,0	% Saturación	21	0,109	0,136	1,51
DBO5		mg/l		0,097		
Coliformes totales	1	NMP/100 ml	100	0,090	0,117	1,71
Nitratos	1,04	mg/l	100	0,090	0,117	1,71
Conductividad		uS/cm		0,079		
Temperatura	25,6	°C	96	0,077	0,104	1,61
pH	7,26	—	110	0,077	0,104	1,63
Cloruros	5,08	mg/l	100	0,074	0,101	1,59
Dureza	115,6	mg/l	65	0,065	0,092	1,47
Alcalinidad		mg/l		0,063		
Color	21	UPC	61	0,063	0,090	1,45
ICA= 76,00						

Fuente: Elaboración propia

La mayoría de los parámetros de la calidad del agua presentaron diferencias significativas (“t” al 5%) entre las épocas: lluviosa y seca. Los promedios más altos en la época lluviosa fueron: alcalinidad, nitritos y sulfatos, fueron pH, dureza, color, nitritos y sulfatos. Los parámetros con mayor promedio en la época seca fueron: nitratos y hierro. Los parámetros que no presentaron diferencia significativa fueron; turbidez, dureza total, sólidos totales disueltos, conductividad eléctrica, manganeso, nitratos y coliformes totales (Tabla

7). Los valores de nitratos, nitratos y sulfatos obtenidos, tanto en la época lluviosa como en época seca, son inferiores a los límites permisibles; esto coincide con los resultados obtenidos por (Borbolla, Cruz, Piña, Fuente, & Garrido, 2003); (Pérez, Delgado, & Torres, 2012), quienes indican que el agua destinada a consumo humano debe cumplir las normas de calidad para evitar riesgos de enfermedades en los seres humanos que la utilizan.

**Tabla 7. Promedios de los parámetros de la calidad del agua en época lluviosa y seca**

Parámetros	Época lluviosa	Época Seca	Valor de “t”	Desviación estándar
Coliformes fecales (NMP/100ml)	1,00 a	1,00 a	0,28	0,03
Oxígeno Disuelto (% saturación)	14,80 a	13,00 a	0,45	0,38
Coliformes totales (NMP/100ml)	1,00 a	1,00 a	0,28	0,03
Nitratos (mg/l)	0,42 b	1,04 a	1,31	0,44
Temperatura (°C)	26,80 a	25,60 a	0,32	0,32
pH	7,45 a	7,26 b	2,24	0,06
Cloruros (mg/l)	5,90 a	5,08 a	0,38	0,08
Dureza (mg/l)	149,20 a	115,60 b	3,18	1,14
Color (UPC)	26,00 a	21,00 b	2,32	8,72
Nitritos (mg/l)	0,154 a	0,006 b	2,25	0,06
Hierro (mg/l)	0,413 b	0,835 a	2,86	0,14
Manganeso (mg/l)	0,442 a	0,431 a	0,30	0,04
Sulfatos (mg/l)	2,11 a	0,111 b	2,51	0,80

Promedios con letras diferentes (a ó b) difieren estadísticamente de acuerdo al test de Student ( $p < 0.05$ ).  
Elaboración propia

### III. CONCLUSIONES

El Índice de calidad del agua determina que esta agua no es apta para consumo humano, debido a que los indicadores la ubican en agua de dudoso consumo, que requiere tratamiento de potabilización. Los promedios de los parámetros nitritos, turbidez, sólidos disueltos totales, pH, dureza total, color y hierro, se encuentra en aceptabilidad de calidad ambiental. Los valores de coliformes fecales, Manganeso y oxígeno disuelto en época lluviosa, sobrepasan los límites máximos permisibles, elementos que no cumplen con la calidad ambiental. Los parámetros pH, dureza, color, nitritos y fosfatos aumentaron en la época lluviosa y, nitratos y hierro en la época seca, por lo que se debe realizar un monitoreo permanente con el fin de identificar los focos de contaminación y evolución en el tiempo.

### IV. REFERENCIAS

- Andrade, J., & Rivadeneira, J. (2014). *Modificación Simplificada Del Método De DELPHI*. Portoviejo, Manabí, Ecuador: Seminario Internacional Sobre Índices De Calidad Ambiental .
- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (21a ed. ed.). Washington, USA.
- Arizabalo, R. y. (2010). *La contaminación del agua subterránea y su transporte en medios porosos*. UNAM, Ed. Madrid .
- AWWA. (2012). *American Water Works Association. Manual de entrenamiento para operadores de sistema de distribución de agua*. . Estados Unidos: Primera ed. .
- Borbolla, M., Cruz, L., Piña, O., Fuente, J., & Garrido, S. (2003). *Calidad del agua en Tabasco. Salud en Tabasco*. Tabasco, México: No. 9 (1). Pp.170-177.
- Brown, R., McClelland, N., Deininger, R., & Tozer, R. (octubre de 1970). A water Quality Index –Do We Dare? *Water And Sewage Works*. 339-343.
- Burgos, E., & Agudo, D. (2015). Análisis de la eficiencia de filtros a base de zeolita para la remoción de contaminantes en el agua proveniente de dos pozos de abastecimiento público en el Recinto Tres Postes, Cantón Alfredo Baquerizo Moreno. Guayaquil, Guayas, Ecuador: ESPOL.
- Cohn, D., Cox, M., & Beger, P. (2002). *Aspectos de la calidad del agua, salud y estética*. Madrid, España: Mc Graw-Hill.
- Cohn, D., Cox, M., & Beger, P. (2002). *Aspectos de la Calidad del Agua, Salud y Estética* . Madrid , España: Mc Graw-Hill .
- Córdova, S., Gaete, H., & Aránguiz, F. (2009). *Evaluación de la Calidad de las Aguas del Estero Limache (Chile Central), mediante Bioindicadores Y Bioensayos*. Valparaíso, Chile . Valparaíso, Chile: Departamento de Biología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso .
- Cotler, H. (2004). *El manejo integral de cuencas en México: estudios y reflexiones para orientar la política ambiental*. . México: Ed. Instituto Nacional de Ecología INE. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 269 p.
- Cotler, H. (2007). *El manejo integral de cuencas en México. Estudios y reflexiones para orientar la política ambiental*. 2 ed. México, 42-58.
- Deepak, J. y. (2013). Measuring Customer Lifetime Value: Models and Analysis . *INSEAD- Working Paper No27/MKT*. 10, 50. Obtenido de Deepak, J y Singh, S. (2013). Measuring Customer Lifetime Value: Models and Analysis INSEAD- Working Paper No27/MKT. 10(50).
- Dinius, S. (1987). Desigh of an Index Of Water Quality . *Water Res. Bull*, 23(5), 833-843
- EPA. (2013). Obtenido de *Environmental Protection Agency – USEPA. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*: <http://water.epa.gov/scitech/monitoring/rsl/bioassessment/>.
- EPA-US. (2013). *Environmental Protection Agency – USEPA. Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*. Recuperado de <http://water.epa.gov/scitech/monitoring/rsl/bioassessment/>.
- González, M., & Caballero, M. (2006). *Microbiología ambiental*. Ed. UNED, Madrid, España, 66-83.
- Goyenola, G. (2007). *Oxígeno disuelto. Guía para la utilización de las Valijas Viajeras*. Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos RED MAPSA.
- Goyenola, G. (2007). *Oxígeno disuelto. Guía para la utilización de las Valijas Viajeras*. Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos RED MAPSA.

- Howard, T. (2000). *Heavy Metals in the Environment. Using wetlands for their removal*. Alemania: Lewis Publisher. pp. 31-48 .
- INEC. (2010). Obtenido de Instituto Nacional de Estadísticas y Censos en la provincia de Los Ríos. www.inec.gob.ec
- INEN. (1998). *Norma Técnica Ecuatoriana Nte. Agua. Calidad Del Agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras*. Quito, Ecuador. Quito, Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Normas 1107 y 1108.
- INEN, Instituto Ecuatoriano de Normalización. (noviembre de 1998). *Norma Técnica Ecuatoriana Nte. Agua. Calidad del Agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras*. Quito, Ecuador.
- Manahan, S. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. Reverte, Ed. Barcelona.
- Martínez, C., & García, A. (2009). *Perímetro de protección para captaciones de agua subterránea destinada al consumo humano. Metodología y aplicación al territorio*. IGME, Ed. Madrid, España.
- Morais, P., Resende, B., Palau, P., & Tiago, G. (2016). Estudio da qualidade da água por meio de bioindicadores bentônicos em córregos da área rural e urbana. *Tabauté*, 11(1), 33-52.
- Novotny, V. (1996). Diffuse Sources of pollution by toxic Metals and Impact on Receiving Waters H. En S. W. P., *Heavy Metals; Problems and Solutions* (págs. 33-52). Alemania, Alemania: Environmental Science Springer-Verlag.
- OMS. (1995). *Guías para la calidad del agua potable. Ginebra, Suiza*: Organización Mundial de la Salud (OMS). Volumen 1. 195 p.
- OMS. (2006). *Guías para la calidad de agua potable. Ginebra-Suiza*. 45p. Obtenido de Organización Mundial de la Salud (OMS). (2006). Guías para la calidad de agua potable. Ginebra-Suiza. 45p.
- Pérez, A., Delgado, L., & Torres, P. (2012). Evolución y perspectivas del sistema de abastecimiento de la ciudad de Santiago de Cali frente al aseguramiento de la calidad del agua potable. Ingeniería y Conectividad R. *Revista Científica y Tecnológica*. 14 (2), 14.
- Pickett, S., & Cadenasso, M. (2002). *The ecosystem as a multidimensional concept: meaning, model and metaphor*. Ecosystems, Vol. 5, Issue, New York, USA.
- Salomons, W., Förstner, U., & Mader, P. (1996). *Heavy Metals. Problems and Solutions*. Alemania: Environmental Science Springer-Verlag.
- SENAGUA. (2009). *Informe de rendición de cuentas*. Quito-Ecuador. 10-19 p. : Secretaría Nacional del Agua.
- Sierra, C. (2016). *Calidad del Agua: evaluación y diagnóstico*. Medellín, Colombia: Mc Graw-Hill.
- Soto, C., & Reina, E. (2012). *Análisis de la calidad del agua en la subcuenca del río Coca. Estudio técnico*: DNCA – DHN – 12 – 01. . Coca, Ecuador: Secretaría Nacional del Agua.
- Stevenson, S. (1999). Aquatic habitat assessment: common methods. *American Fisheries Society, Bethesda, Maryland*.
- Torres, P., Cruz, C., & Patiño, P. (2010). Indices de calidad de agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano. Una revisión crítica. *Revista ingenierías*, 8(15).
- TULSMA, L. M. (2015). *Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua. Anexo 2, Libro VI*. Quito, Ecuador: Ministerio del Ambiente.
- UNESCO (2003). *División de Ciencias del Agua. Agua para todos, Agua para la vida*. París.
- Vasanthavigar, M., Srinivasamoorthy, K., & Vijayaragavan, K. (2010). Obtenido de Environ Monit Assess 171: 595. doi:10.1007/s10661-009-1302-1.
- Wastewater, S. M. (2005). APHA. Washington, Estados Unidos: American Public Health Association. 1 (a ed.

# Técnicas analíticas para el control de la contaminación ambiental

Carmen, Hernández-Domínguez<sup>1\*</sup>; Patricio, Álvarez-Muñoz<sup>2</sup>; Juliana, Zapa-Cedeño<sup>3</sup>

## Resumen

En el control de la contaminación ambiental es esencial realizar un muestreo adecuado, con el siguiente tratamiento de muestra, para continuar con el análisis de los posibles contaminantes. Para lograr un análisis satisfactorio es fundamental emplear la técnica analítica más conveniente para cada tipo de muestra, tipo de análisis, etc. En esta contribución se ha realizado una revisión exhaustiva de las técnicas de análisis más importantes para el control de la contaminación medioambiental en función del tipo de muestra, si ésta es orgánica o inorgánica y del estado físico en que se encuentra.

**Palabras Clave:** detección; determinación; eficiencia; especificidad; medioambiente; muestra; química analítica; sensibilidad.

## Analytical techniques for environmental pollution control

### Abstract

In the control of environmental pollution, it is essential to make adequate sampling, the following sample treatment, to continue the analysis of possible contaminants. To achieve a satisfactory analysis is essential to use the most suitable analytical technique, for each type of sample, type of analysis, etc. This contribution has made a thorough review of the most important analytical techniques for the control of environmental pollution depending on the type of sample, whether it is organic or inorganic and in which physical state the sample is.

**Keywords:** analytic chemistry; detection; determination; efficiency; environment; sample; sensitivity; specificity.

**Recibido:** 27 de mayo de 2016

**Aceptado:** 10 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Docente de la Facultad de Ciencias de Ingeniería en la Universidad Estatal de Milagro, Ciudadela Universitaria Km 1 ½ vía Km 26 Milagro 091050, Guayas, Ecuador. Doctora en Química Analítica y Análisis Instrumental, Máster en Formación de E.S.O y Bachillerato y Licenciada en CC. Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. <http://orcid.org/0000-0002-2806-4917>. [chernandezd@unemi.edu.ec](mailto:chernandezd@unemi.edu.ec)

<sup>2</sup>Docente de la Facultad de Administración en la Universidad Estatal de Milagro, Ciudadela Universitaria Km 1 ½ vía Km 26 Milagro 091050, Guayas, Ecuador. Economista por la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Guayas (Ecuador). MAE por la Universidad Tecnológica Empresarial de Guayaquil, Guayas, Ecuador. Doctorando por la Universidad de Barcelona, España. <http://orcid.org/0000-0002-9754-8050>; [palvarezm@unemi.edu.ec](mailto:palvarezm@unemi.edu.ec)

<sup>3</sup>Docente Técnico de la Facultad de Ciencias de la Salud en la Universidad Estatal de Milagro, Ciudadela Universitaria Km 1 ½ vía Km 26 Milagro 091050, Guayas, Ecuador. Licenciada en Terapia Respiratoria por la Universidad Estatal de Milagro. Estudiante de Máster Universitario en Actividad Física y Salud por la Universidad Europea de Madrid, Madrid (España). [jkarina\\_91@hotmail.com](mailto:jkarina_91@hotmail.com)

\*Autor de correspondencia [carmen.hernandez.dominguez@gmail.com](mailto:carmen.hernandez.dominguez@gmail.com)

## I. INTRODUCCIÓN

El análisis de muestras ambientales es imprescindible para una correcta interpretación de cualquier estudio en el ámbito de ésta área. ¿Cómo se puede detectar un episodio puntual?, ¿Cómo se puede fabricar respetando el medio ambiente?, ¿Cómo se puede restaurar o regenerar un espacio contaminado?, o simplemente, ¿cómo podemos seguir el curso del transporte natural de sustancias en la atmósfera o en el ciclo del agua?

La respuesta se obtiene cuando se conoce exactamente cuál es la composición de esas matrices. A veces no basta con decir qué elemento o compuesto existe, sino que hay que saber la estructura química del compuesto. Si se toman como ejemplo las Dioxinas y Furanos, o compuestos organometálicos de Hg, Sn y Pb, en los que de todos los congéneres posibles solamente unos pocos son considerados como tóxicos (Reeve, 2002). La Química Analítica tiene que dar la respuesta a toda esta problemática de forma rápida y segura.

Para situarse en los problemas que se deben abordar, hay que pensar en la naturaleza de las muestras que normalmente deberán ser analizadas, variedad y complejidad, en general, siempre estará presente. Se trata de muestras reales que pueden ser, gaseosas, líquidas o sólidas, de tipo inorgánico, orgánico o de origen biológica. Otra necesidad con la que se encuentra la Química Analítica, es dar respuestas rápidas e “in situ”, por lo que existe un amplio campo dentro de los sensores y el análisis automático que la Química Analítica debe abordar.

La complejidad de la mayoría de las muestras medio ambientales, llevará, casi siempre, a la utilización de técnicas combinadas, motivadas por un pretratamiento o limpieza de la muestra y ser necesaria una separación previa antes de la detección. (Harvey, 2000)

En este artículo se trata de resumir y dar a conocer los aspectos de mayor interés del análisis medioambiental bajo dos aspectos: tipo de muestra y validez del método o técnica. No se ha centrado en ninguna región en concreto, sino que a través de diversos documentos (libros y artículos científicos), se han explicado las técnicas más empleadas en el análisis ambiental. Por esta razón no se hace referencia a ninguna legislación.

La metodología que se ha empleado en la elaboración de este artículo fue a través de un compendio de las obras más relevantes de la Química Analítica, Química Ambiental y el Análisis Ambiental.

## II. DESARROLLO

### 1. Metodología

#### Materiales y métodos

La metodología empleada fue realizar un análisis descriptivo bajo el criterio de analizar la literatura más relevante sobre la contaminación ambiental y las técnicas empleadas en el análisis de la contaminación, así como del tipo de muestras medioambientales, los contaminantes y sus niveles máximos permitidos.

En este artículo los resultados no son cuantitativos, sino cualitativos, ya que se realiza una descripción de las principales muestras medioambientales, los tipos de contaminantes y qué técnicas se emplean para su análisis químico.

En primer lugar se describirán los distintos tipos de muestras medioambientales, clasificándolas en función del estado físico en que se encuentran, líquido, sólido o gaseoso. Continuando con las necesidades analíticas en función de la sensibilidad, describiéndose los tipos de análisis en muestras medioambientales y las reacciones químicas en el medioambiente. Finalizando con las técnicas de análisis que se emplean en función de la muestra a analizar.

### 2. Resultados

#### 2.1 Tipo de muestras medioambientales

##### Muestras gaseosas

El gas principal y el que más atención requiere en estudios medioambientales es la atmósfera, necesitando un control continuo de su calidad. Para poder definir la calidad de una atmósfera determinada es necesario realizar análisis continuo de los componentes minoritarios y de diversos posibles contaminantes dependiendo éstos de la zona de influencia y los posibles compuestos generados en ella, bien de forma natural o de origen antropogénico (Kettrup, 2002). Conviene señalar aquellos más comunes, ver Tabla 1.

**Tabla 1. Componentes minoritarios de la atmósfera**

Compuesto	Concentración Típica
CO-CO <sub>2</sub>	100ngg <sup>-1</sup> -344 µgg <sup>-1</sup>
O <sub>3</sub>	1 a 100 ngg <sup>-1</sup>
CH <sub>4</sub>	1-2 µgg <sup>-1</sup>
NO <sub>x</sub>	310 ngg <sup>-1</sup> (N <sub>2</sub> O)
	1 a 1000 ngg <sup>-1</sup> NO
SO <sub>2</sub>	1 a 1000 p ngg <sup>-1</sup>
CFCL <sub>2</sub> yCF <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200-340 pgg <sup>-1</sup>

Elaborado por los autores

Son considerados como compuestos contaminantes en la atmósfera todos aquellos compuestos que se encuentren en cantidad mensurable diferentes a los componentes naturales. Partiendo de esta definición en la atmósfera los contaminantes se encuentran como (Tabla 2):

**Tabla 2. Tipos de contaminantes orgánicos e inorgánicos en la atmósfera**

Contaminantes Orgánicos	Contaminantes Inorgánicos
Hidrocarburos	SO <sub>2</sub> NO <sub>x</sub> NH <sub>3</sub> , SH <sub>2</sub>
Compuestos Organoclorados y Clorofluorocarbonos CFCs	Metales pesados
PAN(Peroxiacetil Nitratos)	Organometálicos (Pb, Hg, Sn)
Formaldehído	
Compuestos Orgánicos Volátiles(VOC) Polares muy reactivos y No polares, más inertes	

Elaborado por los autores

Para el análisis de estos compuestos, la mayoría de las veces, se necesitan utilizar técnicas selectivas y muy sensibles, puesto que, los niveles de concentración en que se encuentran van a ser del orden de ppm o ppb e incluso, a veces, se necesita determinar ppt. Si se consideran los contaminantes orgánicos hay que introducir muchas veces un nuevo parámetro de selectividad, como es el distinguir entre los isómeros de un mismo compuesto, ya que, solamente alguno de los congéneres es el compuesto de interés. (Winefordner, 2003)

En la determinación de compuestos gaseosos es también necesario, muchas veces, analizar compuestos sin poder realizar una toma de muestra físicamente, por ser ésta inaccesible o bien que sea necesario realizar análisis “in situ” o en continuo empleando sensores remotos.

### Muestras medioambientales líquidas

La muestra medioambiental líquida por excelencia, y casi en exclusiva, es el agua. Se distingue entre aguas naturales (superficiales o subterráneas), aguas de consumo urbano, aguas de uso industrial o aguas residuales industriales o urbanas o de zona agrícola. (Rouessac & Rouessac, 2004)

La problemática analítica difiere del tipo de agua a analizar ya que los parámetros a considerar difieren al igual que los que se emplean para su caracterización.

En los diversos análisis de aguas será necesario, y muchas veces, especiar compuestos inorgánicos, especialmente metales, compuestos orgánicos y organometálicos, dependiendo de cuál sea su procedencia y los efluentes que pueden llegar de otras fuentes etc. (Rouessac & Rouessac, 2004)

Pensemos en las determinaciones necesarias e imprescindibles que deben realizarse a las aguas potables de suministro a la población, sin considerar los análisis microbiológicos y que se presenta en la Tabla 3. Estas determinaciones es necesario realizar todos los días, y varias veces al día, en la toma de aguas y una vez potabilizada.

**Tabla 3. Parámetros Químicos en Aguas Potables**

Compuesto	Concentración máxima	Compuesto	Concentración máxima
Acrilamina	0.1µg/ml	Epiclorhidrina	0.10µg/ml
Antimonio	5.0µg/ml	Fluoruro	1.5µg/ml
Arsénico	10µg/ml	Plomo	10µg/ml
Benceno	1.9 µg/ml	Mercurio	1.0µg/ml
Benzo-alfa Pireno	0.010 µg/ml	Níquel	20µg/ml
Boro	1.0 mg/ml	Nitrito	0.50 mg/ml
Bromato	10µg/ml	Nitrato	50 mg/ml
Cadmio	5.0µg/ml	Plaguicidas	0.10ug/ml Totales
Cromo (III) y (VI)	50µg/ml	PAHs	0.10µg/ml
Cobre	2.0 mg/ml	Selenio	10µg/ml
Cianuro	50 µg/ml	Tetra y Tricloroetano	10µg/ml
1,2-Dicloroetano	3.0 µg/ml	Trihalometanos	100µg/ml

Elaborado por los autores

Algunos de estos parámetros son sencillos de determinar; sin embargo, hay otros que, aunque parecen sencillos, necesita un procedimiento complicado; por la necesidad de separar interferentes presentes y tener que realizarlos con la sensibilidad requerida para poder determinar los niveles en los que el agua se considera como no potable.

Cuando se trata de agua de mar o aguas residuales deben ser considerados aspectos particulares, en cuanto a los procedimientos a aplicar. El agua de mar tiene su singularidad debido a su alta concentración salina y las aguas residuales puede establecerse que cada una es distinta, depende fundamentalmente de cuál es su origen.

### **Muestras medioambientales sólidas**

El análisis de contaminantes en sólidos lleva generalmente emparejado el problema del tratamiento de la muestra, puesto que, éste difiere de cual sea su origen (mineral, orgánico, biológico, vegetal etc.). También hay que considerar si el análisis a realizar puede hacerse con técnicas de análisis destructivas o no destructivas, si interesa el contenido total solamente, o las diferentes especies, o bien su composición superficial.

El problema de la disolución se reduce en muchos casos a un problema de extracción de un determinado analito teniendo en cuenta los factores de solubilidad, polaridad, estabilidad etc. Otras veces el problema se complica como es el caso de muestras de origen biológico, en los que a menudo hay que realizar etapa de disolución, etapa de limpieza y etapa de extracción y preconcentración de la especie a analizar (Wilson, 2015).

### **2.2 Necesidades analíticas en función de la sensibilidad**

Corrientemente los analitos a determinar son clasificados en función de cuál es la concentración relativa en mayoritarios, minoritarios, trazas y subtrazas, esta concentración relativa condiciona la técnica a utilizar, conjuntamente con la selectividad requerida.

En la determinación de un componente al estado de subtraza debe elegirse el procedimiento de entre aquellas técnicas que permitan su identificación inequívoca y que se alcance el límite de determinación requerido por su condición de subtraza, así por ejemplo, para la determinación de mercurio en una muestra a los niveles de ppb o ppt no puede utilizarse la determinación por absorción atómica en llama o cámara de grafito, habrá

que realizarla utilizando como proceso de atomización la técnica de vapor frío y realizar la medida por absorción atómica o fluorescencia atómica. (Cazes, 2011)

### **Tipos de análisis necesarios en muestras medioambientales**

Las necesidades medioambientales, frecuentemente, no se limitan al conocimiento de la concentración total de una especie; sino que, es necesario determinar cada una de las especies en las que está un metal, o la concentración de cada uno de los isómeros o congéneres de un determinado compuesto orgánico y también establecer la reacción de una sustancia en un medio determinado, o la transformación de un compuesto en el medio natural; teniendo que realizar las determinaciones de las especies reaccionantes, o de los productos de reacción, es decir, que hay que conocer la composición no solo del producto de partida, sino también, los metabolitos originados. (Fifield & Haines, 1995)

La determinación de la concentración total de un elemento químico o un compuesto orgánico, generalmente no presenta dificultades especiales; actualmente se dispone de técnicas analíticas con sensibilidad adecuada a las necesidades. Sin embargo, los problemas analíticos surgen cuando tenemos que realizar una determinación de especies o el seguimiento de una reacción o transformación de compuestos.

Como ejemplos típicos en este campo se señalará a continuación alguna problemática específica.

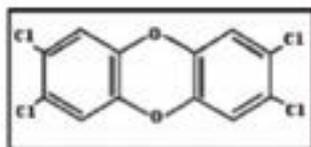
#### *a) Estudios de Compuestos organometálicos:*

En la determinación de Sn, Hg o As en seres vivos o en aguas y sedimentos, generalmente no interesa como aspecto prioritario conocer la concentración total de estos elementos, pues es un dato relativo y que sirve para realizar, posteriormente, un balance de masas. Es de mayor interés conocer el contenido, por ejemplo, para los organoestaños en BuSnCl<sub>3</sub> (MBT), Bu<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> (DBT), Bu<sub>3</sub>SnCl (TBT), PhSnCl<sub>3</sub> (MPhT), Ph<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> (DPhT), Ph<sub>3</sub>SnCl (TPhT) o para el arsénico en matrices marinas y sólidos lo que interesa es saber el contenido en arsenobetaina, arsenocolina, ácido monometilarsónico, ácido dimetilarsínico, As(III) y As(V)). Dependiendo de cuál sea el compuesto considerado como tóxico. (Fifield & Haines, 1995)

#### *b) Determinación de Dioxinas y compuestos relativos:*

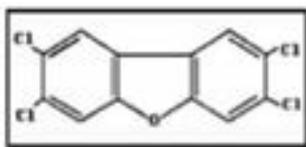
De los 75 congéneres de dioxinas que se puede encontrar, únicamente son considerados como tóxicos en las concentraciones en ppt los siguientes:

2,3,7,8-TCDD; 1,2,3,7,8-PeCDD; 1,2,3,4,7,8-HxCDD; 1,2,3,6,7,8-HxCDD; 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD; 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD. (Fifield & Haines, 1995)



**Figura 1. Dioxina**  
Elaborado por los autores

De igual forma para los furanos de los 135 congéneres únicamente se consideran tóxicos y bifenilos, 13 de ellos.

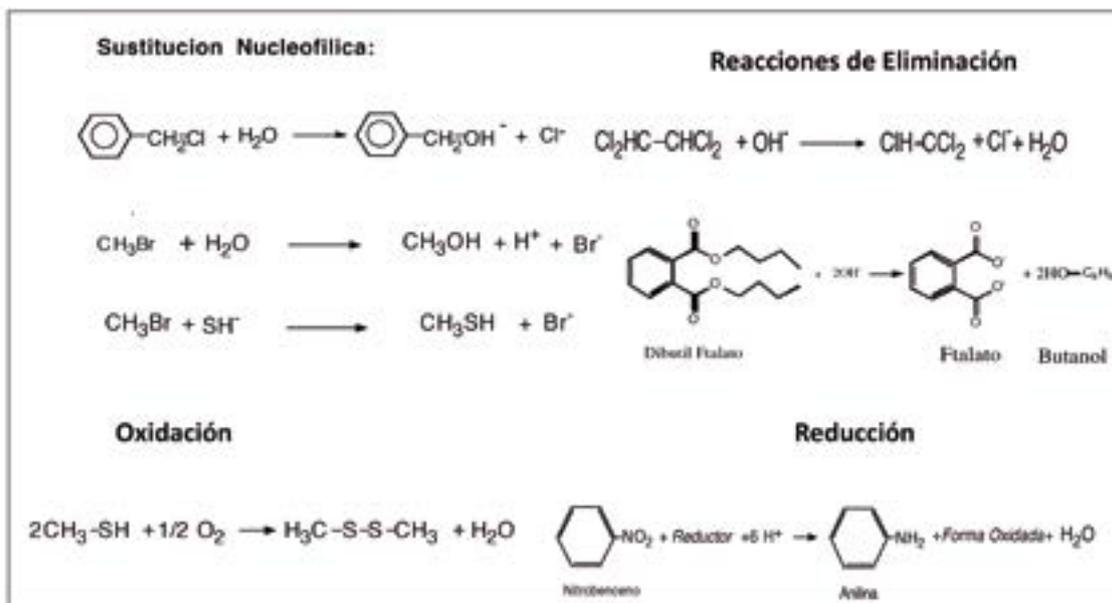


**Figura 2. Furano**  
Elaborado por los autores

Como fácilmente puede deducirse, la complejidad y dificultad de un análisis de Dioxinas, Furanos y PCBs llevará a utilizar una técnica muy sensible y muy selectiva, puesto que es necesario discernir y cuantificar compuestos semejantes, con muy pocas diferencias en sus propiedades físicas y químicas. (Lee, 2003)

*c) Reacciones Químicas en el Medioambiente:*

Las condiciones del medio natural son de tal naturaleza que se está en un medio reactivo, por lo que son frecuentes las transformaciones de los compuestos por reacción con el H<sub>2</sub>O o en el agua y reacciones Redox. A menudo estas reacciones están acompañadas de reacciones fotoquímicas, debido a la activación de las moléculas al absorber la radiación solar, es decir, la naturaleza es un medio reactivo y por tanto a la hora de buscar ciertas especies contaminantes, se debe ir hacia la determinación de los productos de reacción o metabolitos generados. (Fifield & Haines, 1995). En la Figura 3, para aclarar estos conceptos, se presenta algunas de las principales reacciones que se dan en el ambiente, con ejemplos específicos:



**Figura 3. Reacciones químicas más comunes en el medioambiente**  
Elaborado por los autores

A la vista de las posibles reacciones que se dan, bien por reacciones entre diferentes especies, reacciones de oxidación por el oxígeno atmosférico, reacciones ácido-base en el agua, siempre hay que buscar no solo los compuestos madre, sino que muchas veces es más importante la determinación de los posibles metabolitos. El seguimiento del vector contaminante se debe realizar midiendo la variación de la concentración de los productos de reacción en la zona aerobia y anaerobia.

### **Técnicas Analíticas en Análisis Medioambiental**

La necesidad de conocer tanto la composición como los posibles contaminantes de una determinada muestra, la posibilidad de hacer una toma de muestra física, o su imposibilidad, junto con la necesidad de conocer la variación puntual en el tiempo de los contenidos en las más variadas especies y compuestos, ha llevado a que, en estos momentos, la Química Analítica, proporcione diversas metodologías apropiadas a las necesidades medioambientales. (Smith, 2008). Así se pueden clasificar las medidas analíticas en cuatro grupos fundamentales, independientemente de cual sea la Técnica Analítica que se utilice en cada momento.

#### *a) Medidas en Continuo*

Dentro de las Técnicas Analíticas disponibles, muchas pueden utilizarse en análisis en continuo. Hay que señalar ejemplos concretos, como la automatización de un análisis de agua que se emplea en muchos laboratorios de control de agua potable.

Otro ejemplo de las necesidades de análisis en continuo es el control de compuestos en las atmósferas de las poblaciones, para el seguimiento de la distribución de contaminantes atmosféricos y que hace necesario el control continuo de los siguientes parámetros: niveles de CO<sub>2</sub> y CO, de NO<sub>2</sub> y NO, de SO<sub>2</sub>, de CH<sub>4</sub>, de O<sub>3</sub> troposférico o urbano y O<sub>3</sub> estratosférico.

Para llevar a cabo estas automatizaciones, generalmente, se utilizan técnicas de respuesta rápida y en continuo, acopladas, a veces, a sistemas de separación previa a la detección o bien a la utilización de Sensores selectivos acoplados a sistemas automáticos de análisis de gases o en sistemas líquidos que cada día se están imponiendo más. (Scott, 1997)

#### *b) Analizadores de Gases*

Estos sistemas pueden estar diseñados procurando

separar, mediante sistemas de trampas reactivas o adsorbentes, aquellos gases interferentes al sensor selectivo o bien dejando pasar un compuesto únicamente y utilizar un sensor universal.

Para sistemas líquidos, los principales sensores son: los potenciométricos ISE o ISFET; sensores ópticos, comúnmente acoplados a una Fibra óptica, y a un sistema de medida de espectroscopia molecular, de absorción o luminiscencia en el rango UV-Visible. Últimamente se están introduciendo en el campo medioambiental los sensores basados en una reacción redox o amperométricos y los biosensores, que pueden ser de dos tipos, amperométricos u ópticos, dependiendo que la respuesta después de la reacción enzimático, sea un producto electroactivo o con propiedades cromóforas. (Eiceman, y otros, 2006)

Para las medidas en continuo la tendencia actual es sustituir aquellas técnicas que son engorrosas o tienen poca selectividad por técnicas que permitan, en el rango de sensibilidad adecuado, realizar análisis muy selectivos (Scott, 1997). Actualmente se están incorporando a las estaciones de medida en continuo de gases atmosféricos determinaciones de O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub> basadas en reacciones quimioluminiscentes y medida de la radiación fluorescente inducida.

Para la determinación de NO y NO<sub>2</sub> y Ozono y SO<sub>2</sub> o C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, una vez provocadas las reacciones, la medida de las diferentes radiaciones posibilita la determinación de las diferentes especies.

### **2.3 Medidas en laboratorio**

Cuando una muestra llega al laboratorio se debe programar el análisis correspondiente de acuerdo con la procedencia y el muestreo realizado, para ello lo primero que hay que pensar es si las especies a analizar son constituyentes mayoritarios, minoritarios, trazas o subtrazas, con objeto de elegir el procedimiento y la técnica adecuada, encaminada a conseguir resultados exactos e incontestables. (Hernández-Hernández & González Pérez, 2002)

En este sentido toda la instrumentación disponible debe estar perfectamente calibrada y el laboratorio disponer de sustancias patrones certificadas o patrones normalizados previamente. (Hernández-Hernández & González Pérez, 2002)

Como norma general es necesario indicar: si se trata de determinar componentes mayoritarios, los resultados más exactos se consiguen a través de un

análisis volumétrico o gravimétrico, respetando las condiciones en que se deben realizar dichas operaciones, en cuanto a selectividad y teniendo siempre presente las interferencias que pueden presentarse.

Hay que recordar: para la determinación del grado de contaminación del agua basta con realizar una valoración por retroceso con permanganato o dicromato, como paso previo a la determinación del carbono orgánico total por métodos instrumentales.

Para la determinación de compuestos minoritarios, y dependiendo de cuál sea la concentración en que es esperada la especie, habitualmente se recurre a técnicas electroquímicas u ópticas, en función de las propiedades químicas o físicas de las diferentes especies.

Para compuestos trazas y subtrazas, el empleo de técnicas instrumentales se hace imprescindible; aunque su exactitud es menor, sin embargo, la sensibilidad que es posible alcanzar con ellas posibilita realizar determinaciones a niveles de ppm, ppb o ppt, que de otra forma sería imposible o requeriría disponer de un tamaño de muestra difícilmente manejable. Para elegir la técnica de análisis más adecuada es necesario conocer con exactitud el tipo de muestra, es decir, si ésta contiene elementos metálicos o por el contrario se trata de compuestos orgánicos. (Hernández-Hernández & González Pérez, 2002)

**Determinación de Metales**

Para la determinación de Metales habitualmente se dispone de:

*a. Técnicas atómicas*

Las técnicas atómicas están basadas en la utilización de los átomos al estado de vapor y posterior activación por energía electromagnética o energía térmica, midiendo la energía absorbida o emitida por los átomos al pasar a un estado activado o al volver del estado activado, dando lugar a las técnicas de absorción, fluorescencia o emisión atómica.

Todas las técnicas atómicas tienen en común su gran sensibilidad y selectividad, puesto que, están basadas en transiciones electrónicas de átomos por lo que dichas transiciones se producen de forma definida para cada átomo y siendo distinta de un átomo a otro. Esta característica posibilita la determinación multielemental en una sola muestra prácticamente sin interferencias. (Broekaer, 2012)

El aspecto fundamental de las técnicas atómicas es la obtención de los átomos al estado de vapor; lo que

conduce a las técnicas atómicas en llama, electrotérmica, plasma o de vapor frío, dependiendo si la producción de átomos se realiza en una llama. Mediante el calentamiento en un horno, eléctrico, generalmente de grafito, utilizando una fuente energética como un plasma iónico o al generar un vapor mediante una reacción química de un elemento o compuesto con bajo punto de ebullición y tensión superficial baja, el cual genera un compuesto volátil a la temperatura ambiente. (Broekaer, 2012)

Como es bien conocido la base de los métodos atómicos está en la correcta aplicación de la ley de Boltzmann, que indica la relación entre el número de átomos en estado excitado y el de átomos en estado fundamental.

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{P_i^*}{P_0} e^{-E/kT}$$

En la que N\* es el nº de Átomos en estado excitado y N° el de átomos en estado fundamental.

Para la Absorción es necesario que los átomos permanezcan en estado fundamental.

Para la Emisión es deseable que el mayor número de átomos estén en estado excitado.

Para la fluorescencia es independiente, pero se prefiere que la Intensidad de la emisión que se mide proceda de la excitación electromagnética, a través de la lámpara excitadora.

La determinación de metales en muestras ambientales se puede realizar utilizando cualquiera de las técnicas mostradas en la Tabla 4.

**Tabla 4. Resumen de técnicas atómicas**

Absorción atómica	Llama (ppm de la mayoría de los elementos)
	Electrotérmica (Cámara de grafito) ppb de gran número de elementos
Emisión atómica	Vapor frío (para Hg, As, Se, Sb y elementos de hidruros volátiles)
	Llama (alcalinos, alcalinotérreos y muchos otros metales)
Fluorescencia atómica	Plasma óptico (la mayoría de elementos y en concentraciones que varían desde mg/mL a ppb)
	Llama
	Vapor frío (Hg, As, Sb, Se a niveles de ppt)

Elaborado por los autores a partir de Broekaer (2012)

La técnica atómica, que en muestras ambientales se está imponiendo en los últimos años sobre todas las demás, es la que combina el proceso de obtención de vapor atómico por medio de un plasma iónico y como sistema de detección la espectrometría de Masas, lo que da lugar a la popularmente conocida como ICP-MASAS. (Broekaer, 2012). Esta técnica consiste en la producción de vapor atómico con una fuente energética alta, generación de las especies iónicas  $M^+$  e introducción en un detector cuadrupolar de Masas o en uno de Tiempo de Vuelo, diferenciando los distintos elementos por su masa atómica, pudiendo realizar así mismo análisis de la abundancia isotópica de cada elemento. La técnica presenta las ventajas de ser multielemental y selectiva para cada elemento, ya que la propiedad utilizada es su masa Atómica. (Broekaer, 2012)

La utilización del sistema ICP-MS se está convirtiendo en imprescindible, en análisis ambientales, por la necesidad de disponer de un método rápido sensible (se llega fácilmente a la determinación de ppb de la mayoría de elementos), multielemental e incontestable, cualidades todas ellas reunidas en esta técnica.

En conjunción con las técnicas atómicas están apareciendo, en trabajos de investigación recientes y en el mercado, diversos dispositivos de introducción de la muestra en los sistemas atomizadores, encaminados hacia la posibilidad de automatización y análisis de sólidos sin tratamiento previo de la muestra por vía química. Un sistema que poco a poco se va introduciendo en los laboratorios es la Ablación por Láser, con él se consigue introducir la muestra directamente en el sistema de producción del Plasma y así realizar análisis directos desde un sólido, sea por Plasma Óptico o por Plasma Masas. Este sistema minimiza el tratamiento de muestras sólidas y acelera el proceso de análisis. (Broekaer, 2012)

La desventaja mayor es el precio de la instrumentación y su mantenimiento, las últimas aportaciones en este campo están encaminadas a la disminución en el consumo del gas plasmógeno.

#### **b. Técnicas basadas en la radiación X**

Frecuentemente se recurre para la determinación de metales pesados en muestras medioambientales, como polvo atmosférico, aguas o residuos sólidos, a la utilización de la fluorescencia de Rayos X o a la medida, mediante la utilización de partículas aceleradas, que puede ser la Fluorescencia de rayos X inducida por Protones (PIXE), muy útil en estudios de polvo atmosférico y residuos

sólidos. (Rouessac & Rouessac, 2004)

Técnicas que proporcionan medidas muy sensibles y con la ventaja de ser no destructivas, sin embargo, por utilizar los electrones internos de los átomos no diferencian estados de oxidación.

#### *c. Técnicas moleculares*

Las técnicas moleculares tan populares, en la década de los sesenta, para la determinación colorimétrica de metales mediante la formación de complejos coloreados, que se habían abandonado, están resurgiendo, debido a la disposición de espectrofotómetros portátiles o Kits fácilmente transportables, para la realización de análisis in situ, especialmente en análisis de aguas y a la fabricación de tiras reactivas para diferentes elementos, semejantes al súper conocido papel de tornasol para la medida del pH. (Smith, 2008)

Todas las determinaciones basadas en este sistema conjugan la reactividad de los diferentes iones frente a reactivos generales, la formación de complejos con reactivos secuestrantes para la eliminación de posibles interferentes, con la reacción del compuesto generador del color con un reactivo orgánico formador de un complejo estable y proporcionando un compuesto coloreado intenso, que posibilite la detección a niveles de ppm.

Tampoco conviene olvidar que muchos de los complejos formados por la estructura molecular presentan una seria opción hacia la fluorescencia molecular, provocada por la excitación de una radiación en el ultravioleta, lo que proporcionará un método muy sensible en la determinación del elemento. (Fifield & Haines, 1995). Los métodos colorimétricos son de especial aplicación para la determinación de especies aniónicas basados, la mayoría de las veces, en reacciones redox previas.

#### *d. Técnicas electroquímicas*

Se entiende por técnicas electroquímicas aquellas que utilizan el intercambio de electrones en la superficie de un electrodo para provocar una reacción redox, midiendo la intensidad de corriente al potencial de descarga, o el propio potencial de equilibrio. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

Las técnicas electroquímicas se pueden dividir en tres grandes grupos: potenciométricas, voltamétricas y culombimétricas. En análisis medioambiental son especialmente utilizadas las técnicas potenciométricas y voltamétricas, no solo en medidas en laboratorio; sino como base para la fabricación de sensores

electroquímicos y en medidas online. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

Las técnicas potenciométricas son la base de todos los electrodos selectivos y están basadas en la medida del potencial de equilibrio de una reacción redox o potencial de membrana para los electrodos selectivos (ISE), o los electrodos de campo (ISFET) y relacionándolo, a través de la ecuación de Nernst, con la concentración o actividad de la especie medida. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

Las técnicas voltamétricas están basadas en la provocación de la reacción de reducción u oxidación de la especie electroactiva, mediante la aplicación de un potencial y midiendo la intensidad de corriente generada. En las técnicas voltamétricas la forma de aplicar el potencial y cómo se realiza la medida de la intensidad, indica cuál es la técnica utilizada. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

En una reacción provocada en un electrodo, la corriente medida es la suma de la intensidad farádica y la intensidad de carga; por ello la forma de medir la intensidad siempre va dirigida hacia la minimización de la corriente de carga, y relacionar la intensidad medida con la concentración de la especie presente, a través de la ecuación de Cottrell, fijando para ello un tiempo definido para realizar dicha medida. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

Las técnicas voltamétricas se clasifican en función de cuál es la forma de aplicar el potencial al electrodo: voltametría de barrido lineal, voltametría normal de pulsos, voltametría diferencial de impulsos y voltametría de onda cuadrada. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

La medida de la intensidad siempre tiende a realizarse cuando la corriente de carga es cero o próxima a cero y al tiempo en el que exista una mayor intensidad farádica. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

En análisis ambiental, para la determinación de metales y compuestos orgánicos, se suele utilizar una técnica encaminada a la medida de ppms o ppbs mediante la acumulación de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, sea por la formación de una amalgama, en el electrodo de mercurio, constituida al provocar la reducción del metal en su superficie, por la formación de complejos adsorbidos en la superficie del electrodo, o por la formación de compuestos insolubles en el electrodo. Para compuestos orgánicos, también se consigue una acumulación mediante adsorción o a

través de una reacción química en un modificador de la superficie del electrodo, la respuesta del electrodo es seguida por la oxidación-reducción posterior de las especies acumuladas, lo que da lugar a las conocidas técnicas de Stripping, registrando las correspondientes curvas, intensidad potencial o potencial –tiempo. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010) (Lee, 2003)

Las técnicas electroquímicas son muy utilizadas en estudios de especiación de metales pesados, pues al tratarse de técnicas que relacionan el potencial al que se producen las reacciones redox, se está trabajando con energías libres de formación de especies. (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 2010)

#### **Determinación de especies aniónicas**

La determinación de aniones se suele realizar utilizando cualquiera de las siguientes técnicas: potencimetría con electrodos selectivos, cromatografía iónica, electroforesis capilar.

La utilización de electrodos selectivos está muy extendida para la determinación de aniones como Fluoruro, Carbonato, Sulfuro, Cloruro Cianuro y especialmente para los gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, y CNH, sin embargo adolecen de una cierta falta de sensibilidad, puesto que concentraciones inferiores a 10-5 prácticamente no se detectan. (Lee, 2003)

La cromatografía iónica ha sido la técnica más utilizada en los últimos tiempos para la determinación de especies aniónicas, especialmente en aguas, con límites de determinación que están en el rango de las ppm o incluso ppb; así se determinan conjuntamente, con suma facilidad, aniones como Perclorato, sulfato, nitrato, nitrito, cloruro, bromuro, carbonato y otros aniones de tipo orgánico. (Dean, 2007)

Actualmente la determinación de aniones se está realizando de modo más sencillo y de forma selectiva mediante la electroforesis capilar. Técnica basada en la aplicación a dos electrodos de platino, colocados en una disolución tampón, en los extremos de un capilar de sílice, un voltaje de 20-30 KV, con lo que se provoca la movilidad de los aniones hacia el polo positivo y ordenándose en función de su relación carga radio. Mediante la electroforesis capilar es posible la determinación completa, en unos pocos minutos, de los aniones presentes en una muestra líquida. (Berkelman & Stenstedt, sf)

La electroforesis capilar es una técnica muy útil en análisis medioambientales pues, es posible ordenar la

movilidad de aniones, especies neutras y catiónicas, por la aplicación de un potencial y en función de su carga y tamaño. (Smith, 2008). La utilización de detectores universales o selectivos posibilitará una metodología de muy fácil utilización, y de gran eficacia, en determinaciones medioambientales.

**Determinación de compuestos orgánicos de interés medioambiental**

El análisis de compuestos orgánicos en muestras medioambientales es, por lo general, un análisis muy variado, que va de muy sencillo, a muy complicado; puesto que, la casuística es muy variada y las necesidades también lo son.

El análisis de compuestos orgánicos, en cuanto a la elección de la técnica adecuada, generalmente está muy relacionado con la naturaleza de la muestra, la sensibilidad requerida y la rapidez con que se debe realizar.

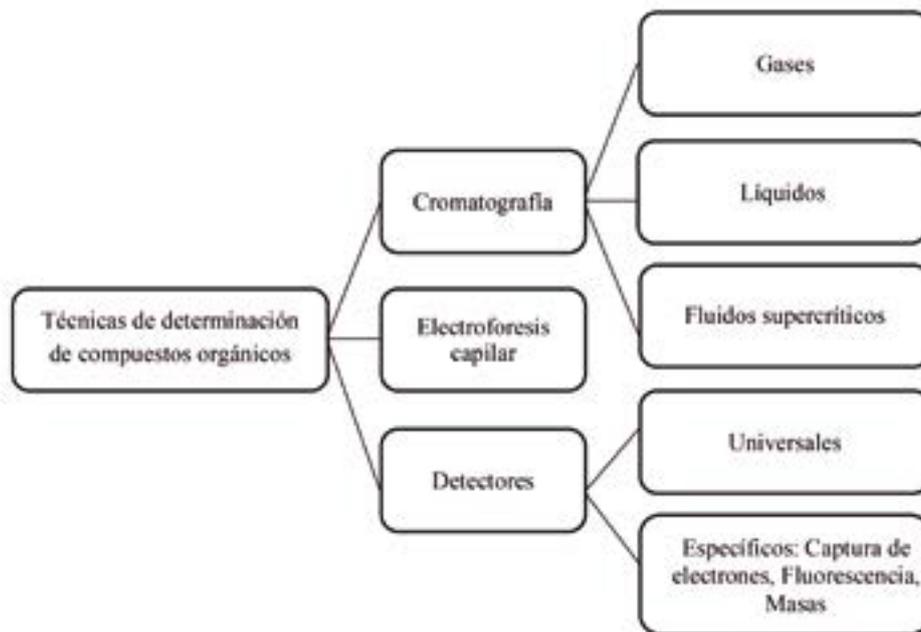
Como norma general, y antes de programar la metodología analítica a utilizar, se debe tener presente las propiedades físico-químicas del compuesto, conociendo su temperatura de ebullición, su solubilidad, polaridad, propiedades espectroscópicas, propiedades redox, y su espectro de Masas principalmente. (Schwarzenbach, Gschwend, & Imboden, 2007)

La determinación de compuestos orgánicos en

una muestra medioambiental no se limita únicamente a un compuesto o en estado prácticamente puro, sino que generalmente es una mezcla de compuestos, o de compuestos y sus metabolitos generados, por distintas reacciones, a partir del compuesto madre. Por ello casi siempre, por no decir siempre, hay que recurrir a la utilización de una técnica de separación de compuestos previa a la determinación, por lo que siempre se piensa en la utilización de una Cromatografía acoplada a la técnica de detección apropiada, atendiendo a las propiedades de los compuestos y su nivel de concentración. (Schwarzenbach, Gschwend, & Imboden, 2007)

También, de manera frecuente, las muestras medioambientales requieren una etapa previa de purificación y preconcentración, mediante sistemas de extracción, cambio iónico, o nuevas técnicas de extracción en fase sólida, tanto en escala macro como micro. Las técnicas cromatográficas tienen la ventaja de permitir el acoplamiento de una técnica de separación muy eficaz en continuo, con técnicas de detección sensibles y universales o selectivas, según las necesidades del análisis a realizar.

En el esquema de la Figura 4, se incluye un resumen de los posibles acoplamientos cromatográficos, con los detectores más comunes, en análisis medioambientales



**Figura 4. Técnicas de determinación de compuestos orgánicos**  
Elaborado por los autores

La elección de la técnica cromatográfica debe realizarse teniendo en cuenta la polaridad y la temperatura de ebullición de las sustancias a separar. Así, en la Figura 4 se resume el camino apropiado para una correcta elección de la técnica cromatográfica a utilizar. (Wilson, 2015)

La eficacia de un análisis cromatográfico depende, de manera fundamental, de la correcta elección de la columna y la fase móvil. La columna se elige en función de la posible interacción entre las sustancias a separar y la fase estacionaria, es decir, del mecanismo de interacción entre el soluto con la fase móvil y la fase estacionaria a utilizar. Así, se debe tener presente si el mecanismo ideal es adsorción, reparto, por fases enlazadas, cambio iónico, formación previa de pares iónicos, exclusión o afinidad, que unido a la elección de fases polares,

semipolares o apolares, proporcionará una correcta separación de los diferentes compuestos o especies, para posteriormente utilizar cualquiera de los detectores adecuados. (Winefordner, 2003)

La elección del detector acoplado al sistema cromatográfico siempre se debe realizar en función de la sensibilidad necesaria y teniendo presentes las propiedades de los compuestos, lo que marcará la selectividad de este detector para ése tipo o familia de compuestos. (Hernández-Hernández & González Pérez, 2002) (Harvey, 2000)

En la Tabla 5 se incluyen los detectores más utilizados en cromatografía de gases y en cromatografía Líquida, para la cromatografía de fluidos supercríticos se utilizan los de gases como líquidos.

**Tabla 5. Detectores cromatográficos**

Cromatografía de Gases		Cromatografía líquida	
Detector	Límite de detección aprox	Detector	Límite de detección
Conductividad Térmica ( No Dest)	400 pg/ml	Índice de Refracción (No Destr)	µg
Ionización de Llama (Dest)	2pg	Ultravioleta Visible (No Des)	µg
Ionización de Llama N-P (Dest)	100fg para N-P	Fluorescencia Molecular (No Des)	Ng
Captura Electrónica (No Dest)	<1pg	Electroquímico-Amperométrico (No D)	Ng
Fotometría de Llama (Dest)	<1pg para Py <10pg paraS	Electroquímico –Culombimétrico (D)	Ng
Quimioluminiscencia para S(Dest)	100 fg	Masas (Destructivo)	µg
IR con FT(No Dest)	200pg a 40ng	IRFT	Mg
Masas (Dest)	24fg a 100 pg		

Elaborado por los autores a partir de Hernández-Hernández & González Pérez (2002)

En química medioambiental es corriente, actualmente, acoplar un detector de masas generador de los iones por impacto electrónico, con un espectrómetro de masas de ionización química, colocar en medio de dos detectores de masas una trampa de iones, para después introducirlo en otro detector de masas y refinar el análisis de este Ion o grupo de iones, es decir, existen múltiples combinaciones para poder refinar un análisis y prácticamente hacer inapelables los resultados obtenidos; aspecto este, importantísimo en estudios medioambientales tanto con fines de recuperación, como desde una perspectiva administrativa. (Kettrup, 2002)

Las combinaciones más frecuentes en espectrometría de masas con la cromatografía o

técnicas como desorción térmica o ablación láser previa, son: masas-masas-masas; masas-masas-tiempo de vuelo; masas-ion trap-masas; ESI-ion trap-ion mobility-TOFMS. (Scott, 1997)

**2.4 Sensores**

En los últimos años las necesidades medioambientales han propiciado obtener respuestas selectivas, y de modo continuo, para ciertos parámetros de interés medioambiental, por su incidencia en la sociedad. Ello lleva a la utilización de sistemas de respuesta continua y selectiva, colocados muchas veces en sitios inaccesibles, esto constituye lo que se conoce como sensores.

Se define como un sensor químico aquel

dispositivo que responde selectivamente a un analito particular, a través de una reacción química y que puede ser usado para la identificación y cuantificación de ese analito. (Cooper & Cass, 2010). Un sensor químico consta de dos partes o regiones; la que posee el dispositivo donde ocurre la reacción química y se produce una señal y la que contiene el transductor que responde a la señal y la traslada, para procesarla y medirla. (Janata, 2001)

Los sensores se pueden clasificar en dos categorías principales: Sensores Químicos y Biosensores, aunque la interfase entre ellos, en muchos casos es total, puesto que la mayoría de los biosensores utiliza las mismas propiedades que los sensores químicos, salvo que se utilizan en material biológico o usa una reacción enzimática como generadora de un producto medible. (Sadana & Neeti, 2011)

Los sensores químicos se pueden clasificar en varios grupos, de acuerdo al tipo de transductor que utilizan.

- **Ópticos:** hay una medida espectroscópica unida a la reacción química, siendo los principales los que utilizan medidas de Absorbancia, luminiscencia, o reflectancia. (Sadana & Neeti, 2011)
- **Electroquímicos:** utilizan bien la medida de un potencial (potenciométricos) o una intensidad de corriente (amperométricos o voltamétricos). (Sadana & Neeti, 2011)  
Dentro de los sensores potenciométricos se incluyen los que utilizan algún tipo de electrodo selectivo de iones ISE y los que utilizan la reacción selectiva unida a un semiconductor, formando un transistor de efecto campo ISFET. En esta categoría también pueden incluirse los sensores de gases basados en semiconductores y que la medida depende de la conductividad del semiconductor, aunque en ellos no hay ninguna reacción química o electroquímica para que se obtenga respuesta.
- **Sensibles a un cambio de Masa:** hacen uso del efecto piezoeléctrico. Responden cuando ocurre un cambio de masa en la superficie de un cristal piezoeléctrico, provocando un cambio en la frecuencia de oscilación, son muy utilizados en análisis de gases. (Sadana & Neeti, 2011)

- Sensibles al calor: basados en la medida del calor de reacción del analito, a través de termistor o un termómetro de platino. (Sadana & Neeti, 2011)
- **Biosensores;** sensor químico, cuya reacción fundamental tiene una especial afinidad a un analito, a través de un reactivo con actividad biológica antígeno anticuerpo, enzima substrato receptor hormona y que produce una señal de cualquier tipo de las señaladas para los sensores químicos, ópticas, electroquímicas, de masa o de calor. (Sadana & Neeti, 2011)

Las principales aplicaciones de los sensores en análisis medioambientales, se encuentran en el control de gases, medidas de pH de aguas naturales e industriales, determinación de pesticidas, etc.

## 2.5 Discusión de los resultados

En el trabajo presentado se describen los tipos de muestras medioambientales más importantes para analizar, gaseosas, líquidas y sólidas, así como los niveles de concentración normales en el caso del aire y los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Con respecto a los contaminantes químicos en aguas potables, tanto orgánicos como inorgánicos, indicando siempre que en la mayoría de los casos es imprescindible especificar en qué forma química se encuentra el contaminante.

Con respecto a las muestras sólidas es necesario tener en cuenta su origen, minera, vegetal, biológico, etc., hay que considerar si el análisis es destructivo o no destructivo, si interesa la composición total o una de las partes o bien su composición superficial. En la mayoría de los casos es necesario, además de su disolución, emplear técnicas de separación.

También se analizan las necesidades analíticas en función de la sensibilidad, componentes. Mayoritario, minoritarios trazas, subtrazas.

Se hacen consideraciones de algunos tipos de muestras medioambientales indicando siempre que es necesario determinar cada sustancia o compuestos derivados, bien por reacción en el medio en el que se encuentra, por reacciones, es decir no solo hay que conocer la composición del producto de partida sino también los metabolitos originados.

En este aspecto se pone más interés en

compuestos habituales y tóxicos que se encuentran en el medioambiente, como son compuestos organometálicos, dioxinas, furanos, y algunos tipos de reacciones que están en el medio natural. Es necesario también realizar distinciones con respecto a las técnicas de medida en éste tipo de muestras, en continuo, analizadores de gases en continuo para contaminantes atmosféricos, aguas potables, fundamentalmente, y las medidas en el laboratorio que se las hacen en:

Determinación de metales por Técnicas atómicas como son la absorción atómica, en llama, cámara de grafito, vapor frío; emisión atómica y fluorescencia atómica.

Técnicas moleculares, técnicas electroquímicas como potenciométricas, voltamétricas y coulombimétricas.

Con respecto a la determinación de especies aniónicas de gran interés en el medioambiente, son destacables los electrodos selectivos, la cromatografía iónica y electroforesis capilar.

Para los compuestos orgánicos existen armas poderosas como son la cromatografía de gases y la de líquidos de la alta presión, también la electroforesis capilar, que permite la separación de los compuestos presentes en una muestra y su determinación en continuo. Estas técnicas utilizan detectores muy sensibles, en algunos casos específicos para un determinado grupo de compuestos y el acoplamiento con detector de masas permite saber la estructura de cada compuesto.

### III. CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en este trabajo se concluye que la Química Analítica tiene los recursos suficientes para dar respuesta a las necesidades de detección y cuantificación en contaminación tanto en gases, líquidos y sólidos, disponiendo de métodos de separación y cuantificación ópticos, eléctricos. También se disponen de sistemas automáticos de toma de muestra y cuantificación en muestras gaseosas y líquidas.

### IV. REFERENCIAS

Berkelman, T., & Stenstedt, T. (sf). 2-D *Electrophoresis using immobilized pH*

- gradient.Principles and Methods*. Amersham Biosciences.
- Broekaer, J. A. (2012). *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas* (Third Edition ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Cazes, J. (2011). *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook* (Fourth Edition ed.). Marcel Dekker.
- Cooper, J., & Cass, T. (2004). *Biosensors. England: Oxford University Press*.
- Dean, J. A. (2007). *Lange's Handbook of Chemistry*. (Sixteenth Edition ed.). New York: McGraw Hill Inc.
- Eiceman, G. A., Gardea-Forresday, J., Dorman, F., Overton, E., Bhushan, A., & Dharmasena, H. (2006). Gas Chromatography. *Anal Chem.*, 78(11), 3985.
- Fifield, F., & Haines, P. (1995). *Environmental Analytical Chemistry*. Blacjje Academic.
- Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. Boston, EEUU: McGraw Hill.
- Hernández-Hernández, L., & González Pérez, C. (2002). *Introducción al Análisis Instrumental*. Barcelona, España: Ariel Ciencia.
- Janata, J. (2001). Centennial Retrospective on Chemical Sensors. *Anal. Chem.*, 73, 151-153.
- Kettrup, A. (2002). *Analyses of Hazardous Substances in Air* (Vol. 6). (V. V. GmbH, Ed.) Deutsche Forschungsgemeinschaft.
- Lee, D. P. (2003). *Handbook of Residua Analytical Methods for Agrochemicals*. West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Pingarrón Carrazón, J. M., & Sánchez Batanero, P. (2010). *Química Electroanalítica. Fundamentos y Aplicaciones. Síntesis*.
- Reeve, R. (2002). *Introduction to Environmental Analysis*. West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Rouessac, F., & Rouessac, A. (2004). *Chemical Analysis. Modern Instrumental Methods and Techniques*. New York: John Wiley & Sons.
- Sadana, A., & Neeti, S. (2011). *Handbook of Biosensors and Sensors Kinetics*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Schwarzenbach, P., Gschwend, P., & Imboden, D. (2007). *Environmental Organic Chemistry*. West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons.

Scott, R. (1997). *Tandem Techniques*. New York: John Wiley & Sons.

Smith, R.-K. (2008). *Guide to Environmental Analytical Methods*. 5th Edition. (R.-K. Smith, Ed.) Genium Publishing Corporation.

Wilson, I. D. (2015). *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press.

winefordner, J. (2003). *Chemical Analysis. A Serie of monographs on Analytical Chemistry and its applications* (Vol. 162). Wiley- Interscience.

## Normas de Publicación

La **Revista Ciencia UNEMI** es una revista científica indizada y arbitrada, de publicación cuatrimestral a partir del año 2016. Dirigida a la población universitaria, que publica principalmente trabajos originales de investigación científica, ensayos y comunicaciones originales preferentemente en las áreas prioritarias de la revista. Su objetivo es divulgar las realizaciones científicas y tecnológicas de la UNEMI, así como las que se realicen en otras universidades y centros de investigación en el país y en el exterior, en las áreas relacionadas con Industrial; Tecnología, Informática y Comunicación; Administración y Gerencia; Salud Pública y Educación y Cultura.

### CONDICIONES GENERALES

Las contribuciones que se publiquen en **Ciencia UNEMI** deben estar enmarcadas en los requisitos fijados en la presente Norma y aceptadas por el Comité Editorial. Todos los trabajos deben ser originales e inéditos, en idioma español o inglés, y no estar en proceso de arbitraje por otras revistas. Los derechos de publicación de los trabajos son propiedad de Ciencia UNEMI, se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos, siempre y cuando se cumplan las condiciones siguientes: sin fines comerciales, no se realicen alteraciones de sus contenidos y se cite su información completa (nombre y apellido del autor, Ciencia UNEMI, número de volumen, número de ejemplar y URL exacto del documento citado). Los autores deberán indicar nombre y apellido, título académico, lugar de trabajo, cargo que desempeñan y dirección completa, incluyendo teléfono, fax y correo electrónico. Las opiniones de los autores son de su exclusiva responsabilidad y la revista no se solidariza con doctrinas, ideas o pensamientos expresados en ellos.

### CONTRIBUCIONES

El Comité Editorial acepta tres (3) tipos de contribuciones para publicación en las distintas áreas de la Revista Ciencia UNEMI: Los Artículos Científicos, los Artículos Técnicos, y los Ensayos. Los Artículos Científicos son el resultado de trabajos de investigación, bien sea bibliográfico o experimental, en el que se han obtenido resultados, se discutieron y se llegaron a conclusiones que signifiquen un aporte innovador en Ciencia y Tecnología. Los Artículos Técnicos son el resultado de trabajos de grado o de investigación en el ámbito universitario e industrial, bien sea experimental y/o no experimental, que signifiquen un aporte tecnológico para la resolución de problemas específicos en el sector industrial. Los Ensayos son aquellas contribuciones producto de investigaciones destinadas a informar novedades y/o adelantos en las especialidades que abarca Ciencia UNEMI. Estos deben ser inéditos y no se aceptarán los que hayan sido ofrecidos a otros órganos de difusión.

### PRESENTACIÓN

Todas las contribuciones deben ser enviadas en formato electrónico. La redacción del manuscrito debe realizarse en

español o inglés.

Éste debe ser redactado en tercera persona y tiempo verbal presente. El mismo debe ser escrito utilizando el procesador de texto Microsoft Office Word® tipeadas a una sola columna, a interlineado simple, con un espaciado posterior entre párrafos de 6 puntos, en papel tamaño A4 (21,0 x 29,7 cm), tipo de letra Times New Roman, tamaño 12, justificado, sin sangría y con márgenes de 2,5 cm en todos los lados: inferior, superior, izquierdo y derecho.

Las contribuciones deben tener una extensión mínima de 4 páginas y 16 como máximo. Los ensayos deben tener mínimo 30 referencias bibliográficas. Las ilustraciones, gráficos, dibujos y fotografías serán denominadas Figuras y serán presentadas en formatos jpg. Las figuras deben ser en original, elaboradas por los autores. No se aceptan figuras escaneadas. Las fotografías deben ser de alta resolución, nítidas y bien contrastadas, sin zonas demasiado oscuras o extremadamente claras. Las tablas y las figuras se deben enumerar (cada una) consecutivamente en números arábigos, en letra Times New Roman, tamaño 10. Éstas deben ser incluidas lo más próximo posible a su referencia en el texto, con su respectivo título en la parte superior si es una tabla o inferior si es una figura. En el caso de que la información contenida sea tomada de otro autor, se debe colocar la fuente. Todas las ecuaciones y fórmulas deben ser generadas por editores de ecuaciones actualizados y enumeradas consecutivamente con números arábigos, colocados entre paréntesis en el lado derecho. Los símbolos matemáticos deben ser muy claros y legibles. Las unidades deben ser colocadas en el Sistema Métrico Decimal y Sistema Internacional de Medida. Si se emplean siglas y abreviaturas poco conocidas, se indicará su significado la primera vez que se mencionen en el texto y en las demás menciones bastará con la sigla o la abreviatura.

Citas bibliográficas en el texto: las citas deberán hacerse señalando en el texto el apellido del primer autor seguido por el del segundo autor o por et al si fueran más de dos autores, y el año de publicación. Por ejemplo: (Campos, 2012),... Campos (2012), (Da Silva y González, 2015), (Alvarado et al, 2014). Cuando se incluyen dos o más citas dentro de una misma frase, las citas se arreglan en orden cronológico. Citas que tengan el mismo año de publicación se arreglan en orden alfabético. Cuando se cite a autores que hayan publicado más de una referencia en el mismo año, se diferenciarán con las letras a, b, c, etc., colocadas inmediatamente después del año de publicación (por ejemplo, 2011a). Si el (los) mismo (s) autor (es) tiene (n) varias publicaciones con distintas fechas pueden citarse juntas en el texto (Campos et al., 2014, 2015). Se recomienda que los autores revisen directamente las fuentes originales, en lugar de acudir a referencias de segunda mano; sólo cuando no sea posible localizar la fuente primaria de información se aceptará citar un trabajo mediante otra referencia. Ejemplo: (Ramírez, 2008, citado por Alvarado, 2015). Teniendo en cuenta que en el apartado de referencias sólo se señalarán los autores de los artículos realmente consultados, o sea, Alvarado (2015) en este caso.

## COMPOSICIÓN

Cada contribución deberá ordenarse en las siguientes partes: título en español, datos de los autores, resumen y palabras clave en castellano; título, resumen y palabras clave en inglés; introducción, metodología o procedimiento, resultados, conclusiones, referencias bibliográficas y agradecimientos.

**1. Título en español.** Debe ser breve, preciso y codificable, sin abreviaturas, paréntesis, fórmulas, ni caracteres desconocidos. Debe contener la menor cantidad de palabras (extensión máxima de 15 palabras) que expresen el contenido del manuscrito y pueda ser registrado en índices internacionales.

**2. Datos de los autores.** Debe indicar el primer nombre y primer apellido. Se recomienda para una correcta indización del artículo en las bases internacionales, la adopción de un nombre y un solo apellido para nombres y apellidos poco comunes, o bien el nombre y los dos apellidos unidos por un guión para los más comunes (Ej. María Pérez-Acosta). En otro archivo se debe indicar la información completa de cada autor: nombre y apellido, título académico, lugar de trabajo, cargo que desempeña y dirección completa, incluyendo número de teléfono, fax e imprescindible correo electrónico.

**3. Resumen en español y Palabras clave.** Debe señalar el objetivo o finalidad de la investigación y una síntesis de la metodología o procedimiento, de los resultados y conclusiones más relevantes. Tendrá una extensión máxima de 200 palabras en un solo párrafo con interlineado sencillo. No debe contener referencias bibliográficas, tablas, figuras o ecuaciones. Al final del resumen incluir de 3 a 10 palabras clave o descriptores significativos, con la finalidad de su inclusión en los índices internacionales.

**4. Título, Resumen y Palabras Clave en inglés (Abstract y Keywords).** Son la traducción al inglés del título, resumen y palabras clave presentadas en español.

**5. Introducción.** Se presenta en forma concisa una descripción del problema, el objetivo del trabajo, una síntesis de su fundamento teórico y la metodología empleada. Se debe hacer mención además del contenido del desarrollo del manuscrito, sin especificar los resultados y las conclusiones del trabajo.

## 6. Desarrollo:

• **Materiales y Métodos (Metodología):** se describe el diseño de la investigación y se explica cómo se realizó el trabajo, se describen los métodos y materiales desarrollados y/o utilizados.

• **Resultados:** se presenta la información y/o producto pertinente a los objetivos del estudio y los hallazgos en secuencia lógica.

• **Discusión de resultados:** se presentan los argumentos que sustentan los resultados de la investigación. Se examinan e interpretan los resultados y se sacan las conclusiones derivadas de esos resultados con los respectivos argumentos que las sustentan. Se contrastan los resultados con los referentes teóricos, justificando la creación de conocimiento como resultado del trabajo.

**7. Conclusiones.** Se presenta un resumen, sin argumentos, de los resultados obtenidos.

**8. Referencias bibliográficas.** Al final del trabajo se incluirá una lista denominada "Referencias"; la veracidad de estas citas, será responsabilidad del autor o autores del artículo. Debe evitarse toda referencia a comunicaciones y documentos privados de difusión limitada, no universalmente accesibles. Las referencias bibliográficas se citan en estricto orden alfabético, iniciando con el apellido del primer autor seguido de la (s) inicial (es) de su(s) nombre (s). Si todos los autores son idénticos en dos o más referencias, la fecha de publicación dictará su ordenamiento en la lista final. Si se da el caso de que existan dos o más artículos, de los mismos autores y publicados en el mismo año, en la lista de referencias se incluirán por orden alfabético de los títulos de los artículos, agregando una letra como sufijo. Al final del trabajo se indicarán las fuentes, como se describe a continuación, según se trate de:

**a. Libro:** A continuación se describen varias formas de citar un libro.

Libro con autor: Apellido autor, Iniciales nombre autor, (Año), Título en cursiva, Ciudad y país, Editorial. Por ejemplo:

Hacyan, S., (2004), *Física y metafísica en el espacio y el tiempo. La filosofía en el laboratorio*, México DF, México: Fondo nacional de cultura económica.

Libro con editor: En el caso de que el libro sea de múltiples autores es conveniente citar al editor. Apellido editor, Iniciales nombre editor. (Ed.). (Año). Título. Ciudad, País: Editorial. Por ejemplo:

Wilber, K. (Ed.). (1997). *El paradigma holográfico*. Barcelona, España: Editorial Kairós

Libro en versión electrónica: Los libros en versión electrónica pueden venir de dos maneras: Con DOI y Sin DOI. El DOI (Digital Object Identifier), es la identificación de material digital, único para cada libro.

Libros en línea sin DOI: Apellido, Iniciales nombre autor. (Año). Título. Recuperado de <http://www.xxxxxx.xxx>

De Jesús Domínguez, J. (1887). *La autonomía administrativa en Puerto Rico*. Recuperado de <http://memory.loc.gov/>

Libros Con DOI: Apellido, Iniciales nombre autor. (Año). Título. doi: xx.xxxxxxxx

Montero, M. y Sonn, C. C. (Eds.). (2009). *Psychology of Liberation: Theory and applications*. doi: 10.1007/ 978-0-387-85784-8

Capítulo de un libro. Se referencia un capítulo de un libro cuando el libro es con editor, es decir, que el libro consta de capítulos escritos por diferentes autores: Apellido, A. A., y Apellido, B. B. (Año). Título del capítulo o la entrada. En A. A. Apellido. (Ed.), Título del libro (pp. xx-xx). Ciudad, País: Editorial

Molina, V. (2008). "... es que los estudiantes no leen ni escriben": El reto de la lectura y la escritura en la Pontificia Universidad Javeriana de Cali. En H. Mondragón (Ed.), *Leer, comprender, debatir, escribir. Escritura de artículos científicos por profesores universitarios* (pp. 53-62). Cali, Valle del Cauca: Sello Editorial Javeriano.

**b. Artículos científicos:** Apellido autor, Iniciales nombre autor, (Año), Título, Nombre de la revista en cursiva, Volumen, Número, Páginas. Por ejemplo:

Corominas, M., Roncero, C., Bruguca, E., y Casas, M. (2007). Sistema dopaminérgico y adicciones, *Rev Mukuel*, 44(1), 23-31.

**REFERENCIA SEGÚN EL TIPO DE ARTÍCULO:**

**Artículos con DOI:**

Bezuidenhout, A. (2006). Consciousness and Language (review). *Language*, 82(4), 930-934. doi: 10.1353/lan.2006.0184

**Artículo sin DOI impreso:**

Fields, D. (2007). Más allá de la teoría neuronal. *Mente y Cerebro*, 13(24), 12-17.

**Artículo sin DOI digital:**

Mota de Cabrera, C. (2006). El rol de la escritura dentro del currículo de la enseñanza y aprendizaje del inglés como segunda lengua (esl/efl): Una perspectiva histórica. *Acción Pedagógica*, 15(1), 56-63. Recuperado de <http://www.saber.ula.ve/accionpe/>

**REFERENCIA SEGÚN LA CANTIDAD DE AUTORES:**

**Un autor:**

Tarlaci, S. (2010). A Historical View of the Relation Between Quantum Mechanics and the Brain: A Neuroquantologic Perspective. *NeuroQuantology*, 8(2), 120-136.

**Dos a siete autores:** Se listan todos los autores separados por coma y en el último se escribe "y".

Tuszynski, J., Sataric, M., Portet, S., y Dixon, J. (2005). Physical interpretation of micro tubule self-organization in gravitational fields. *Physics Letters A*, 340(1-4), 175-180.

**Ocho o más autores:** Se listan los primeros seis autores, se ponen puntos suspensivos y se lista el último autor.

Wolchik, S. A., West, S. G., Sandler, I. N., Tein, J.-Y., Coatsworth, D., Lengua, L.,...Griffin, W. A. (2000). An experimental evaluation of theory-based mother and mother-child programs for children of divorce. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 68, 843-856.

**c. Simposios, Congresos o Conferencias:** Autor, A. & Autor, A. (Fecha) del evento. Evento llevado a cabo en el Nombre de la organización, Lugar. Por ejemplo:

Rojas, C., & Vera, N. (Agosto de 2013). ABMS (Automatic BLAST for Massive Sequencing). 2° Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática CCBCOL. Congreso llevado a cabo en Manizales, Colombia.

**d. Informes:** para citar un informe de alguna organización, institución gubernamental o autor corporativo se debe seguir el siguiente formato: Nombre de la organización. (Año). Título del informe (Número de la publicación). Recuperado de <http://xxx.xxxxxx.xxx/>

Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. (2012). Tecnologías de la información y las comunicaciones. Recuperado de: <http://www.dane.gov.co>

**e. Trabajo de Grado o Tesis:** Autor, A., & Autor, A. (Año). Título de la tesis (Tesis de pregrado, maestría o doctoral). Nombre de la institución, Lugar. Por ejemplo:

Aponte, L., & Cardona, C. (2009). Educación ambiental y evaluación de la densidad poblacional para la conservación de los cóndores reintroducidos en el Parque Nacional Natural Los Nevados y su zona amortiguadora (tesis de pregrado). Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

**INSTRUCCIONES DE ENVÍO**

Para enviar un artículo es necesario que el documento cumpla estrictamente con los lineamientos de formato y de contenido anteriormente especificados. Los trabajos (en el respaldo digital) deben ser entregados en la Secretaría del Departamento de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad Estatal de Milagro, ubicada en la Ciudadela Universitaria, km 1½ vía a la Parroquia Virgen de Fátima; o si lo desea, enviar el artículo al email: [ciencia\\_unemi@unemi.edu.ec](mailto:ciencia_unemi@unemi.edu.ec), o a través de la página web: [ojs.unemi.edu.ec](http://ojs.unemi.edu.ec). Para mayor información dirigirse a las oficinas de la Revista Ciencia UNEMI, o comunicarse por los teléfonos +5932715118 – 2715079 – 2715081, ext. 3115-3212. En caso de requerirlo, escribir al correo electrónico antes mencionado.

**PROCESO EDITORIAL**

1. Recepción de artículos. El Comité Editorial efectuará una primera valoración editorial consistente en comprobar la adecuación del artículo a los objetivos de la revista, así como el cumplimiento de los requisitos establecidos en las normas de publicación. El Comité Editorial hará las correcciones pertinentes, sin alterar el contenido del mismo. Si encontrara fallas que pudieran afectarlo, las correcciones se harán de mutuo acuerdo con su autor. La recepción del artículo no supone su aceptación.

2. Sistema de revisión por pares (peer review). Los artículos preseleccionados serán sometidos a un proceso de arbitraje. Se asignarán dos o más revisores especializados en la materia, que evaluarán el artículo de forma confidencial y anónima (doble ciego), en cuanto a su contenido, aspectos formales, pertinencia y calidad científica. La aceptación definitiva del manuscrito está condicionada a que los autores incorporen en el mismo todas las correcciones y sugerencias de mejora propuestas por los árbitros.

3. Decisión editorial. Los criterios para la aceptación o rechazo de los trabajos son los siguientes: a) Originalidad; b) Precisión en el tema; c) Solidez teórica; d) Fiabilidad y validez científica; e) Justificación de los resultados; f) Impacto; g) Perspectivas/aportes futuros; h) Calidad de la escritura; i) Presentación de las tablas y figuras; y e) Referencias. Finalizado el proceso de evaluación, se notificará al autor principal la aceptación o rechazo del trabajo.

Los autores del artículo recibirán una constancia de su aceptación para publicarlo. Una vez publicado el artículo se les enviarán tres (3) ejemplares de la Revista respectiva y un certificado de haber publicado. Los trabajos no aceptados serán devueltos a sus autores indicándoles los motivos de tal decisión.

Tabla. Parámetros de Evaluación

CARACTERÍSTICA	N°	CRITERIO	ENSAYO	ARTÍCULO
<b>Innovación / Originalidad del artículo</b>	1.	Las ideas planteadas son nuevas	SI	SI
	2.	Las ideas planteadas son interesantes	SI	SI
	3.	Las ideas planteadas pueden aportar un nuevo enfoque para tratar un viejo problema	SI	SI
<b>Precisión en el tema / coherencia con los objetivos</b>	4.	Se especifica de forma clara el tipo de artículo del que se trata	SI	SI
	5.	Se especifica de forma clara el fin u objetivo que persigue el artículo.	SI	SI
<b>Solidez teórica y calidad de los argumentos</b>	6.	La estructura del artículo es la adecuada.	SI	SI
	7.	Existe orden, coherencia y sistematicidad en las ideas expuestas.	SI	SI
	8.	Las ideas planteadas se basan en argumentos sólidos, ya demostrados por otros autores o en estudios anteriores.	SI	SI
	9.	Los argumentos presentados están actualizados (a partir del 2004 en adelante).	SI	SI
<b>Nivel científico, diseño experimental, metodología</b>	10.	La metodología empleada es la adecuada, tiene calidad y garantías científicas	NO	SI
	11.	En el artículo se describe de forma suficiente el método y procedimiento para que un lector interesado pueda reproducirlo	NO	SI
	12.	Las hipótesis o las preguntas de investigación se han planteado adecuadamente.	NO	SI
	13.	Se ha definido claramente el diseño experimental.	NO	SI
	14.	Los instrumentos de medición y experimentación utilizados tienen calidad y garantías científicas	NO	SI
	15.	Se consigue integrar en un marco nuevo y más simple de resultados que antes implicaban un marco más complejo	NO	SI
<b>Presentación y justificación de los resultados / conclusiones</b>	16.	El artículo aporta resultados de importancia teórica o práctica.	SI	SI
	17.	Los datos presentados son válidos	SI	SI
	18.	Los datos y resultados son claramente expuestos mediante fórmulas, tablas y figuras	SI	SI
	19.	El tratamiento de datos va encaminado hacia la comprobación de las hipótesis o las preguntas de investigación.	NO	
	20.	La interpretación que se hace de los resultados es inequívoca.	SI	SI
	21.	Las conclusiones se basan en los argumentos planteados o resultados obtenidos.	SI	SI
	22.	Las conclusiones van en concordancia con el objetivo planteado.	SI	SI
<b>Impacto del tema presentado en el artículo</b>	23.	Las conclusiones presentadas son de interés para la comunidad académica	SI	SI
	24.	El contenido del artículo se constituye en un aporte significativo al conocimiento anteriormente desarrollado en su área.	SI	SI
<b>Perspectivas / futuros trabajos</b>	25.	El artículo es relevante para la discusión de problemas en su área.	SI	SI
	26.	El artículo abre posibilidades para realizar investigaciones futuras	SI	SI
<b>Calidad de la escritura</b>	27.	La redacción del artículo es clara y entendible	SI	SI
<b>Legibilidad de figuras y tablas</b>	28.	Las figuras y tablas se encuentran correctamente enumeradas y con su respectivo título	SI	SI
<b>Bibliografía</b>	29.	El artículo contiene al menos 30 citas bibliográficas.	SI	NO
	30.	El artículo contiene citas bibliográficas claramente definidas	SI	SI

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS PARA AUTORES

Ciudad, fecha.....20....

DIRECTOR DE LA REVISTA CIENCIA UNEMI

Universidad Estatal de Milagro

Milagro, Ecuador

Presente.

Por medio del presente documento y fundamentado en lo dispuesto en la Ley de Derecho de Autor el (los) suscrito (s) .....[Nombres y apellidos de autor (es)] he (hemos) remitido para su publicación en la Revista Ciencia UNEMI, editada por la Universidad Estatal de Milagro, el trabajo intitulado (título completo)..... para que de forma exclusiva reproduzca, publique, edite, fije, comunique y transmita públicamente en cualquier forma o medio impreso o electrónico inclusive internet e incluir en índices nacionales e internacionales o bases de datos en caso de ser aprobado el artículo de mi (nuestra) autoría. Por lo tanto el (los) autor (es) firmante (s) DECLARA (MOS):

- Que el trabajo de investigación entregado es un trabajo original.
- Que no ha sido publicado previamente por ningún medio.
- Que no ha sido remitido simultáneamente a otras publicaciones impresas o digitales, ni está pendiente de valoración, para su publicación, en ningún otro medio, en ningún formato.
- Que en caso de ser publicado el artículo, transfieren todos los derechos de autor a la REVISTA CIENCIA UNEMI de la Universidad Estatal de Milagro, sin cuyo permiso expreso no podrán reproducirse ninguno de los materiales publicado en la misma.
- Que el trabajo presentado no contiene material escandaloso, calumnia, difamación, obscenidad, fraude o cualquier otro material ilegal; y ni el trabajo, ni el título vulnera ningún derecho de autor, derecho literario, marca o derecho de propiedad de terceras personas. Asumo (asumimos) la total responsabilidad de todos los extremos y opiniones contenidos en el trabajo remitido.

En virtud de lo anterior, manifiesto (manifestamos) expresamente que no me (nos) reservo (reservamos) ningún derecho en contra de la REVISTA CIENCIA UNEMI de la Universidad Estatal de Milagro.

Atentamente

.....  
Nombres y firma de autor (es)

Enviar por correo electrónico o entregar en las oficinas de la Revista Ciencia UNEMI, de la Universidad Estatal de Milagro.

Correos: ciencia\_unemi@unemi.edu.ec

pgavilanesy@unemi.edu.ec

**REVISTA CIENCIA UNEMI**

Vol. 9, N° 20, Septiembre 2016

Suplemento en Tecnologías Convergentes

ISSN-1390-4272 Impreso

ISSN 2528-7737 Electrónico

Esta edición cuenta con 1000 ejemplares

Impreso en Imprenta Poligráfica, Guayaquil, Ecuador

Universidad Estatal de Milagro

Ciudadela Universitaria, km 1.5 vía Milagro km 26

Teléfono: 04 2715081, ext. 3115-3212

Milagro, Ecuador



*Evolución Académica*

**15 AÑOS**

[www.unemi.edu.ec](http://www.unemi.edu.ec)

[www.facebook.com/unemionline](http://www.facebook.com/unemionline)  
/unemionline

facebook

[www.flickr.com/rpp-unemi](http://www.flickr.com/rpp-unemi)  
rpp-unemi



[www.twitter.com/UNEMI\\_ec](https://twitter.com/UNEMI_ec)  
@UNEMI\_ec

twitter

[www.youtube.com/UnemiTube](http://www.youtube.com/UnemiTube)  
UnemiTube



Dirección: Cda. Universitaria, Km. 1,5 vía Milagro Km. 26  
Conmutador: (04) 2 715-081 / 2 715-079

E-mail: [rectorado@unemi.edu.ec](mailto:rectorado@unemi.edu.ec)  
Milagro - Guayas - Ecuador