

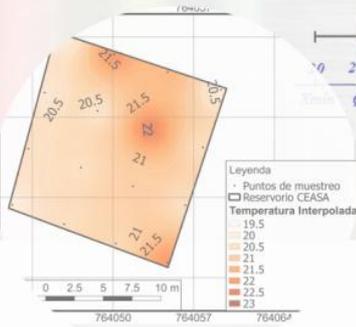
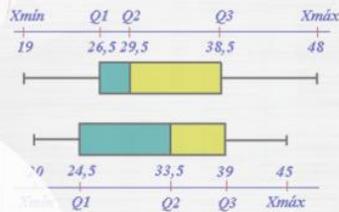


BASES DE LA CIENCIA

Revista Científica - Instituto de Ciencias Básicas



Selenoproteínas



Enero - Abril 2018

ISSN 2588-0764

Vol. 3 Num.



Índice

Ciencias Químicas

Desarrollo de un Método para la Especiación de Selenio en Muestras de Cerveza 1

Marinela Colina, Jennifer Smith, Gilberto Colina, Brinolfo Montilla

Determinación de los Niveles de Mercurio en Sangre y Plasma de Pacientes con Leucemia 25

Marinela Colina, carolina sthormes, Rodolfo Salas, Jervis Navas, Víctor Granadillo, Brinolfo Montilla

Aislamiento e Identificación Molecular de Levaduras Autóctonas en Viñedo de la Variedad Malvasía Blanca 45

María Berradre, Luzmila Meza, Braulio Zarzoso, Jorge Ortega, Betzabé Sulbarán, Graciela Ojeda, Laura Soto, Mairy Fuenmayor

Comparación de Métodos de Interpolación para la Estimación de Temperatura del Reservorio CEASA 57

Kalina Fonseca, Mercy IlbayYupa, Luis Bustillos, Sara Barbosa, Alisson Iza
Ciencias Matemáticas

La Enseñanza del Diagrama de Caja y Bigotes para Mejorar su Interpretación 69

Jorge Flores, Roberto Flores

Guía de autores 76

Créditos 89

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA ESPECIACIÓN DE SELENIO EN MUESTRAS DE CERVEZA

MSc. Jenifer Smith¹, Dra. Marinela Colina^{1,2*}, Dr. Gilberto Colina³ y Lic. Brinolfo Montilla¹

¹Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias Departamento de Química, Maracaibo 4011, Zulia, Venezuela.

²Innovación Ambiental Quitosano CA, San Francisco No 29-25, Maracaibo, Zulia, VENEZUELA

³Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental DISA. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

*Autor para la correspondencia. E-mail: colinamarinela@gmail.com

Recibido: 6-12-2017 / Aceptado: 26-3-2018

RESUMEN

Se desarrolló un método por cromatografía iónica (CI) para la especiación de selenio en muestras líquidas de cerveza, empleando H₂O₂ y luz UV como sistema oxidante. Las especies aniónicas de selenio fueron separadas utilizando una columna aniónica AS4A y un guarda columna AG4 Dionex, la fase móvil empleada fue de 1,7 mM NaHCO₃/1,8 mM Na₂CO₃, para la cuantificación se empleó un detector de conductividad iónica. El tiempo de retención del ión Se(IV) fue de 7,8 min y para Se(VI) de 15,7 min. Los límites de detección obtenidos para Se(IV) y Se(VI) fueron de 0,15 y 0,28 mgL⁻¹, respectivamente. Se establecieron las condiciones óptimas de análisis del proceso de oxidación de los compuestos puros de selenio: selenito y selenio-DL-metionina, mediante el estudio de diferentes parámetros como cantidad de peróxido adicionado, tiempo de digestión y pH. La separación de los iones Se(IV) y Se(VI) en muestras de cerveza se realizó empleando una fase móvil de 2,0 mM de carbonato de sodio y 1,0 mM de hidróxido de sodio, ésta mezcla separa los iones de selenio sin tener problemas de interferencias de nitrato, fosfato y sulfato. Los límites de detección determinados para Se(IV) y Se(VI) fueron 0,08 y 0,07 mgL⁻¹, respectivamente. El método desarrollado se comparó con un método referencial ICP AES, obteniéndose excelentes resultados.

Palabras clave: Especiación, selenio, cerveza, cromatografía iónica.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE SPECIATION OF SELENIO IN BEER SAMPLES

ABSTRACT

A method was developed by ion chromatography (IC) for the speciation of selenium in liquid samples of beer, using H₂O₂ and UV light as an oxidant system. The anionic selenium species were separated using an anionic column AS4A and a guard column AG4 Dionex, the mobile phase used was 1.7 mM NaHCO₃/1.8 mM Na₂CO₃, for the quantification an ionic conductivity detector was used. The retention time of the Se(IV) ion was 7.8 min and for Se(VI) was 15.7 min. The detection limits obtained for Se(IV) and Se(VI) were 0.15 and 0.28 mgL⁻¹, respectively. The optimal conditions of oxidation process analysis of the selenium pure compounds: selenite and selenium-DL-methionine were established, with the study of different parameters such as amount of peroxide added, time of digestion and pH. The separation of the Se(IV) and Se(VI) ions in beer samples was carried out using a mobile phase of 2.0 mM sodium carbonate and 1.0 mM sodium hydroxide, this mixture separates the selenium ions without interference problems of nitrate, phosphate and sulfate. The detection

limits determined for Se(IV) and Se(VI) were 0.08 and 0.07 mg L⁻¹, respectively. All developed was compared with a reference method ICP AES, obtaining excellent results.

Key words: Speciation, selenium, beer, ionic chromatograph.

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA A ESPECIAÇÃO DO SELENIO EM AMOSTRAS DE CERVEJA

RESUMO

Um método foi desenvolvido por cromatografia iônica (CI) para a especiação de selênio em amostras líquidas de cerveja, usando H₂O₂ e luz UV como um sistema oxidante. espécies de selênio aniônicos foram separados utilizando uma coluna aniônica AS4A e pré-coluna Dionex AG4, a fase móvel utilizada esteve constituída de 1,7 mM de NaHCO₃/1,8 mM Na₂CO₃ enquanto um detector de condutividade iônica para quantificação foi utilizado. O tempo de retenção do íon Se(IV) foi de 7,8 min e para Se(VI) de 15,7 min. Os limites de detecção obtidos para Se(IV) e Se(VI) foram de 0,15 e 0,28 mg L⁻¹, respectivamente. Foram estabelecidas as condições ótimas de análise do processo de oxidação de compostos de selênio puros: selenito e metionina selênio-DL-, através do estudo de diversos parâmetros, como a quantidade de peróxido adicionado, e a digestão pH tempo. A separação dos íons Se(IV) e Se(VI) nas amostras de cerveja foram realizadas utilizando uma fase móvel de carbonato de sódio 2,0 mM e hidróxido de sódio 1,0 mM, esta mistura separa os íons de selênio sem problemas de interferência de nitrato, fosfato e sulfato. Os limites de detecção determinados para Se(IV) e Se(VI) foram 0,08 e 0,07 mg L⁻¹, respectivamente. O método desenvolvido foi comparado com um método de referência ICP AES, obtendo excelentes resultados.

Key words: Especiação, selênio, cerveja, cromatografia iônica.

1. INTRODUCCIÓN

El selenio es un elemento esencial para el organismo humano, debido a sus funciones atribuidas en los procesos biológicos, encontrándose en diversas formas orgánicas (Rodríguez, Sanz & Diaz, 2009). En el ambiente, este elemento se encuentra en una variedad de compuestos inorgánicos, existiendo en diferentes estados de oxidación (-2, 0, +4, +6). El selenito (Se(IV)) y el selenato (Se(VI)), dos formas oxidadas del selenio (oxianiones), presentan una elevada solubilidad en agua y sus compuestos son muy estables, sin embargo, el Se(IV) es más tóxico que el Se(VI) (Hatfield, Schweizer, Tsuji, Gladyshev, 2016).

El selenio en forma elemental es insoluble en agua y no es tóxico en condiciones normales, el selenuro de hidrógeno (H₂Se) es un gas altamente tóxico, pero se oxida rápidamente a selenio elemental en presencia del aire (Townshend, 1995).

La levadura de cerveza y el germen de trigo son ricas fuentes de selenio y son considerados "alimentos sanos". De igual forma este elemento se traslada en las aguas de drenaje agrícola y en aguas naturales, en el régimen de concentraciones de miligramos por litros, y de allí ingresa a la cadena alimenticia (Zárate, Lundquist, Brent & Bailey, 1998). Entre los métodos analíticos para la determinación de selenio total se encuentran: la

espectrofluorimetría (Cáceres & Gardiner, 2000), la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) (Johansson, Bordin & Rodríguez, 2000; Ipolyi, Stefánka & Fodor, 2001; Frankenberger, Zhang & Moore, 1999), la espectroscopía de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) (Bou, Guardiola, Padró, Pelfort & Codony, 2004; Machat, Otruba & Kanicky, 2002), los cuales han sido frecuentemente empleados para su análisis elemental en laboratorios. La espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS) (Larsen & Sloth, 2000; Larsen, Sloth, Bügel & Moesgaard, 2003; Caruso, Ponce de León, De Nicola & Montes, 2003), es una técnica empleada para la cuantificación de selenio en muestras ambientales, ofreciendo bajos límites de detección. Sin embargo, debido al alto costo y a la poca disponibilidad de estos equipos, es necesario la determinación de éste elemento utilizando otras técnicas.

La determinación de selenio en muestras ambientales usualmente requiere la digestión de la matriz de la muestra, dado que ocurre la transformación de todas las especies de selenio a formas inorgánicas, usando un procedimiento de digestión con oxidantes tradicionales, formándose de esta forma dos oxianiones de selenio (Se(IV) y Se(VI)). Sin embargo, cuando se requiere cuantificar la cantidad total de este elemento en la muestra, el selenato puede ser producido al emplear una digestión con oxidantes fuertes, como; ozono (O_3), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), peroxodisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), como también ácido nítrico (HNO_3), la mezcla de H_2O_2/H_2SO_4 o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros. Mientras que el Se(IV) se puede obtener por reducción con el empleo de un ácido (Wang, Gao & Belzile, 2001).

La levadura de cerveza es un hongo constituido por el género *Saccharomyces Cerevisiae*, se consume seca y se utiliza como organismo responsable para la fermentación y es un valioso alimento para el ser humano. Está considerada como el cultivo más antiguo realizado por el hombre y el comienzo de la biotecnología (Mejía-Barajas, Montoya-Pérez, Cortés-Rojo & Saavedra-Molina, 2016). Presenta concentraciones de selenio alrededor de $0,13 \mu g g^{-1}$ (Lobinski, McSheehy, Pannier, Szpunar & Potin-Gautier, 2002). Además, cerca de treinta compuestos diferentes de selenio se encuentran en los extractos acuosos de levaduras.

La selenometionína es la especie química predominante en levaduras. Frecuentemente se usa como fuente de algunos suplementos nutricionales, éste compuesto muestra menos toxicidad que las especies inorgánicas de selenio, además que se encuentra en la mayoría de las plantas. Por esta razón, se han reportados métodos sensibles y selectivos para la determinación de éste compuesto en diferentes matrices (Guyon, Pradeau, Robinet & Do,

2001; Rosen, Hartman, Ho, Hiserodt & Tsai, 1998; Chatterjee, Shibata & Morita, 2000). La selenocisteína es otra forma orgánica del selenio de importancia, ya que se encuentra en las proteínas de los humanos y animales.

Existen diferentes técnicas analíticas para la separación y determinación de especies iónicas de selenio, pero la cromatografía iónica ha introducido un amplio campo de aplicación a muestras con diferentes intervalos de concentraciones (Gammelgaard & Jøns, 2000; Niss, Schabron & Brown, 1993; Tirez, Brusten, Van, De Brucber & Diles, 2000). Este hecho ha conducido hasta ahora a convenientes avances, tanto en la sensibilidad, así como en la selectividad de detección para el análisis de muestras ambientales. Además, que el empleo de una columna supresora ha sido reconocido para la determinación de aniones en aguas naturales (Cole & Evrovski, 1997). El Se(IV) y el Se(VI) son las especies inorgánicas predominantes en aguas naturales y en extractos húmedos, presentando una concentración que varía entre 0,1 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Sanz & Conde, 1997; Yan, Lu, Zhang, Wang, & Liu, 2004)). Sin embargo, recientes estudios han demostrado la existencia de selenocianato (SeCN^-) en aguas residuales industriales (Wallschläger & Bloom, 2001). Sin embargo, el agua escasa en sólidos selenoférricos en áreas semiáridas pueden contener a unos cientos o miles de microgramos disueltos de selenio por litro (Clesceri, Greenberg & Rhodes, 1989).

Cromatografía iónica

La cromatografía iónica (CI) (Sarzanini, Mentasti & Bruzzoniti, 1998) se basa en la separación y cuantificación de iones, por medio de su distribución de equilibrios entre dos fases inmiscibles; una fase estacionaria y otra móvil. La fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil. La separación de los componentes de la muestra es basada en la carga y tamaño de los iones (Skoog, Holler & Nieman, 2001). La composición de la fase móvil proporciona una gran flexibilidad para la manipulación del analito retenido, ya que se logra una deseada separación y optimización del análisis (Janos, 1997).

Colina & Gardiner (1999), estudiaron la oxidación de azufre, fósforo y nitrógeno usando microondas para la digestión con peróxido de hidrógeno (Wilson, 1994; Craig, 1999), activado con ácido fórmico y determinando los iones sulfato, fosfato y nitrato correspondientes por cromatografía iónica. La cromatografía iónica (Goyal, 1997). puede ser aplicada para muestras de un amplio rango de especies iónicas de interés ambiental y de elevadas trazas de concentraciones, debido al especial progreso que ha presentado en las técnicas de detección (Buchberger & Haddad, 1997; Woods & Rowland, 1997). Sin

embargo, el uso de HG-AAS (Camara, Perez & Moreno, 2000) y ICP-MS han sido las técnicas más empleadas para el análisis de muestras líquidas (biológicas y ambientales). En este trabajo, se desarrolló un método para la determinación y especiación de selenio en muestras de cerveza utilizando cromatografía iónica y digestión con peróxido de hidrógeno.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y reactivos

En el desarrollo del método para la especiación de selenio por cromatografía iónica se empleó peróxido de hidrógeno con luz ultravioleta y se utilizaron los siguientes reactivos: Estándar certificado de selenio (Aldrich, 980 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Se en 1% de HNO_3), Selenito de sodio (Na_2SeO_3) y selenato de sodio (Na_2SeO_4) (AnalaR BDH), Seleno-DL-Metionina ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_2\text{NSe}$) (MP Biomedicals), Sulfato de sodio (Merck, 99% de pureza) y sulfito de sodio (J.T. Baker Analyzed, 99% de pureza), Nitrato de sodio (Merck, 99,9% de pureza) y nitrito de sodio (J.T. Baker Analyzed, 99% de pureza). Cloruro de sodio (Merck, 99,5% de pureza), Peróxido de hidrógeno al 30% v/v (Merck), Ácido clorhídrico 37% (Fisher Scientific Company), Ácido orto-fosfórico 85% (Riedel-deHaën), Hidróxido de sodio (Baker Analyzed, 99% de pureza), Ácido nítrico 65% (Riedel-deHaën), Carbonato de sodio (Merck, 99,9% de pureza) y carbonato ácido de sodio (Riedel-deHaën 99,7%), Agua destilada y desionizada, Material volumétrico de plástico y vidrio, Bombas de alta presión del tipo Parr N °4745 con envases de politetrafluoruro de etileno (PTFE).

2.2. Equipos

Cromatógrafo iónico marca Dionex; modelo LC20, equipado con una bomba cuaternaria; modelo GP40, una columna aniónica Ion Pac AS4A Dionex (4x250 mm), un guarda columna aniónica Ion Pac AG4A Dionex (4x50 mm), con un sistema de supresión Dionex ASRS-Ultra 11 (4mm) y detector de conductividad modelo CD20. Interfase marca Hewlett Packard, modelo 35900E para el análisis de los datos se utilizó el software HP Chem. En la **Tabla 1** se muestran las condiciones operacionales empleadas por el cromatógrafo iónico para la determinación de los iones Se(IV) y Se(VI). Espectrofotómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) marca Perkin Elmer; modelo óptima 2000DV.

En la **Tabla 2** se muestran los parámetros operacionales usados en ICP-AES para la determinación de selenio total. Una lámpara de vapor de mercurio a baja presión con una potencia de 400 watts, marca UVP modelo TMW-20 Transiluminador UV-VIS para la

digestión vía UV. Potenciómetro marca WPA CD500 para medición de pH. Sonificador marca Branson modelo 2210 para la homogenización de la muestra.

Tabla 1. Condiciones operacionales empleadas en Cromatografía Iónica (CI) para la determinación de los iones Se(IV) y Se(VI).

Condiciones	Datos
Fase Móvil	1,8 mM Na ₂ CO ₃ /1,7 mM NaHCO ₃
Velocidad de flujo	1 mL min ⁻¹
Sensibilidad del detector	50 μS
Volumen de muestra	50 μL
Solución regenerante	Agua desionizada

Tabla 2. Parámetros operacionales usados en espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) para la determinación de selenio.

Parámetros	Datos
λ	196,06nm – 203,985 nm
Gas	Argón
Flujo de plasma	15 mL min ⁻¹
Flujo de gas de arrastre	0,2 mL min ⁻¹
Flujo del nebulizador	0,8 mL min ⁻¹
Réplicas	2

2.3. Procedimiento experimental

2.3.1. Preparación de las soluciones de selenio

Los compuestos puros de selenio empleados para establecer las condiciones experimentales óptimas para el proceso de digestión, selenito y selenato de sodio se calentaron en una estufa durante 4 horas a 110 °C y luego fueron colocados en un desecador por 48 horas para eliminar la posible humedad existente, y posteriormente fueron pesados. Se prepararon soluciones de trabajo de 1000 mg L⁻¹ (332,978 mg) de selenio a partir de selenito de sodio y 25 mg L⁻¹ (6,2056 mg) de solución de selenio a partir de seleno-DL-metionina. La solución de selenito de sodio se preparó diariamente para evitar que el contenido de selenito presente se oxidara a selenato, mientras que la solución concentrada de seleno-DL-metionina fue guardada en envase plástico y refrigeradas a 4°C.

2.3.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

La fase móvil empleada consiste en una mezcla buffer de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio 1,8 mM y 1,7 mM respectivamente, en agua desionizada. La fase móvil fue filtrada a través de filtros de éster de celulosa por un tiempo de 15 min antes de ser utilizados para el análisis cromatográfico. Se utilizó un flujo de 1 mL min⁻¹ en todos los análisis cromatográficos, el cual proporcionó una buena selectividad y resolución en la separación

cromatográfica. Todas las soluciones de trabajo fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0,2 μM de PTFE antes de la inyección en el cromatógrafo iónico.

2.3.3. Sistema de calibración

Se prepararon soluciones estándares de 0,1;0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5 y 10,0 mg L^{-1} de Se(IV) y Se(VI), respectivamente; a partir de una solución de trabajo de 1000 mg L^{-1} . Cada solución estándar se evaluó por triplicado y el tiempo de análisis empleado para el ión Se(IV) fue de 9 min y para el Se(VI) fue de 17,0 min. El sistema de calibración se realizó diariamente con soluciones estándares preparadas (0,5; 1,0 y 3,0 mg L^{-1} de Se(VI)), para asegurar parámetros instrumentales constantes.

2.3.4. Procedimientos de digestión

Se establecieron las condiciones óptimas del análisis para la digestión de los compuestos puros de selenio empleando, como sistema oxidante, peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta; se variaron diversos parámetros como: cantidad de peróxido de hidrógeno adicionado, tiempo de digestión y pH. De cada una de las soluciones de trabajo de selenito de sodio y seleno-DL-metionina, se prepararon soluciones de trabajo de 5 mg L^{-1} de las cuales se tomaron 5 mL de cada solución para el estudio de las condiciones experimentales del método propuesto. Se adicionaron diferentes cantidades de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la oxidación completa de los compuestos puros de selenio a selenato. El volumen se varió desde 100 μL hasta 3000 μL .

2.4. Aplicación del método

2.4.1. Validación del método para la determinación de selenio total en muestras de cerveza

Tratamiento analítico de muestras de cerveza: Las muestras de cerveza fueron obtenidas de una empresa cervecera de la localidad. Estas muestras se degasificaron por un tiempo de 2 horas eliminando de esta forma todo el dióxido de carbono y luego fueron filtradas, para posteriormente guardarse en envases plásticos a una temperatura de 4°C para su posterior análisis (Clesceri, Greenberg & Rhodes, 1989).

2.4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de muestras de cerveza

Se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas del análisis de la muestra de cerveza, variando las concentraciones de la fase móvil ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) para separar los iones Se(IV) y Se(VI) en presencia de otros iones (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-}). Al emplear el eluyente 1,7/1,8 mM de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ en muestras de cerveza, fueron encontrados

interferencias de nitrato, fosfato y sulfato. Para eliminar tales interferencias se varió la concentración de la mezcla de carbonato de sodio/carbonato ácido de sodio en diversas proporciones y se empleó hidróxido de sodio/carbonato de sodio. Las concentraciones de las mezclas se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Variaciones de la fase móvil para la optimización la separación cromatográfica de Se(IV) y Se(VI)

Mezclas	Concentraciones
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	1,3 mM/1,4mM
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	2,0 mM/2,0 mM
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	0,75 mM/1,8 mM
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	0,75 mM/2,7 mM
NaOH/Na ₂ CO ₃	1,0 mM/2,0 mM

De igual forma se empleó un flujo de 1 mL min⁻¹ en todos los análisis cromatográficos y se utilizó agua desionizada como solución regenerante de la columna supresora.

2.4.3. Procedimiento de digestión de muestras de cerveza para la validación del método propuesto.

Las muestras de cerveza fueron digeridas de acuerdo a las condiciones de análisis establecidas. Para ello, se tomó 0,5 mL de muestra donde se le adicionó 1 mL de H₂O₂ al 30% v/v y colocadas en la luz UV durante 30 min. Pasado este tiempo, y esperado a que las muestras estuvieran a temperatura ambiente, se llevaron a un volumen final de 5 mL para luego ser cuantificadas en el cromatógrafo iónico. Cada muestra de cerveza fue digerida por triplicado junto con un blanco y se leyeron por triplicado.

2.4.4. Determinación de selenito y selenato en muestras de cerveza sin la aplicación del sistema oxidante (H₂O₂/UV)

Para la determinación de las concentraciones de los iones selenito y selenato en muestras de cerveza, se tomaron 3 mL de muestra de cerveza y se llevó a un volumen fijo de 10 mL, para luego ser cuantificadas por el cromatógrafo iónico, donde se leyeron por triplicado.

2.4.5. Determinación de selenio total en muestras de cerveza por medio de la técnica ICP-AES

Para evaluar la eficiencia del método propuesto, se determinó el contenido de selenio total presente en las muestras de cerveza mediante ICP-AES. Para ello, se tomaron 3 mL de muestra y se le adicionó 1 mL de HNO₃ directamente dentro de los envases de PTFE de las bombas de alta presión, cada una de las muestras fueron digeridas por un tiempo de 4 horas a una temperatura de 110°C. Cada muestra se analizó por triplicado junto con su

blanco. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante pruebas estadísticas de significancia con los resultados en la determinación de selenio total empleando peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación y cuantificación

En las **Figuras 1 y 2** se muestran los cromatogramas correspondientes a los iones Se(IV) y Se(VI) a diferentes concentraciones, obtenidos a partir de soluciones de trabajo. Como se puede observar tanto el ión Se(IV) como el ión Se(VI) presentan un rango de respuesta lineal lo suficientemente amplio para una buena cuantificación, así como también una alta simetría en las señales cromatográficas, lo que refleja una buena selectividad del sistema cromatográfico (Miller & Miller, 2001).

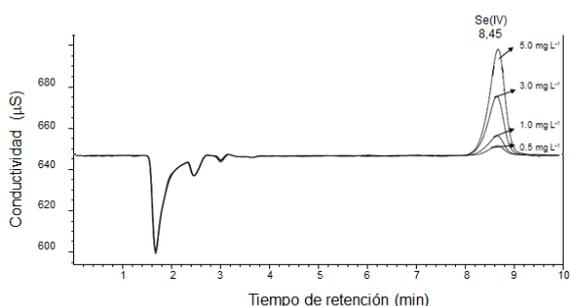


Figura 1. Cromatograma CI de ión Se(IV) a diferentes concentraciones (0,5; 1,0; 3,0 y 5,0 mg L^{-1}). Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

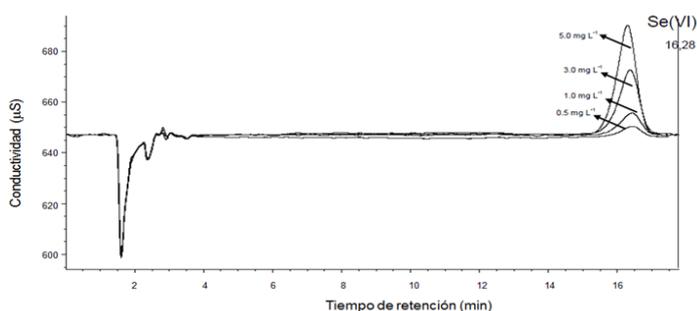


Figura 2. Cromatograma CI de ión Se(VI) a diferentes concentraciones (0,5; 1,0; 3,0 y 5,0 mg L^{-1}). Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Como se puede apreciar en las figuras el ión Se(IV) presenta un menor tiempo de retención con respecto al ión Se(VI). Esto es debido a la afinidad que presenta la fase estacionaria con los distintos iones, ya que la fase estacionaria es capaz de aumentar la retención de los iones a medida que se incrementa la relación carga/masa de éstos; por tanto, disminuye el radio de hidratación y aumenta la polarizabilidad induciendo un dipolo y la atracción sobre la resina.

Las curvas de calibración para Se (IV) fueron: $y = 263,099x - 30,028$, $r^2 = 0,9993$, $LD = 0,15 \text{ mg L}^{-1}$ y $y = 402,735x - 34,154$, $r^2 = 0,9998$, $LD = 0,28 \text{ mg L}^{-1}$ para Se (VI) respectivamente. El análisis de estas figuras permite demostrar la proporcionalidad que existe entre las áreas de picos con respecto a las concentraciones de cada uno de estos iones, reflejándose estas

proporcionalidades en los coeficientes de correlación (r). Los límites de detección obtenidos fueron de $0,15$ y $0,28 \text{ mgL}^{-1}$ para Se(IV) y Se(VI) , respectivamente, se calcularon empleando el método de regresión lineal, ($y - y_B = 2S_B$). En la **Figura 3** se aprecia claramente que no existe solapamiento cromatográfico de los iones Se(IV) y Se(VI) .

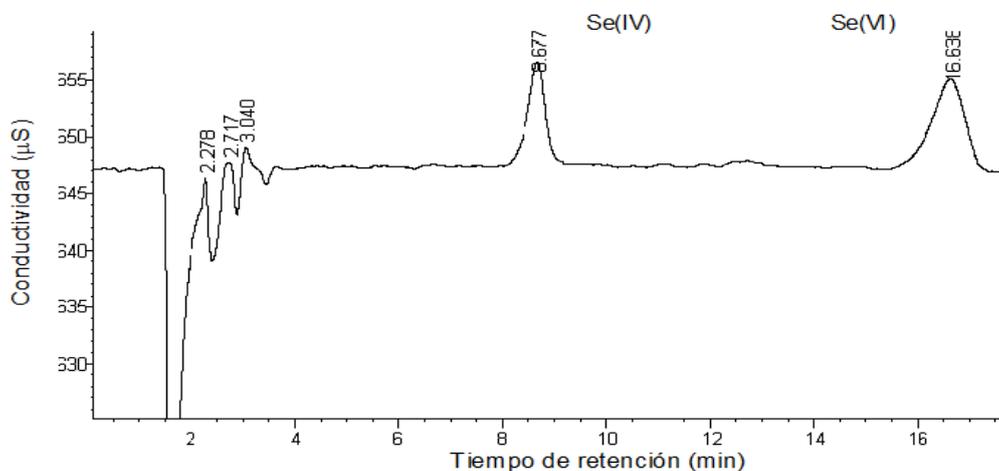


Figura 3. Cromatograma IC de iones Se(IV) y Se(VI) con concentración 1 mg L^{-1} . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \text{ } \mu\text{S}$.

3.2. Desarrollo del método

3.2.1. Estudio de las condiciones experimentales para la digestión de compuestos de selenio

En el proceso de digestión de compuestos de selenio empleando peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta como medio oxidante, se estudiaron diferentes mecanismos para llevar a cabo la oxidación completa tanto del compuesto inorgánico (selenito de sodio) como del compuesto orgánico (selenometionina), variando el volumen de peróxido de hidrógeno adicionado, el tiempo de reacción y el pH.

3.2.1.1. Condiciones experimentales para la digestión del compuesto inorgánico

3.2.1.1.1. Variación de la cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) adicionado

Como el selenito de sodio presenta una alta reactividad al oxidarse completamente a Se(VI) , aplicando como medio oxidante peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta, fue el primer compuesto de selenio estudiado. En la **Figura 4** se puede observar que existe un aumento continuo del porcentaje de recuperación de selenio ($71,03 \pm 3,18$ hasta $103 \pm 2,01$), cuya oxidación a iones Se(VI) se realizó en un tiempo de 30 minutos; esto se debe que a medida que se aumenta la concentración de oxidante (H_2O_2), aumenta la formación del radical hidroxilo ($^{\circ}\text{OH}$) (Jackson & Hewitt, 1999). y por consiguiente aumenta el poder

oxidativo. Sin embargo, cuando se adicionan volúmenes de 1000 a 3000 μL de oxidante, no se observan diferencias significativas ($103 \pm 2,01$ a $103,51 \pm 4,87$), ya que se alcanza el equilibrio o límite máximo de oxidación de los iones Se(IV) a Se(VI) .

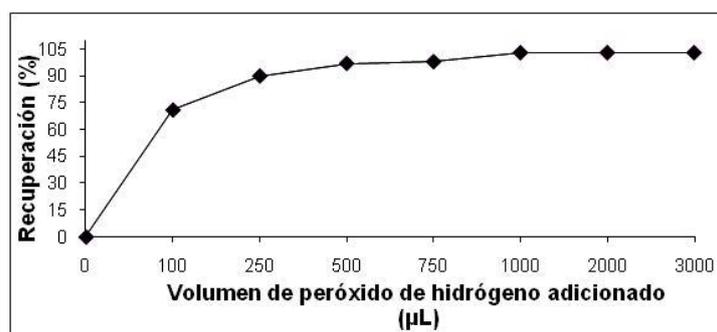


Figura 4. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de selenito de sodio, digerido con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV.

También se puede apreciar en esta figura que cuando la solución de selenito de sodio se expone a la luz UV por un tiempo de 30 min, sin agregar volumen de peróxido de hidrógeno, no se produce oxidación, indicando que la irradiación con luz UV es insuficiente para originar la oxidación de los iones Se(IV) a Se(VI) . En la **Figura 5**, se muestra el cromatograma correspondiente a estos análisis, donde los dos picos que aparecen a tiempos de 2,0 y 2,9 min probablemente pertenezcan al radical hidróxilo formado por la exposición del peróxido de hidrógeno a la radiación UV, los picos que aparecen a 6,3 y 12,5 min corresponde al ión nitrato y sulfato respectivamente; la presencia de estos dos últimos iones en el cromatograma se debe a las impurezas que se encuentran presente en el peróxido de hidrógeno, mientras que el pico asignado al ión Se(VI) aparece a un tiempo de retención de 16,4 minutos.

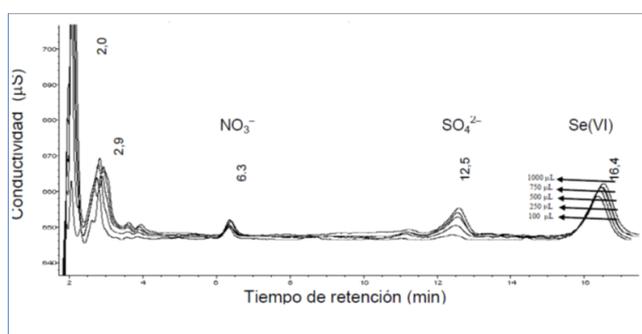


Figura 5. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de selenito de sodio digerido con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

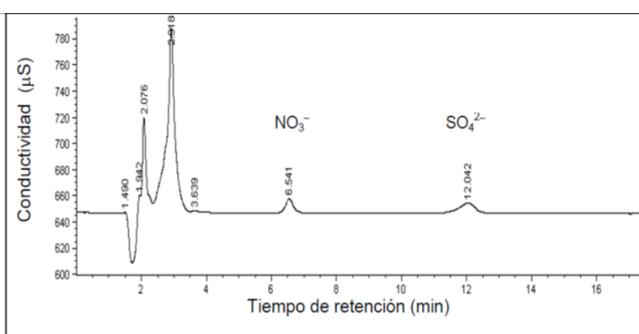


Figura 6. Cromatograma CI obtenido a partir de agua desionizada digerida con $1000 \mu\text{L}$ de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

En este cromatograma, se puede apreciar un incremento continuo del pico del ión Se(VI) cuando se varía la concentración de (0,12%; 0,3%; 0,6%; 1,2%), es decir, al aumentar la cantidad de peróxido de hidrógeno adicionado (100, 250, 500, 750 y 1000 μL). Sin embargo, al agregar volúmenes mayores de 1000 μL la altura del pico se mantiene constante. Cabe destacar en la **Figura 5** que la presencia del ión Se(VI) en este cromatograma es únicamente proveniente del selenito de sodio digerido con peróxido de hidrógeno, ya que el peróxido de hidrógeno no genera señal cromatográfica en los tiempos de retención del Se(IV) y Se(VI), es decir no causa interferencia, esto se puede observar en la **Figura 6** que muestra el cromatograma correspondiente al agua desionizada con 1000 μL de peróxido de hidrógeno (blanco), donde se observa la presencia de los iones nitrato y sulfato.

3.2.1.1.2. Variación del tiempo de exposición con UV

Cuando la solución de selenito de sodio se digiere empleando un volumen de 1000 μL de peróxido de hidrógeno, se obtienen porcentajes de recuperación de $103,00 \pm 2,01$, considerando que este volumen es el necesario para garantizar la oxidación completa de los iones Se(IV) a Se(VI). No obstante, a pesar de los óptimos resultados obtenidos en un tiempo de digestión de 30 minutos, se procedió a disminuir el tiempo de exposición con luz UV, encontrándose resultados similares. En la **Figura 7**, se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos a partir de la digestión de la solución de selenito de sodio con 1000 μL de H_2O_2 , a diferentes tiempos de exposición a luz UV.

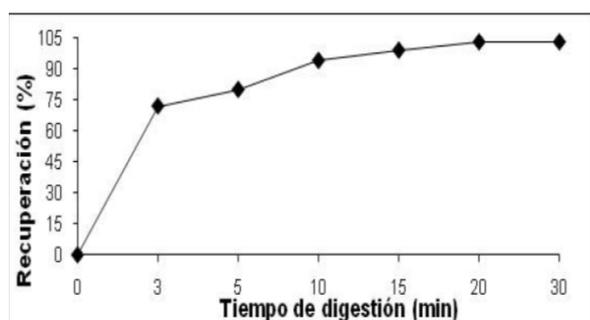


Figura 7. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de selenito de sodio digerido con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v a diferentes tiempos con luz UV.

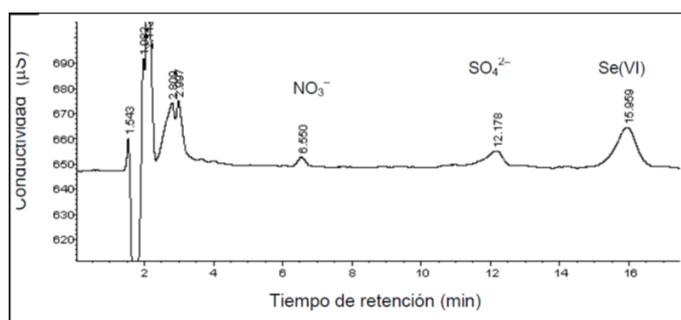


Figura 8. Cromatograma Cl de iones Se(VI) obtenido a partir de selenito de sodio digerido con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 15 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

Como se puede apreciar en la **Figura 7**, a un tiempo de 15 min de exposición con radiación UV empleando 1000 μL de peróxido de hidrógeno se obtienen porcentajes de recuperación de $99,03 \pm 1,35$, representando este tiempo el óptimo para la oxidación de los iones Se(IV)

a Se(VI). A tiempos mayores de 15 min de digestión se obtuvieron recuperaciones de selenio mayores al 99%. Cabe destacar que la optimización de un método analítico consiste en el empleo de la menor cantidad de reactivo en el menor tiempo posible. La **Figura 8** muestra el cromatograma de la oxidación del selenito de sodio a iones Se(VI) empleando estos parámetros.

El ión Se(VI) aparece a un tiempo de retención de 15,9 min. Este cambio del tiempo de elución del ión Se(VI) se debe a cambios en la columna, debido a la limpieza de la misma o la elución de otro tipo de solvente. Por esta razón diariamente fue evaluado el sistema de calibración para los iones en estudio, asegurando de esta forma que los resultados obtenidos sean los más reproducibles.

Establecidas las condiciones experimentales para la digestión del selenito de sodio, el proceso químico que ocurre en dicha oxidación empleando peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta puede describirse mediante la siguiente ecuación (Liao, C. & Gurol, M., 1995):



En la **Tabla 4** se resumen las condiciones experimentales obtenidas en el estudio de optimización de la digestión de la solución de iones Se(IV).

Tabla 4. Condiciones experimentales obtenidas en el proceso de digestión de iones Se(IV) a Se(VI)

Cantidad de H ₂ O ₂ al 30% (μL)	Tiempo de exposición UV (min)	pH del medio
1000	15	ácido

3.2.1.2. Condiciones experimentales para la digestión del compuesto orgánico

El estudio del compuesto orgánico (seleno-DL-metionina) se analizó empleando las mismas condiciones experimentales obtenidas en el proceso de digestión del selenito de sodio (**Figura 9**).

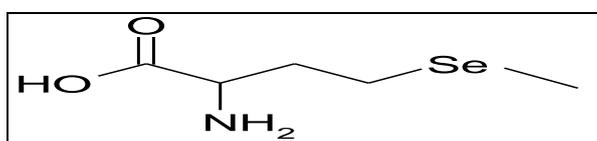


Figura 9. Estructura química del compuesto orgánico seleno-DL-metionina.

Como prueba preliminar, la solución de seleno-DL-metionina fue digerida con 1000 μL de H₂O₂ al 30% v/v y expuesta a la luz ultravioleta durante 15 min, en la cual no se obtuvo un óptimo porcentaje de recuperación, ya que sólo el $37,51 \pm 2,79$ es recuperado. La **Figura 10** muestra el cromatograma correspondiente a este análisis.

Tomando en cuenta la poca recuperación de selenio como Se(VI), a partir de seleno-DL-metionina, se realizaron variaciones en el volumen de peróxido de hidrógeno adicionado y el tiempo de exposición a la luz UV, como se muestra en la **Figura 11**. Como se puede

observar en esta figura, no se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación con la variación del tiempo de exposición a la luz UV ni con el aumento de peróxido de hidrógeno adicionado, ya que la máxima recuperación obtenida fue de $77,02 \pm 2,28$. Una de las posibles causas de que no ocurra una completa oxidación es la compleja estructura del seleno-DL-metionina, pues el selenio se encuentra muy impedido para un ataque directo del radical hidroxilo.

Con la finalidad de mejorar el proceso de digestión para éste compuesto orgánico, se realizó un cambio de pH en el medio de reacción. Para ello, se estudió el comportamiento de la seleno-DL-metionina en medio ácido y básico, empleando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, respectivamente. La **Figura 12**, muestra los resultados obtenidos.

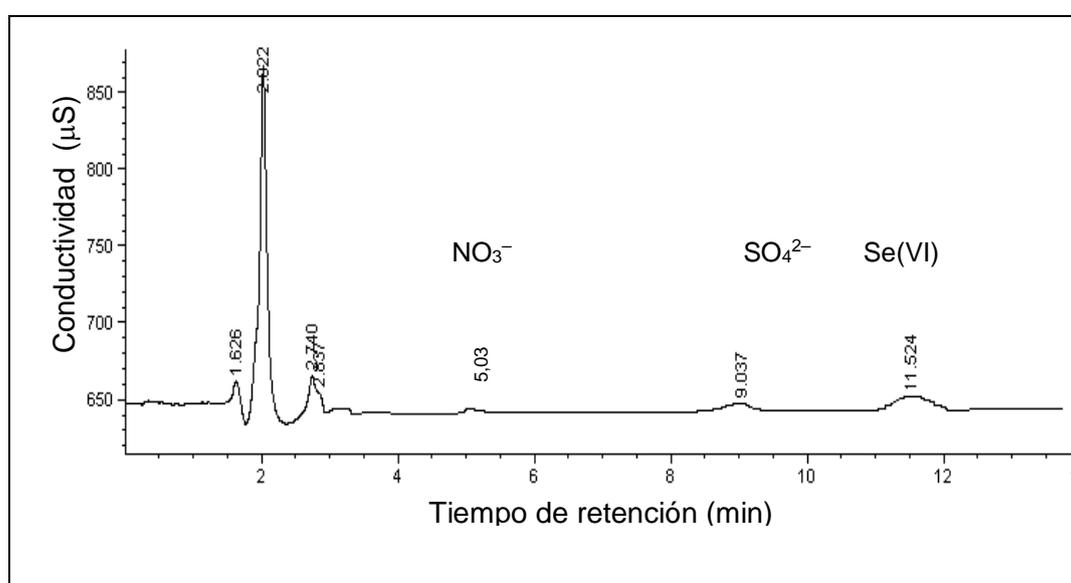


Figura 10. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerido con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 15 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

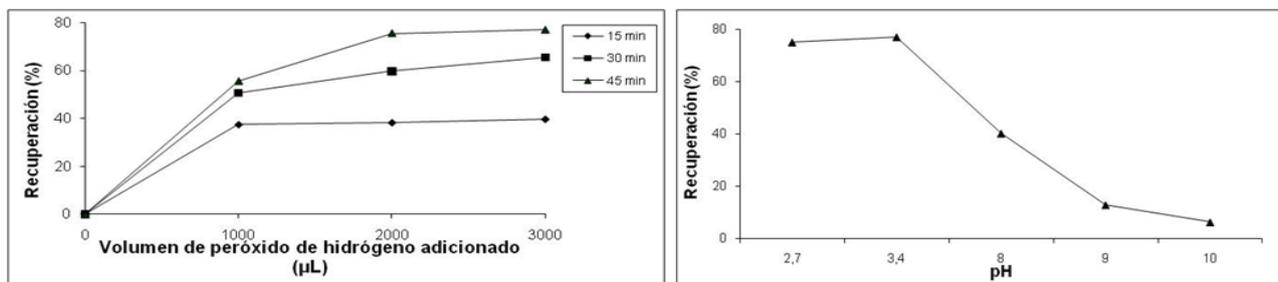


Figura 11. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con diferentes volúmenes de H_2O_2 al 30% v/v a diferentes tiempos con luz UV.

Figura 12. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v a 45 min con luz UV y a diferentes valores de pH.

La seleno-DL-metionina presenta un pH de 5,3, por lo tanto, al agregar 3000 μL de peróxido de hidrógeno, el pH del medio disminuye a 3,4 y con la adición de 50 μL de HCl 0,1 M, el pH varía a 2,7. Al agregar 100; 500 y 3500 μL de hidróxido de sodio 0,1 M a la solución de seleno-DL-metionina, el pH aumenta a 8; 9 y 10, respectivamente.

En la **Figura 12** se puede observar que a pH ácidos existen mayores porcentajes de recuperación que a pH básico, aunque los resultados obtenidos en el proceso de digestión del seleno-DL-metionina no son óptimos debido a que la máxima recuperación de selenio fue de $77,02\% \pm 2,28$. Por otra parte, se puede apreciar que a medida que aumenta el pH existe una disminución continua del porcentaje de recuperación.

Las **Figuras 13 y 14** muestran los cromatogramas correspondientes a la oxidación de seleno-DL-metionina a Se(VI) bajo condiciones ácidas y básicas. El pico que aparece a 2,703 min corresponde al ión Cl^- mientras que el ión Se(VI) aparece a un tiempo de retención de 11,207 min (**Figura 13**).

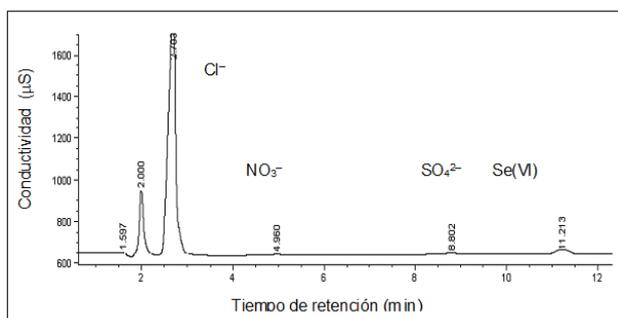


Figura 13. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v y 100 μL de ácido clorhídrico 0,1M (pH=2,7) durante 45 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

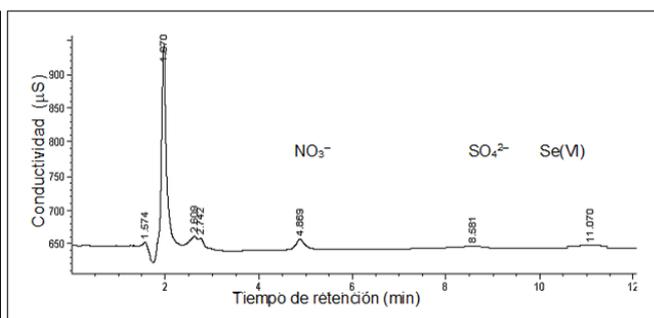


Figura 14. Cromatograma CI de iones Se (VI) obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerido con 3000 μL de H_2O_2 al 30% v/v y 3,5 mL de hidróxido de sodio 0,1M (pH=10) durante 45 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM NaHCO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

En el cromatograma de la **Figura 14**, el pico que aparece a un tiempo de retención de 11,070 min se le asigna al ión Se(VI). En la **Figura 14** se puede apreciar una pequeña área del pico para el Se(VI) cuando el medio de reacción es llevado a un pH básico.

Después de realizar pruebas preliminares a la seleno-DL-metionina variando los parámetros obtenidos en la oxidación del selenio inorgánico, no se encontró un medio de reacción con resultados lo suficientemente buenos para comenzar una optimización de las condiciones, por lo que se tuvo que realizar la variación de un cuarto parámetro, como lo era la cantidad de analito presente en la solución de trabajo. A partir de los resultados mostrados en la **Figura 15**, se encontró un buen porcentaje de recuperación del contenido

de selenio como Se(VI) a partir del seleno-DL-metionina ($98,61\% \pm 1,13$) al utilizarse una cantidad de muestra de 0,5 mL.

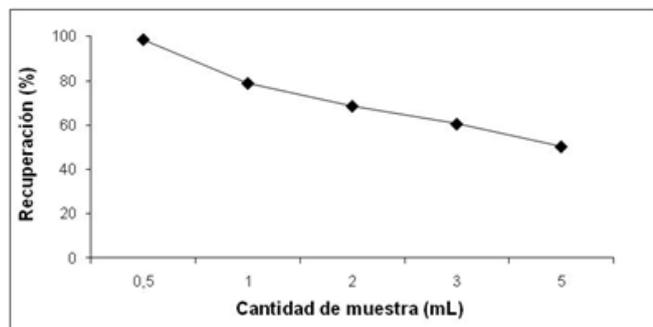


Figura 15. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de diferentes cantidades de seleno-DL-metionina digerida con $1000 \mu\text{L}$ de H_2O_2 al 30% v/v a 45min con luz UV.

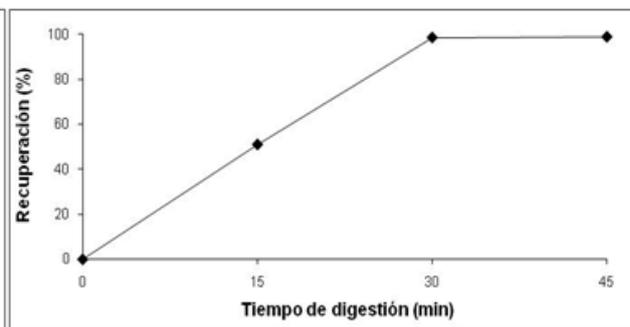


Figura 16. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de seleno-DL-metionina digerida con $1000 \mu\text{L}$ de H_2O_2 al 30% v/v a diferentes tiempos con luz UV.

Luego de haber encontrado un medio de reacción donde la oxidación es completa, se procedió a optimizar las condiciones experimentales de oxidación del selenio orgánico a iones Se(VI).

3.2.1.2.1. Variación del tiempo de exposición con UV

Cuando la solución de seleno-DL-metioninase digiere empleando un volumen de $1000 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrógeno a un tiempo de exposición con luz UV de 45 min, se obtienen porcentajes de recuperación de $98,61 \pm 1,13$. No obstante, debido al largo tiempo de análisis se procedió a disminuir el tiempo de exposición con luz UV, encontrándose resultados similares a un tiempo de 30 min. En la **Figura 16**, se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos a partir de la digestión de la solución de seleno-DL-metionina con $1000 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrógeno, a diferentes tiempos de exposición a la luz UV. Como se puede apreciar en esta figura, a un tiempo de 30 min de exposición con radiación UV se obtienen buenos porcentajes de recuperación ($101,17 \pm 1,94$), representando este tiempo el óptimo para la oxidación de seleno-DL-metionina a iones Se(VI). La **Figura 17** muestra el cromatograma correspondiente a este estudio.

3.2.1.2.2. Variación de la cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) adicionado

En la **Figura 18** se puede observar que, al emplear volúmenes de 500 a $1000 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrógeno, existe un aumento del porcentaje de recuperación de selenio ($56,16\% \pm 3,64$ a $101,17\% \pm 1,94$), cuya oxidación a iones Se(VI) se realizó en un tiempo de 30 minutos. Sin embargo, al incrementar el volumen de peróxido de hidrógeno adicionado (1000 a $3000 \mu\text{L}$), es decir, al aumentar la concentración de 3% a 9%, se observa que el porcentaje de recuperación se mantiene constante.

En esta **Figura 18** se puede apreciar también que cuando la solución de seleno-DL-metionina se expone a la luz UV por un tiempo 30 min, sin agregar volumen de peróxido de hidrógeno, no se observa oxidación alguna a iones Se(VI).

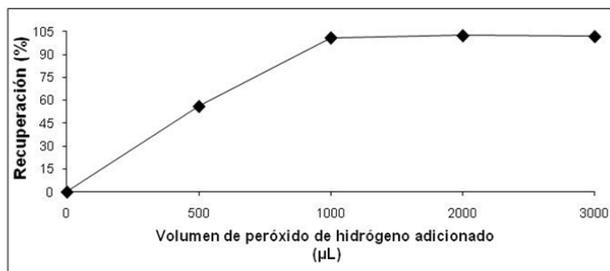
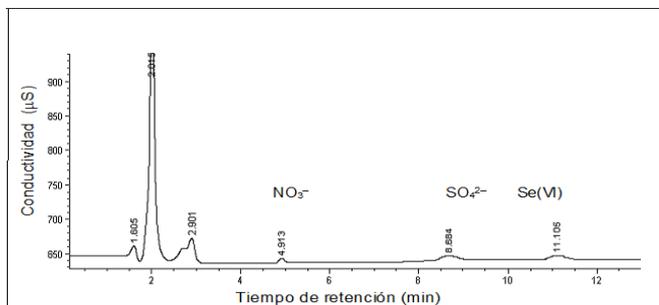


Figura 17. Cromatograma CI de iones Se (VI) obtenido a partir de 0,5 mL de seleno-DL-metionina digerida con 1000 µL de H₂O₂ al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente 1,8 mM Na₂CO₃ / 1,7 mM NaHCO₃; velocidad de flujo 1 mL min⁻¹, detector de conductividad con una sensibilidad de 50 µS.

Figura 18. Porcentaje de recuperación de selenio obtenido a partir de 0,5 mL de seleno-DL-metionina digerido con diferentes volúmenes de H₂O₂ al 30% v/v durante 30 min con luz UV.

La **Figura 19** muestra el cromatograma obtenido a partir de la digestión del selenio orgánico, empleando 0,5 mL de muestra con 3000 µL de peróxido de hidrógeno durante 30 min de exposición a la luz UV, este cromatograma muestra que el pico que aparece a un tiempo de retención de 11,071 min es el ión selenato.

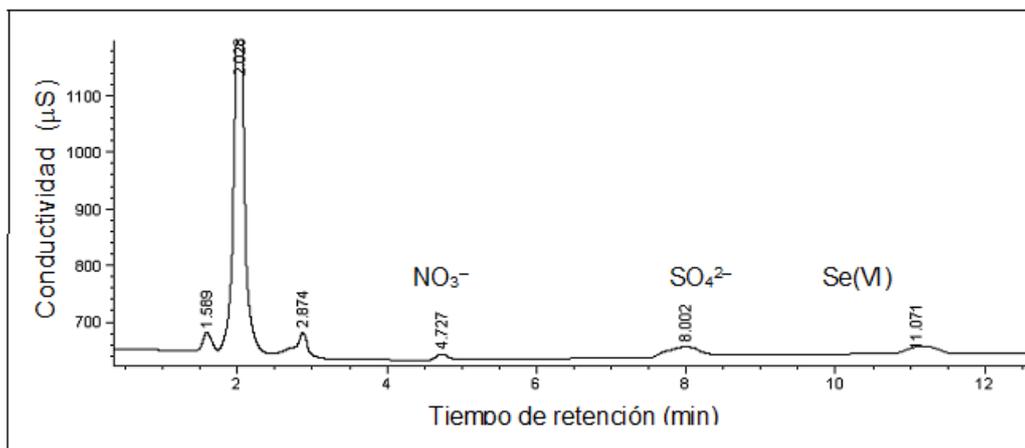


Figura 19. Cromatograma CI de iones Se(VI) obtenido a partir de 0,5 mL de seleno-DL-metionina digerida con 3000 µL de H₂O₂ al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente 1,8 mM Na₂CO₃ / 1,7 mM NaHCO₃; velocidad de flujo 1 mL min⁻¹, detector de conductividad con una sensibilidad de 50 µS.

Las condiciones experimentales obtenidas en el proceso de digestión del seleno-DL-metionina a iones Se(VI) fueron las siguientes:

Cantidad de muestra (μL)	Cantidad de H_2O_2 al 30% (μL)	Tiempo de exposición UV (min)	pH del medio
500	1000	30	ácido

De esta manera, el método desarrollado para la determinación de selenio total en muestras de selenio orgánico por cromatografía iónica mediante el empleo de peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta consiste en la digestión de 0,5 mL de muestra, en el cual se adicionó 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v en un tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 30 min

3.3. Estudio de interferencia

Dado que el Se(IV) y el Se(VI) no presentan problemas de interferencias entre sí en la separación cromatográfica por CI empleando como fase móvil 1,8 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/1,7$ mM NaHCO_3 , se garantizan los satisfactorios resultados obtenidos en la optimización del método. Sin embargo, para la aplicación del método a una muestra tan compleja como es la cerveza, se estudió la separación de los iones Se(IV) y el Se(VI) en presencia de otros iones (NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} y SO_4^{2-}).

En la **Figura 20** se muestra el cromatograma obtenido a partir de una solución de Se(IV) y Se(VI) contaminada con diversos iones (NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} y SO_4^{2-}) a concentraciones de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, empleando las condiciones cromatográficas establecidas. Estos iones tienen tiempo de retención cercanos a los iones de selenio investigados.

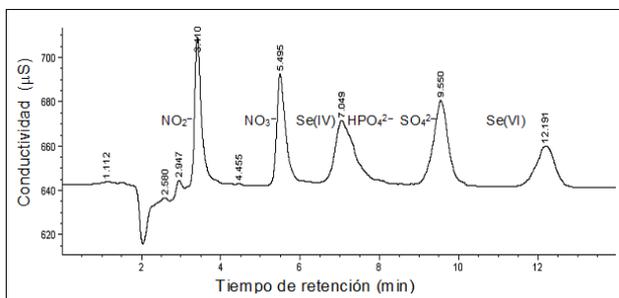


Figura 20. Cromatograma CI de mezcla de iones a concentraciones de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

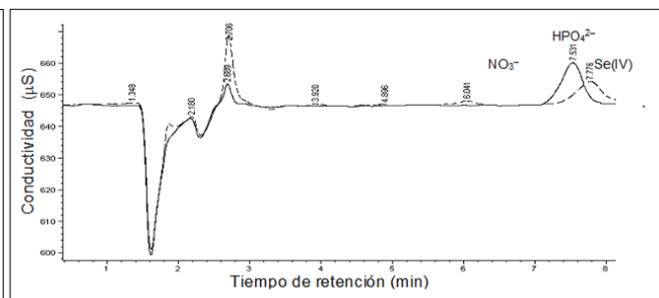


Figura 21. Cromatogramas CI obtenido a partir de soluciones de selenito de sodio (línea continua) y ácido fosfórico (línea discontinua) 1 mgL^{-1} . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/1,7 \text{ mM NaHCO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

Al analizar esta figura se puede observar que el pico que aparece a un tiempo de retención de 7,49 min es asignado al ión Se(IV). No obstante, este pico aparece solapado con el ión HPO_4^{2-} (previamente estandarizado), causando de esta forma interferencia en la separación y cuantificación del ión Se(IV). Debido a este inconveniente se realizó el estudio de la mínima concentración de HPO_4^{2-} capaz de interferir en la resolución y cuantificación del ión Se(IV). En la **Figura 21** se aprecia tal análisis.

El pico que aparece a un tiempo de retención de 7,776 min se le asigna al ión Se(IV) , mientras que el pico asignado al ión HPO_4^{2-} aparece a un tiempo de retención de 7,531 min. Por medio de este análisis se obtuvo que a partir de concentraciones mayores de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ la señal cromatográfica del ión Se(IV) es afectada por el ión HPO_4^{2-} . Para garantizar la separación cromatográfica de los iones Se(IV) y Se(VI) en presencia de otros iones, se varió la concentración de la mezcla del eluente carbonato de sodio y bicarbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) en diversas proporciones.

La mejor separación cromatográfica encontrada de los iones Se(IV) y Se(VI) en presencia de otros iones, se logró empleando la mezcla de $1,0 \text{ mM NaOH}/2,0 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ (Niss *et al.* 1993). En la **Figura 22** se puede observar el cromatograma correspondiente a este estudio. La separación cromatográfica dada en este cromatograma proporciona una buena separación de los iones en estudio, debido a que se obtiene una buena resolución en los picos cromatográficos. El empleo del eluente de carbonato de sodio/hidróxido de sodio elimina la interferencia del ión Se(IV) con el PO_4^{3-} , debido a que el pH del eluente es mayor ($\text{pH}=10$) al formado por la mezcla de carbonato de sodio/carbonato ácido de sodio ($\text{pH}=9$), originando que el fosfato presente en la mezcla se encuentra en la forma PO_4^{3-} , aumentando de esta manera el tiempo de retención y efectivamente la separación con el ión Se(IV) (Niss *et al.* 1993). En la **Figura 23** se muestran los sistemas de calibración de los iones Se(IV) y Se(VI) , donde a partir de éstas se pudo cuantificar la concentración de estos iones en la muestra de cerveza.

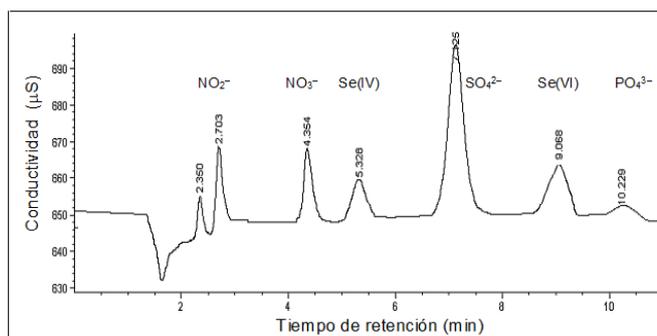


Figura 22. Cromatograma CI de mezcla de iones a concentraciones de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente: $1,0 \text{ mM NaOH}/2,0 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

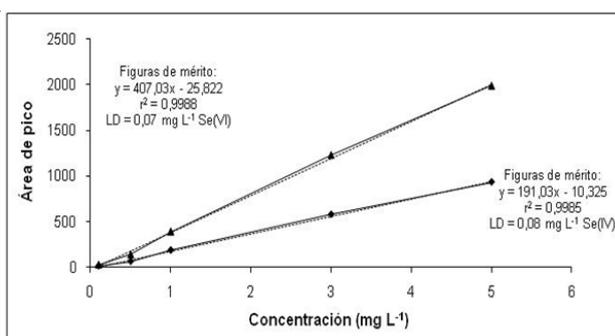


Figura 23. Curva de calibración para determinar niveles de concentración de iones Se(IV) y Se(VI) . Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluente $1,0 \text{ mM NaOH}/2,0 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de $50 \mu\text{S}$.

Los límites de detección obtenidos empleando esta nueva condición cromatográfica fue de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ para Se(IV) y $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ para Se(VI) . Al comparar estos límites de detección con los obtenidos en la literatura (Niss *et al.* 1993) que fueron de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para los dos

iones, respectivamente; se puede apreciar que existen pequeñas diferencias entre los valores obtenidos y los citados en la literatura, indicando que esta nueva fase móvil permite una mejor cuantificación, además de una buena separación de los iones en estudio

3.4. Aplicación del método

3.4.1. Validación del método para la determinación de selenio total en muestras de cerveza

La metodología establecida se aplicó a tres muestras de cerveza para determinar el contenido de selenio total. Previo a éste análisis, las muestras se analizaron en el CI para cuantificar la cantidad de Se(IV) y Se(VI) presente, y de ésta manera determinar la cantidad de selenio oxidado cuando se aplica el sistema H_2O_2/UV . Cabe destacar que la muestra de cerveza presenta un pH 4,3, lo cual puede considerarse como medianamente ácido. Por lo tanto, el pH del medio de reacción varió a 3,4 al agregar 1000 μL de peróxido de hidrógeno. La **Figura 24** muestra el cromatograma de la muestra de cerveza sin aplicar el sistema H_2O_2/UV , empleando las condiciones cromatográficas establecidas para la separación de los iones en estudio de los problemas de interferencias de nitrato, fosfato y sulfato.

Como se puede observar en esta figura que el ión Se(IV) se encuentra separado de los iones nitrato, fosfato y sulfato. En este cromatograma no se aprecia la elución del ión Se(VI) que aparece a un tiempo de retención aproximadamente de 9 min, pudiéndose explicar debido a que la concentración de este ión se encuentre por debajo de los límites de detección del CI.

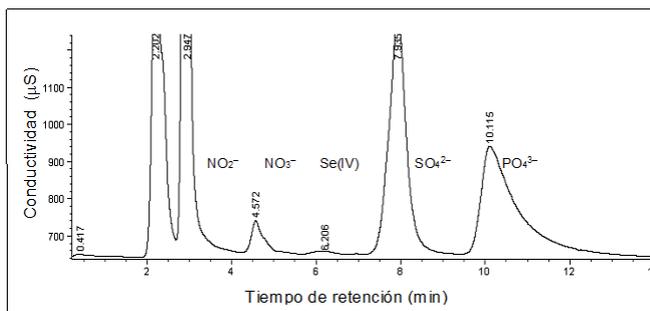


Figura 24. Cromatograma CI obtenido a partir de 3 mL de muestra de cerveza sin digestión. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,0 mM NaOH/2,0 mM Na_2CO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

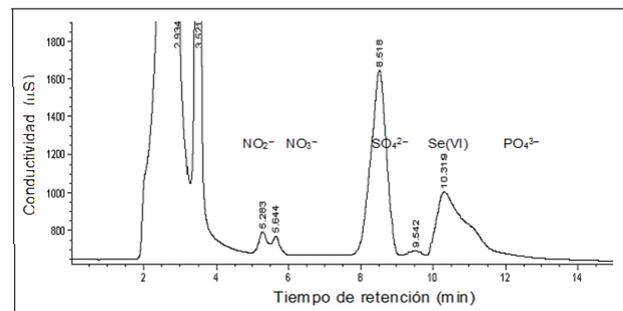


Figura 25. Cromatograma CI obtenido a partir de 0,5 mL de muestra de cerveza digerida con 1000 μL de H_2O_2 al 30% v/v durante 30 min con luz UV. Condiciones experimentales: columna de aniones AS4A, precolumna AG4A; Eluyente 1,0 mM NaOH/2,0 mM Na_2CO_3 ; velocidad de flujo 1 mL min^{-1} , detector de conductividad con una sensibilidad de 50 μS .

En la **Figura 25** se aprecia el cromatograma correspondiente al emplear el sistema oxidante a la muestra de cerveza, para evaluar de esta forma la eficiencia del método propuesto. Al

estudiar esta figura se puede apreciar que el empleo del sistema oxidante H₂O₂/UV proporciona buenos resultados para la determinación de selenio, ya que las diferentes especies de selenio fueron oxidadas a iones Se(VI) como producto final; esto se puede confirmar en el cromatograma que aparece la elución del ión Se(VI) a un tiempo de retención de 9,542 min. Para evaluar la eficiencia del método propuesto, se determinó en estas mismas muestras la cantidad de selenio total mediante la técnica ICP-AES. Los resultados obtenidos por las dos metodologías fueron comparados mediante un tratamiento estadístico de pruebas de significancia, en el cual se aplicó la prueba t de comparación de las medias de dos muestras y la prueba F para la comparación de las desviaciones estándar (Miller & Miller, 2001).

En la **Tabla 5** se muestran las concentraciones obtenidas de las diferentes formas del selenio encontradas en la muestra de cerveza y las concentraciones de selenio total obtenidos por las dos técnicas (CI y ICP-AES).

Tabla 5. Resultados de la especiación de selenio en muestras de cerveza (mg L⁻¹)

H ₂ O ₂ /UV ^(a) Se total	ICP-AES ^(b) Se total	Se(-II) ^(a) Selenio orgánico	Se(IV) ^(a) selenito	Se(VI) ^(a) selenato
0,7838±0,04	0,7801±0,03	0,5795±0,02	0,1977±0,03	<LD LD=0,07

(a) La cantidad de selenio total reportada está contenida en 0,005 L de solución (n=3).

(b) La cantidad de selenio total reportada está contenida en 0,01 L de solución (n=3).

Los resultados obtenidos en el estudio estadístico, tanto para la prueba t de comparación de las medias de dos muestras como para la prueba F son menores que el valor crítico establecido para dos grados de libertad y un nivel de confianza de 90% (0,10). Esto significa que la metodología desarrollada para la determinación de selenio total mediante el empleo de peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta proporciona resultados tan precisos y exactos como los obtenidos mediante la técnica ICP-AES. Las especies encontradas en las muestras de cerveza son las esperadas, debido a que la levadura es uno de los componentes de la cerveza, la cual contiene selenio orgánico y que al oxidarse predominará el Se(VI). El selenio presente en las muestras de cerveza se encuentra en un nivel promedio de 0,7819 mg L⁻¹, lo cual excede el límite de concentración permisible establecido en la Norma Venezolana COVENIN sobre la Clasificación de las aguas embotelladas, siendo el nivel de concentración referencial de 0,01 mg L⁻¹ de selenio (Norma Venezolana, COVENIN. No. 1431, 1982). En este sentido, el selenio presente en la cerveza puede causar daños para la salud, por lo tanto, se deben tomar medidas preventivas para mejorar el control de calidad.

4. CONCLUSIONES

La oxidación completa de los iones Se(IV) a Se(VI) se llevó a cabo satisfactoriamente con 5 mL de la solución de trabajo, empleando 1000 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% v/v en un tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 15 min. Bajo éstas condiciones experimentales se obtuvo un porcentaje de recuperación de $99,03\% \pm 1,35$.

El medio óptimo de reacción para la oxidación de los iones Se(IV) a Se(VI) fue a pH ácido.

La oxidación completa del contenido de selenio presente en el compuesto orgánico seleno-DL-metionina a iones Se(VI) se llevó a cabo tomando 0,5 mL de muestra, empleando 1000 μ L de peróxido de hidrógeno al 30% v/v en un tiempo de exposición a la luz ultravioleta de 30 min.

El medio de reacción óptimo para la oxidación de la seleno-DL-metionina a Se(VI) se llevó a cabo en medio ácido.

El método propuesto se aplicó a muestras de cerveza con el resultado de selenio total de $0,7838 \text{ mg L}^{-1}$. El método propuesto se validó mediante la determinación de selenio total a muestras de cervezas por ICP-AES.

5. REFERENCIAS

- Bou, R., Guardiola, F., Padró, A., Pelfort, E. & Codony R. (2004). "Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 19, 1361–1369.
- Buchberger, W. & Haddad, P. (1997). "Advances in detection techniques for ion chromatography". *Journal of Chromatography A*, 789, 67-83.
- Cáceres, A. & Gardiner, P. (2000). "Automated spectrofluorimetric method for the determination of Se (VI) and Se (IV)". *Sixth Rio Simposium on Atomic Spectromery*, Pucon-Chile, pp. 33.
- Cámara, C., Pérez-Conde, C. & Moreno, M. (2000). "Speciation of inorganic selenium in environmental matrices by flow injection análisis-hydride generation-atomic fluorescence spectrometric. Comparison of off-line, pseudo on-line extraction and reduction methods". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 681-686
- Caruso, J., Ponce de León, C., DeNicola, K. & Montes, M. (2003). "Sequential extractions of selenium soils from Stewart Lake: total selenium and speciation measurements with ICP-MS detection". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry* 18, 435 – 440.
- Chatterjee, A., Shibata, Y. & Morita, M. (2000). "determination of selenite and selenomethionine by HPLC-HG-high power N2-MIP-MS: a suitable coupling for selenium speciation." *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 913-919.
- Cole, D. & Evrovski, J. (1997). "Quantificación of sulfate and thiosulfate in clinical samples by ion chromatography". *Journal of Chromatography*, 789, 221-232.
- Clesceri, L., Greenberg, A. & Rhodes, R. (1989) "Standard Methods". American Public Health Asociation: Washington, DC., 3-131 – 3-141.
- Colina, M. & Gardiner. (1999). "Simultaneous determination of nitrogen, phosphous and sulphur by means of microwave digestion ans ion chromatography". *Journal Chromatography A*, 847, 285-290.
- Craig, J. (1999). "Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives". RCS, Clean Technology monographs. Cambridge, UK. 209-213.
- Frankenberger, W., Zhang, Y. & Moore, J. (1999) "Measurement of selenite in sediment extracts by using hydride generation atomic absorption spectrometry". *Science of the Total Environment*, 229, 183-193.

- Gammelgaard, B. & Jøns, O. (2000). "Determination of selenite and selenate in human urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 945 – 949
- Goyal, S. (1997). "Applications of column liquid chromatography to inorganic analysis in agricultural research" *Journal of Chromatography*, 789, 519-527.
- Guyon, F., Pradeau, D., Robinet, S. & Do, B. (2001). "Application of central composite designs for optimization of the chromatographic separation of monomethylarsonate and dimethylarsinate and of selenomethionine and selenite by ion-pair chromatography coupled with plasma mass spectrometric detection". *Analyst*, 126, 594-601.
- Hatfield, D., Schweizer, U., Tsuji, P. & Gladyshev, V. (2016). *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. New York, EEUU, Springer Nature.
- Ipolyi, I., Stefánka, Zs. & Fodor, P. (2001). "Speciation of Se (IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography-direct hydride generation-atomic fluorescence spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 435, 367-375.
- Jackson, A. & Hewitt, C. (1999). "Atmosphere Hydrogen and Organic Hydroperoxides: A Review". 188.
- Janos, P. (1997). "Retention models in ion chromatography: the role of side equilibria in ion-exchange chromatography of inorganic cations and anions". *Journal of Chromatography A*, 789, 3-19.
- Johansson, M., Bordin, G. & Rodriguez A. (2000). "Feasibility study of ion-chromatography microwave assisted on-line species conversion hydride generation atomic absorption spectrometry for selenium speciation analysis of biological material". *Analyst*, 125, 273-279.
- Larsen, E. & Sloth, J. (2000). "The application of inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry for measurement of selenium isotopes, isotope ratios and chromatographic detection of selenoamino acids". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 669 – 672.
- Larsen, E., Sloth, J., Bügel, S. & Moesgaard, S. (2003). "Determination of total selenium and ⁷⁷Se in isotopically enriched human samples by ICP-dynamic reaction cell – MS". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 18, 317 – 322.
- Liao, C. & Gurol, M. (1995). "Chemical oxidation by photolytic decomposition of hydrogen peroxide". *Environmental Science and Technology*, 29, 12, 3007-3014.
- Lobinski, R., McSheehy, S., Pannier, F., Szpunar, J. & Potin-Gautier, M. (2002). "Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection". *Analyst*, 127, 223-229.
- Machat, J., Otruba, V. & Kanicky, V. (2002). "Spectral and non-spectral interferences in the determination of selenium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 19, 1096–1102.
- Mejía-Barajas, J., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojó, C. & Saavedra-Molina, A. (2016). *Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante*. *Información Tecnológica*, 27(4), 3-16.
- Miller, J. & Miller, J. (2001) "Estadística para Química Analítica". 2da edición. Editorial Addison – Wesley Iberoamericana. 40-49; 87-103.
- Niss, N., Schabron, J. & Brown, T. (1993). "Determination of selenium species in coal fly ash extracts". *Environmental Science & Technology*, 27, 827-829.
- Norma Venezolana, COVENIN. No. 1431, 1982.
- Rosen, R., Hartman, T., Ho, C., Hiserodt, R. & Tsai, J. (1998). "Determination of volatile organic selenium compounds from the maillard reaction in a selenomethionine-glucose model system". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2541-2545.
- Rodríguez, M., Sanz M. & Díaz (2009). Niveles de selenio en aguas potables de Canarias. *Journal of Food*, 4:2, 109-114,
- Sanz, M. & Conde, J. (1997). "Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters". *Chemical Reviews*, 6, 1979-2004.
- Sarzanini, C., Mentasti, E. & Bruzzoniti, M. (1998). "Simultaneous determination of inorganic anions and metal ions by suppressed ion chromatography". *Analytical Chimica Acta*, 382, 291-299.
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T. (2001). "Principios de Análisis Instrumental". España.; 812-817.
- Tirez, K., Brusten, W., Van, S., De Brucber, N. & Diles, L. (2000). "Characterization of inorganic selenium by ion chromatography with ICP-MS detection in microbial-treated industrial waste water". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 15, 1087-1092.
- Townshend, A. (1995). "Encyclopedia of Analytical Science". Academic Press: San Diego.; 4569-4589.
- Wallschläger, D. & Bloom, N. (2001). "Determination of selenite, selenate and selenocyanate in waters by ion chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (IC-HG-AFS)". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry*, 16, 1322-1328.
- Wang, Z., Gao, Y. & Belzile, N. (2001). "Microwave Digestion of Environmental and Natural Waters for Selenium Speciation". *Analytical Chemistry*, 73, 4711-4716.

- Wilson, S. (1994). "Peroxygen Technology in the Chemical Industry". *Chemistry & Industry*, 255-258.
- Woods, C. & Rowland, A. (1997). "Applications of anion chromatography in terrestrial environmental research". *Journal of Chromatography*, 789, 287-299.
- Yan, X., Lu, C., Zhang, Z., Wang, Z. & Liu, L. (2004). "Flow injection on-line sorption preconcentration coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry using a polytetrafluoroethylene fiber-packed microcolumn for determination of Se(IV) in natural water". *Journal of Analytical of Atomic Spectrometry* 19, 1963-1971.
- Zárate, M., Lundquist, T., Brent, A., Bailey, F. & Oswald, W. (1998). "Remoción de Selenio en Aguas de Drenaje Agrícola Mediante un Sistema Integrado de Lagunas de Diseño Avanzado, SILDA". XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. U.S.A. (<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/peru/boltar002.pdf>).

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MERCURIO EN SANGRE Y PLASMA DE PACIENTES CON LEUCEMIA

Lic. Carolina Sthormes¹, Dra. Marinela Colina^{1,2*}, Dr. Rodolfo Salas³, Lic. Jervis Nava¹, Dr. Victor Granadillo⁴ y Lic. Brinolfo Montilla¹.

- 1.- Laboratorio de Química Ambiental, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela.
- 2.- Empresa Innovación Ambiental Quitosano Ca. Av San Francisco No 29-25. San Francisco, Maracaibo Venezuela.
- 3.- Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela.
- 4.- Laboratorio de Instrumentación Analítica. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela.

*Autor para la correspondencia. Email: colinamarinela@gmail.com

Recibido: 22-11-2017 / Aceptado: 28-2-2018

RESUMEN

Se desarrollaron metodologías analíticas para la determinación de los niveles de mercurio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia registrados en el instituto Hematológico de Occidente, Maracaibo, evaluando la concentración total de Hg y sus especies químicas en muestras sanguíneas de los pacientes estudiados (n=34) y de sujetos controles (n=5), a través de HPLC-ICP-MS. El límite de detección obtenido para la determinación de Hg en sangre completa y plasma fue de $1,39 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ y el límite de cuantificación fue $1,39 \mu\text{g Hg L}^{-1}$. Las concentraciones totales de mercurio en sangre y plasma fueron $16,89 \pm 8,76 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ [$8,22-45 \mu\text{g Hg L}^{-1}$] y $25,77 \pm 5,12 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg L}^{-1}$] respectivamente, mientras que para la población control fueron de $25,36 \pm 11,4$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg L}^{-1}$] y $74,46 \pm 16,09$ [$64,38-102,82 \mu\text{g Hg L}^{-1}$]. La media de Hg-S del grupo de los varones evaluado fue $16,08 \pm 7,85 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ y en las hembras $18,68 \pm 10,05 \mu\text{g L}^{-1}$, la media de Hg-S en las hembras fue significativamente superior ($P < 0,05$) que la media de Hg-S observada. Los límites de detección para las especies químicas de Hg estudiadas en sangre resultaron: CH_3Hg^+ ($0,7 \mu\text{g Hg L}^{-1}$), Hg^{+2} ($0,53 \mu\text{g Hg L}^{-1}$). Las concentraciones encontradas de Hg^{+2} y CH_3Hg^+ en los pacientes de leucemia en sangre completa y plasma fueron $8,16 \pm 1,67$ [$6,96 - 10,97$], $9,85 \pm 6,22 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$6,04 - 20,74$], y $11,47 \pm 4,33 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$7,28 - 18,63$], $11,28 \pm 5,40$ [$6,24 - 18,63$] respectivamente, mientras que para la población control fueron $10,04 \pm 3,84 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$5,41 - 15,86$], $12,24 \pm 5,76$ [$6,00 - 21,37$] y $33,48 \pm 8,62 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$27,59 - 48,36$], $28,44 \pm 13,13$ [$18,25 - 50,23$].

Palabras clave: leucemia, mercurio, sangre, plasma.

DETERMINATION OF MERCURY LEVELS IN BLOOD AND PLASMA OF PATIENTS WITH LEUKEMIA

ABSTRACT



In this work, analytical methodologies were developed for the determination of mercury levels in blood and plasma samples of patients with leukemia registered at the Haematological Institute of the West, Maracaibo, evaluating the total concentration of Hg and its chemical species in blood samples from the patients studied ($n = 34$) and of control subjects ($n = 5$), by the HPLC-ICP-MS. The calculated limit of detection found for the determination of Hg in blood and plasma was $1.39 \mu\text{g Hg/L}$ and the limit of quantification was $1.39 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$. The total mercury concentrations in blood and plasma of $16.89 \pm 8.76 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$8.22-45 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] and $25.77 \pm 5.12 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$10.6-40.87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] respectively and for the control population were 25.3637 ± 11.4 [$10.6-40.87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] and 74.46 ± 16.09 [$64.38-102.82 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$]. The mean of Hg-S of the group of males evaluated was $16.08 \pm 7.85 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$, and in females were $18.68 \pm 10.05 \mu\text{g.L}^{-1}$, the mean of Hg-S in the females was significantly higher ($P < 0.05$) than the mean Hg-S observed. The detection limits for the Hg chemical species studied in blood are: Hg^+ ($0,7 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$), Hg^{+2} ($0,53 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$). The concentrations found for Hg^{+2} and CH_3Hg^+ in leukemia patients in blood and plasma were 8.16 ± 1.67 [$6.96-10.97$], $9.85 \pm 6.22 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$6.04-20.74$], and $11.47 \pm 4.33 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$7.28-18.63$], 11.28 ± 5.40 [$6.24-18.63$] respectively, while for the control population were $10.04 \pm 3.84 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$5.41-15.86$], 12.24 ± 5.76 [$6.00-21.37$] and $33,48 \pm 8.62 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$27.59-48.36$], 28.44 ± 13.13 [$18.25-50.23$].

Key words: leukemia, mercury, blood, plasma.

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO SANGUE E PLASMA DE PACIENTES COM LEUCEMIA

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidas metodologias analíticas para a determinação dos níveis de mercúrio no sangue total e em amostras de plasma de pacientes com leucemia cadastrados no Instituto Hematológico do Oeste, Maracaibo, avaliando a concentração total de Hg e suas espécies químicas em amostras de sangue dos pacientes ($n=34$) e dos indivíduos controle ($n=5$), por HPLC-ICP-MS. O limite de detecção obtido calculado para a determinação de Hg no sangue total e plasma foi de $1,39 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $1,36 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$. As concentrações totais de mercúrio no sangue e no plasma foram $16,89 \pm 8,76 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$8,22-45 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] e $25,77 \pm 5,12 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$], respectivamente, enquanto que para a população de controle foram $25,36 \pm 11,4$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] e $74,46 \pm 16,09$ [$64,38-102,82 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$]. O Hg-S médio do grupo de machos avaliados foram de $16,08 \pm 7,85 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ e nas fêmeas $18,68 \pm 10,05 \mu\text{g.L}^{-1}$, a média de Hg-S nas fêmeas foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que a média de Hg-S observada. Os limites de detecção das espécies químicas de Hg estudadas no sangue foram: CH_3Hg^+ ($0,7 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$), Hg^{+2} ($0,53 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$). As concentrações encontradas para Hg^{+2} e CH_3Hg^+ em pacientes com leucemia no sangue total e plasma foram $8,16 \pm 1,67$ [$6,96-10,97$], $9,85 \pm 6,22 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$6.04-20.74$] e $11.47 \pm 4.33 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$7.28-18.63$], 11.28 ± 5.40 [$6.24-18.63$] respectivamente, enquanto que para a população de controle foram $10,04 \pm 3,84 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$5,41-15,86$], $12,24 \pm 5,76$ [$6,00-21,37$] e $33,48 \pm 8,62 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$27,59-48,36$], $28,44 \pm 13,13$ [$18,25-50,23$].

Palavras-chave: leucemia, mercúrio, sangue, plasma.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los metales pesados el mercurio se considera como uno de los contaminantes más peligrosos en el medio ambiente (Granadillo, 2009; Son, Lee, Paek & Lee, 2009; Vesterberg, 1991; Galignani, Bahsas, Brunetto, Burguera & Petit de Peña, 1998; Leermakers, Baeyens, Quevauviller & Horvat, 2005) no solo por la gravedad de las enfermedades que causa sino por los efectos irreversibles que provoca en los seres humanos (Bello *et al.*, 2005). La toxicidad del mercurio depende de su forma química (Li *et al.*, 2008; Marcano & Troconis, 2001; Issaro, Abi-Ghanem & Bermond, 2009). Se puede

encontrar en tres formas básicas: mercurio elemental (Hg^0) conocido como mercurio metálico (como en los termómetros y amalgamas y en las actividades mineras de oro) (Vupputuri *et al.*, 2005) mercurio inorgánico (Ino-Hg), principalmente cloruro de mercurio (como en los cosméticos, los laxantes y antisépticos) y mercurio orgánico, básicamente metilmercurio (Met-Hg) o etilmercurio (Et-Hg) se produce a través del consumo de mariscos y crustáceos, y de algunos peces de agua dulce contaminadas y las vacunas que contienen timerosal respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2009).

En diferentes estudios se ha demostrado que la exposición a altos niveles de metilmercurio afecta negativamente la función neurológica, renal, inmunes, sexuales, entre otras; pero poco se sabe sobre el potencial de inducir a otros efectos adversos para la salud (Rodrigues *et al.*, 2009). Algunos informes en animales y humanos sugieren que la exposición al metilmercurio puede afectar a la variabilidad del ritmo del corazón, enfermedad cardíaca y la presión arterial, sin embargo, los datos son limitados (Vupputuri *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de la diferencia de toxicidad relacionada con la forma de mercurio, la concentración de mercurio total en la sangre es por lo general utilizada para estimar los resultados clínicos después de la exposición al mercurio.

Entre las técnicas analíticas para la determinación de mercurio se encuentran la espectrometría de absorción atómica y atomización electrotrémica (ETAAS), espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS), (Galignani *et al.*, 1998; Marcano & Troconis, 2001; Caldwell *et al.*, 2009) cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (CG-MS), el plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas (ICP-MS) (Nixon, Burritt & Moyer, 1999; Rosen & Hieftje, 2004) entre otras.

Por otra parte, la proporción entre las formas químicas de mercurio en la sangre puede variar entre los individuos. Esto hace que sea indispensable contar con métodos analíticos, basados en el análisis de especiación que puede diferenciar entre las formas químicas en la sangre para el diagnóstico de los riesgos (Rodrigues *et al.*, 2009).

El análisis de especiación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas resulta más apropiada para la separación de especies polares, lo que supone una ventaja en la especiación de Hg inorgánico y orgánico (Cámara & Madrid, 2005). Además, proporciona convenientes avances, tanto en la sensibilidad así como en la selectividad, detección, y la alta capacidad de multi-isótopos para el análisis de bajas concentraciones del Hg en muestras ambientales y de sangre (Nash & McSheehy, 2007; Monperrus *et al.*, 2005; Fernández 2017).

1.1. Leucemia

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos, por células neoplásicas del sistema hematopoyético. Son enfermedades neoplásicas que se deben a mutación somática de la célula progenitora, según su estirpe celular afectada, ya sea la línea mieloide o la linfoide. Incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas y respuestas al tratamiento (Mckenzie, 2000; Ortega, Osnaya & Rosas, 2007).

La enfermedad se clasifica en dos amplios grupos con base en la agresividad de la enfermedad: 1) aguda, la cual si no se trata provoca rápidamente la muerte, en el transcurso de meses, 2) crónica, una variante menos agresiva que si no se trata causa la muerte en meses a años. Estos dos grupos principales se clasifican en mieloides o linfoides de acuerdo al origen de la célula progenitora leucémica. Si predominan células mielocíticas u otras células derivadas de la célula progenitora UFC-GEMM la enfermedad se llama leucemia mielogena. Si predominan las células linfoides la enfermedad se llama leucemia linfocítica. Por tanto, con el uso de estos dos sistemas de clasificación que vinculan la agresividad de la enfermedad y el origen de la célula, se reconocen cuatro tipos de leucemia: leucemia mieloblástica aguda (LMA) (a veces conocida como leucemia no linfocítica aguda), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC) (Ortega et al., 2007).

1.2. Mercurio

El mercurio, no es un elemento esencial, es un inhibidor de las reacciones de enzimas catalizadas y la síntesis de proteínas (Aschner & Aschner, 1990). El mercurio se encuentra en forma elemental o formando parte de compuestos inorgánicos y orgánicos; cada una de estas formas posee sus propias cualidades toxicológicas. Los compuestos más peligrosos del mercurio son los alquilmercurio, entre los que predomina el metilmercurio (Florez, Armijo & Mediavilla, 1997).

La elevada toxicidad del mercurio se debe a su gran afinidad con los grupos –SH presentes en las proteínas del organismo; de este modo se fija a membranas e inactiva múltiples enzimas de los seres vivos. La estructura molecular de cada compuesto de mercurio, su estabilidad en el organismo y sus vías de eliminación conforman sus propiedades toxicológicas, específicas para cada compuesto (Florez *et al*, 1997; OMS, 2013).

1.3. Análisis de especiación

El análisis de especiación de muestras clínicas cada vez es más ampliamente aceptado para la nutrición y/o efectos toxicológicos. Según la unión internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC son las siglas en inglés de: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), el análisis de especiación se define como el proceso de análisis de identificación y/o cantidades de medida de uno o más formas químicas individuales en una muestra, y la especiación de un elemento se define como la distribución de un elemento entre las especies químicas definidas en un sistema (Rodrigues *et al.*, 2009).

Recientemente, la especiación de mercurio se estableció mediante el acoplamiento de HPLC con espectrometría de absorción atómica (AAS son las siglas en inglés de: *Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES son las siglas en inglés de: *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer*), plasma inducido por microondas con flujo de argón (MIP son las siglas en inglés de: *Microwave Induced Plasma*) e ICP-MS. Aunque los detectores de la ICP-OES, MIP e ICP-MS tienen capacidades analíticas únicas para la especiación, la instrumentación, y los costos de las mediciones analíticas les dificulta el ser adaptados como los detectores comunes de cromatografía (Gallignani *et al.*, 1998; Castilhos *et al.*, 2006).

Rodrigues *et al.* (2009) utilizaron un método simple para la determinación de Met-Hg y Hg inorgánico en sangre usando cromatografía líquida con espectrometría con plasma acoplado inductivamente (LC-ICP-MS) y un procedimiento rápido para la preparación de la muestra. La extracción de las especies de mercurio se realizó usando una columna cromatográfica C18 de fase reversa empleando como fase móvil mercaptoetanol al 0,05%, L-cisteína 0,4%, acetato de amonio 0,06 M y metanol al 5%. Los límites de detección del método fueron $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el mercurio inorgánico y el metilmercurio, respectivamente.

En el presente trabajo, se realizó la determinación analítica de los niveles de mercurio, así como sus especies químicas (Hg^{2+} y $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$) en sangre completa y plasma de pacientes afectados por la leucemia e individuos sanos utilizando la cromatografía acoplada a la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo

La recolección de muestras de sangre se realizó a través de un muestreo aleatorio con 5 personas controles y 34 pacientes de leucemia del Instituto Hematológico de Occidente de Maracaibo, Venezuela, provenientes la gran mayoría de la ciudad de Barquisimeto. Se seleccionaron 5 personas controles que no estaban en contacto con este metal y así establecer el grado de exposición e intoxicación con el mercurio en los individuos expuestos. A cada individuo control se le extrajo 6 mL de sangre vía venosa, se tomaron con jeringas desechables y se colocaron en tubos de polipropileno con tapas a presión, que contenían 0,13 mL de EDTA al 10% para las determinaciones de mercurio. Las muestras de sangre completa se centrifugaron a aproximadamente 5500 rpm durante 15 min para obtener el plasma y las células sanguíneas. Las muestras colectadas fueron refrigeradas a 4 °C hasta el momento de su análisis.

3.2. Materiales y Equipos

Todas las medidas se realizaron con un ICP-MS Agilent modelo 7500 equipado con un muestreador automático modelo ASX-500 Series para la determinación de Hg total y la especiación. Para el tratamiento de las muestras se utilizó un Agitador Vortez–Genre modelo K500 – G (Fisher Scientific) y una Centrifugadora DINAC marca Clay Adams modelo 101. Para la especiación se utilizó un HPLC modelo Agilent 1200 con una columna de fase reversa (XDB-C18, 5µm, 150mm x 4,6 mm, Zorbax Eclipse Columns Agilent, USA). Centrifugadora marca Labnet para la extracción de las muestras. En la **Tabla 1** se muestran las condiciones iniciales de operación del HPLC-ICP-MS.

3.3. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las soluciones stock de Hg^{+2} (ca. 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y CH_3Hg^+ (ca. 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se prepararon gravimétricamente a partir de cloruro de mercurio (Merck) y cloruro de metilmercurio (Riedel de Haen, Seelze, Germany) disolviendo 0,125 g en 10 mL de HNO_3 al 10% (v/v). Se preparó ácido nítrico (Merck) al 2% usado para los patrones de la curva de calibrado. Para aforar las muestras mineralizadas se utilizó agua desionizada grado I ASTM con valores de resistencia eléctrica $>16.6 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ a 25°C.

Los reactivos adicionales para el estudio de especiación fueron: ácido etilendiaminotetracético (EDTA) Riedel-de Haen (Alemania), metanol de grado HPLC (99,8% v/v), 2- mercaptoetanol Merck (99%), Acetato de amonio Merck (98%).

Se aplicó el test estadístico de la t de student para la comparación de concentraciones en diferentes partes de ese estudio.

Tabla 1. Condiciones de trabajo empleadas en HPLC-ICP-MS para la separación y cuantificación de algunas especies de mercurio en sangre completa y plasma.

Parámetros de ICP-MS	Datos
Potencia (Rf)	1400W
Nebulizador	Concéntrico
Velocidad de la bomba del nebulizador (rpm)	0,4
Flujo del plasma (L.min ⁻¹)	14,5
Flujo de gas de arrastre (L.min ⁻¹)	0,9
Flujo de gas de enfriamiento (L.min ⁻¹)	0,17
Isótopo monitoreado	²⁰² Hg
Método de adquisición de la data	Spectrum
Parámetros de HPLC	
Columna	C ₁₈
Fase Móvil	2-Mercaptoetanol, acetato de amonio, EDTA, metanol
Composición de la fase móvil	0,1%, 0,06M, 2mM, 3%
Caudal de flujo	1 mL.min ⁻¹
Modo de elución	Isocrático
Volumen de inyección	50 µL
Método de adquisición de la data	Análisis de tiempo de resolución

3.4. Determinación de mercurio total en sangre

Para la determinación de Hg total en sangre se realizó la digestión en medio básico de 0,5 mL de sangre con dos gotas de octanol, 2 mL de hidróxido de amonio 1M, 4 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un baño con hielo, este último es un agente oxidante que acelera la digestión de las muestras orgánicas elevando la temperatura. Este procedimiento produce soluciones claras de las muestras sin partículas disueltas o capas grasosas. Luego se aforaron a 10 mL con agua desionizada en balones y se analizaron utilizando ICP-MS por triplicado. En la determinación de mercurio total se monitoreo el isótopo más abundante, estable y libre de interferencia como ²⁰²Hg. Este procedimiento es rápido y por lo tanto susceptible para la preparación de muestras en las que se analizan elementos volátiles tales como el Pb y el Hg.

3.5. Determinación de mercurio total en plasma

Para la determinación de Hg total en plasma se realizó la digestión en medio básico de 0,1 mL de sangre con 400 µL de hidróxido de amonio 1 M, 800 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 2 gotas de octanol en un baño con hielo. Luego se transfirieron a balones de 10 mL y se aforaron con agua desionizada. Se analizaron por ICP-MS por triplicado. En la determinación de mercurio total se monitoreo el isótopo más abundante, estable y libre de interferencia como ²⁰²Hg.

3.6. Tratamiento de las muestras para el análisis de especiación

Para la extracción del mercurio que contienen las muestras se tomaron 250 μ L de sangre y se colocó en tubos de polipropileno con 4,75 mL de una solución que contenía: L-cisteína al 0,05%, HCl al 0,1%, 2-mercaptoetanol al 0,1% y fue sonificada en un baño de ultrasonido por 15 min. Las soluciones resultantes fueron centrifugadas a aproximadamente 5000 rpm durante 15 min y filtradas. La extracción de la muestra se realizó por triplicado y los blancos de la extracción fueron preparados de la misma manera.

3.7. Determinación de las especies de mercurio

Se utilizó una fase móvil propuesta en el método descrito por Colina, Gardiner, Rivas & Troncone (2011), utilizando acetato de amonio 0,06M, 2-mercaptoetanol al 0,1%, metanol al 3% y EDTA 0,002 M como eluente. La identificación y cuantificación de las especies de Hg se logró mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

Ambos métodos fueron validados y optimizados a través de la medición de los parámetros analíticos: exactitud, precisión, interferencias, límites de detección y cuantificación, sensibilidad instrumental y aplicabilidad, entre otros.

Para evaluar la precisión del método, se inyectó al sistema una muestra (3 réplicas) las cuales se midieron por triplicado y de esta forma la desviación estándar relativa de las medidas se tomó como la precisión. Por su parte para la exactitud se prepararon disoluciones de concentración conocida y se inyectaron en el sistema cromatográfico para así obtener el porcentaje de recuperación. Se utilizó la prueba estadística t de student para la comparación de medias

4. RESULTADOS

4.1. Parámetros analíticos para la determinación de mercurio total:

La curva de calibración para la determinación de mercurio total tuvo un coeficiente de correlación aceptable para la determinación: $y = 2046,3 - 2592,9X$; ($R^2 = 0,997$). Estos resultados permitieron la determinación analítica del Hg total en las diferentes muestras clínicas empleadas usando ICP-MS con buenos límites de detección y de sensibilidad. El límite de detección calculado por Miller & Miller (2002) encontrado para la determinación de Hg en sangre completa y plasma fue de 1,39 μ g Hg.L⁻¹ y el límite de cuantificación de 1,39 μ g Hg.L⁻¹ con una sensibilidad instrumental 88,94.

4.1.1 Exactitud y precisión del método

En la **Figura 1** se presentan la curva de calibración y las de adición estándar para cada muestra. Se observó paralelismo entre las pendientes obtenidas para Hg tanto en las curvas de calibración como en la adición estándar, lo que indicó la ausencia de interferencias no espectrales en las determinaciones de mercurio en las muestras de sangre. Al comparar las pendientes de la curva de calibración y adición estándar obtenidas para mercurio se obtuvieron porcentajes de error menores al 5%, lo cual evidencia la ausencia de interferencias no espectrales.

Los estudios de recuperación se realizaron en muestras reales de sangre a las cuales se le agregaron cantidades conocidas de patrón, donde se obtuvo una recuperación entre 91 y 97% del analito.

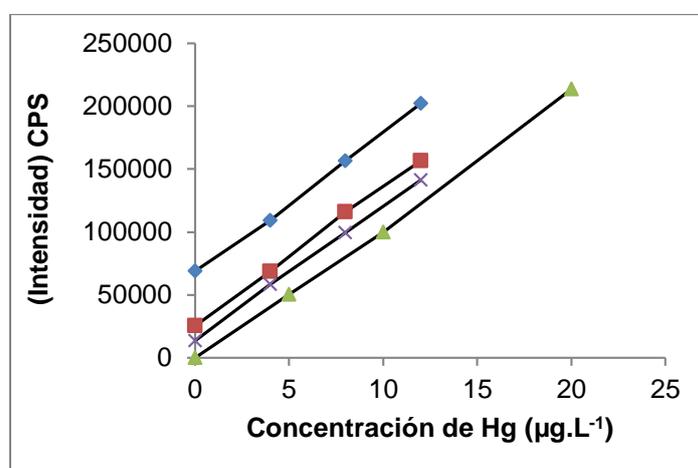


Figura 1. Gráfica del estudio de interferencias por adición estándar.

El estudio de precisión del método desarrollado para la determinación de Hg en sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia, se realizó en muestras reales diluidas, los valores de precisión, como desviación estándar y desviación estándar relativa, obtenidos en la corrida y entre corrida para la determinación de mercurio en sangre completa. Para este estudio se utilizaron 3 muestras de sangre preparadas por triplicado. Los resultados muestran una buena precisión, con una desviación estándar relativa promedio para muestras de sangre de 4,39%, entre corrida y 0,22% en la corrida, respectivamente. El método propuesto estuvo libre de interferencias, es confiable, reproducible y puede ser utilizado para la determinación del mercurio en muestras de sangre completa.

4.1.2. Optimización de la digestión en medio básico de las muestras de sangre completa

Se evaluó la digestión en medio básico de las muestras de sangre con diferentes volúmenes y concentraciones de hidróxido de amonio y peróxido de hidrógeno. Se dejó constante la cantidad de sangre y de octanol añadida, 0,5 mL y dos gotas, respectivamente. Se observó que con 2 mL de NH_4OH y 4 mL de H_2O_2 se obtuvieron los mejores resultados (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados obtenidos en la optimización de la digestión para la determinación de mercurio total en sangre.

Concentración NH_4OH (mol.L^{-1})	Volumen (ml) de ($\text{NH}_4\text{OH}/ \text{H}_2\text{O}_2$)	Concentración de Hg
		($\mu\text{g.L}^{-1}$) $\bar{X} \pm \text{DE}$
1	2/4	64,97 \pm 1,6
	4/4	55,36 \pm 2,5
	2/6	56,68 \pm 4,0
	4/6	53,07 \pm 3,3
2	2/4	57,83 \pm 2,1
	4/4	58,53 \pm 1,9
	2/6	55,34 \pm 3,6
	4/6	53,24 \pm 2,6

El octanol se añadió antes de la adición del oxidante para evitar la formación de espuma. La producción de oxígeno gaseoso y de las especies de CO_2 durante la oxidación de la muestra podría explicar la formación de espuma. Además de combatir la espuma este alcohol reduce la tensión superficial de esta solución (Biasino, Domínguez & Alvarado, 2007).

4.2. Concentraciones de mercurio en sangre y plasma de los pacientes con leucemia y los individuos controles

La **Tabla 3** muestra las concentraciones de mercurio total en pacientes con leucemia e individuos controles. Para los pacientes con leucemia se encontró una concentración promedio de mercurio en sangre de $16,889 \pm 8,759 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$8,22 - 45 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] y $25,36 \pm 11,41 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$10,6 - 40,87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] para la población control. No existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre la concentración de mercurio en sangre de los pacientes con leucemia y la población control, lo cual nos indica que el Hg podría no tener relación con la aparición de la enfermedad.

Al comparar los resultados encontrados de sangre completa con los descritos por Granadillo (2009), se encontró que existen diferencias significativas ($P < 0,05$), lo cual se deduce que estos individuos controles estuvieron más expuestos a este metal. Se debe tomar en cuenta

que las muestras analizadas en este estudio provinieron de la ciudad de Barquisimeto y las evaluadas por Granadillo (2009) fueron pacientes y controles de la ciudad de Maracaibo.

Tabla 3. Comparación entre la concentración de mercurio en sangre completa y plasma de pacientes con leucemia e individuos controles.

Tipo de muestra	Pacientes con leucemia (n=34) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$	Individuos Controles (n=5) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$
Sangre completa	$16,89 \pm 8,76$	$25,36 \pm 11,41$
Plasma	$25,77 \pm 5,12$	$74,46 \pm 16,09$

Granadillo (2009) encontró que el nivel de mercurio promedio en sangre era de $13,5 \pm 3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (intervalo experimental $9,5-17,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) para 32 pacientes con leucemia. Este fue el único estudio encontrado en pacientes con leucemia. Araragi *et al.* (2003), determino en un estudio con 380 dentistas que la concentración promedio era de $8,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ y el 7,4% de la población estudiada presentaba niveles superiores a $15 \mu\text{g.L}^{-1}$. En este estudio el 91% de la población estudiada presentó niveles superiores a 10 ppb en sangre y plasma indicando que se encuentran bajo riesgo toxicológico. En la ciudad de Maracaibo estuvo establecida por más de 30 años una planta de Clorosoda que utilizaba mercurio en sus celdas.

Estudios realizados por Chen *et al.* (2005) encontraron un alto contenido de Hg en personas laboralmente expuestas y habitantes de una zona de alta polución en la República Popular China. Estos investigadores señalaron valores 60 veces más altos en el grupo expuesto ($60,8 \pm 70,2 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$) en comparación al grupo control ($0,91 \pm 0,28 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$). De igual manera, Silva *et al.* (2004) observó un promedio de $31 \mu\text{g}$ de Hg.L^{-1} ($4-130 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$) en buscadores de oro del río Amazonas brasileño.

Los límites normales marcados por la OMS, los valores de referencia de mercurio en individuos no expuestos son inferiores a $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ en sangre total (Morales & Reyes, 2003) y para personas sin consumo de pescado con altas concentraciones de mercurio, es del orden de 5 a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Las diferencias encontradas en los niveles de mercurio sanguíneo parecen ser que la población control trabajó en laboratorios de química y también se encontró que la mayoría de estos tenían amalgamas. El mercurio presente en las amalgamas dentales se encuentra en su forma metálica que es poco tóxica. Sin embargo, este metal se evapora a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, presentándose como vapor de mercurio que es muy tóxico.

Considerando que, al tomar bebidas calientes como café, té o chocolate, las temperaturas en la boca pueden llegar a 40 y 60 °C, puede esperarse la liberación del vapor de mercurio cada cierto tiempo, exponiendo al paciente a una exposición crónica, este hecho fue evaluado experimentalmente y se comprobó que existía un aumento de la tasa de evaporación (Hursh *et al.*, 1976).

Estudios realizados por Morales & Reyes (2003), revelaron que existe una fuerte correlación entre los valores de mercurio en plasma, sangre total, orina y el número de amalgamas presentes en la cavidad bucal de 244 personas que trabajan en una unidad odontológica. En Brasil se encontró una concentración de mercurio en la sangre promedio de la población control (N=17) de 26,8 µg.L⁻¹.

Las concentraciones de Hg promedios encontrados en plasma de los pacientes de leucemia fue 25,77 ± 5,12 µg Hg.L⁻¹ [17,52 – 32,48 µg Hg.L⁻¹] y para los controles 74,46 ± 16,09 [64,38 – 102,82 µg Hg.L⁻¹]. Al comparar estas medias experimentales se encontró que presentaron diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) lo que nos indica que la población control está expuesto en mayor grado al tóxico que los pacientes con leucemia.

En este trabajo no se encontró contribución de la aparición de la leucemia con el aumento de los niveles de Hg total en sangre y plasma encontrados en los pacientes con leucemia, al igual que lo encontró Granadillo (2009), quien no encontró diferencias significativas entre los niveles de Hg en los pacientes con leucemia y los individuos controles por lo que no se encontró ninguna relación con la enfermedad. Sin embargo, los resultados obtenidos son de importancia y deben ser tomados en cuenta para estudios posteriores.

Wilhelm *et al.* (1996), encontraron valores en mercurio total sanguíneo 1,5 veces más elevados en mujeres que en hombres, además encontraron una mayor concentración de mercurio en sangre en la población de 15 hombres que en las mujeres (N=28). En todo caso, los datos son contradictorios, atribuyen la diferencia que se encuentran entre los hombres y mujeres al mayor consumo de pescado por parte de los hombres en su grupo de trabajo. La distribución de la población estudiada, según los valores de total Hg-S (Hg-Sangre) y Hg-P (Hg-Plasma) de acuerdo al sexo se registra en la **Tabla 4**. La media de Hg-S del grupo de los varones evaluado fue (16,08 ± 7,85), y en las hembras (18,68 ± 10,05) µg.L⁻¹, la media de Hg-S en las hembras fue significativamente superior (P<0,05) que la media de Hg-S observada en las varones.

Tabla 4. Distribución de los pacientes con leucemia estudiados según los valores de Hg-S y Hg-P, de acuerdo al sexo.

Sexo	n	%	Hg-S (ug.L ⁻¹)		Sexo	n	%	Hg-P (ug.L ⁻¹)	
			X ± DE					X ± DE	
M	21	61,76	16,08 ± 7,85		M	7	70	20,02 ± 3,57	
F	13	38,24	18,68 ± 10,05		F	3	30	26,87 ± 5,51	
Total	34	100	16,889 ± 8,759		Total	10	100	25,77 ± 5,12	

Significación estadística de la diferencia entre las medias considerando el sexo, establecido a través de la prueba t-Student para muestras independientes.

Hg-S: mercurio total en sangre; Hg-P: mercurio total en plasma

4.3. Especiación de mercurio

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron una fase estacionaria enlazada al octadecilsilano de 5 µm y como fase móvil una solución que contenía: Acetato de amonio 0,06 M, EDTA 2 mM, 2- mercaptoetanol 0,1% y metanol al 3%, a un flujo constante de 1ml.min⁻¹, en modo isocrático. La identificación y cuantificación de las especies de Hg se logró mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

4.3.1. Optimización de los parámetros operacionales

En las **Figuras 2 y 3** se muestran los cromatogramas correspondientes a las especies de mercurio Hg⁺² y CH₃Hg⁺ respectivamente, obtenidos a partir de soluciones de 100 ppb. Como se puede observar tanto el CH₃Hg⁺ como el Hg⁺² presentan un rango de respuesta lineal lo suficientemente amplio para una buena cuantificación, así como también una alta simetría en las señales cromatográficas, lo que refleja una buena selectividad del sistema cromatográfico.

Los estudios se iniciaron con una fase móvil compuesta por 0,06 M de acetato de amonio esta concentración se fijó ya que es capaz de mantener un pH favorable de 6,5, también se fijó en 0,1% de 2-mercaptoetanol como un compromiso entre la selectividad y el tiempo de retención. Por otra parte, se evaluaron diferentes concentraciones de metanol en la fase móvil y se varió entre 3% y 5%. Las concentraciones superiores al 5% no fueron evaluadas ya que conducen a la inestabilidad del plasma y a un aumento en los residuos de carbón en los conos. Luego se añadió un cuarto componente el EDTA 2 mM un agente quelante utilizando el metanol al 3% obteniendo una separación completa entre el CH₃Hg⁺ y el Hg⁺².

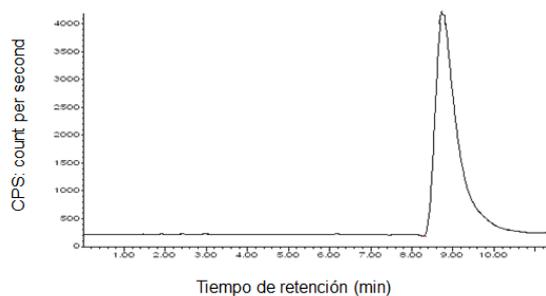


Figura 2. Cromatograma obtenido para Hg^{+2} (100 ppb) donde se observa valores adecuados de intensidad y tiempo de retención para esta especie.

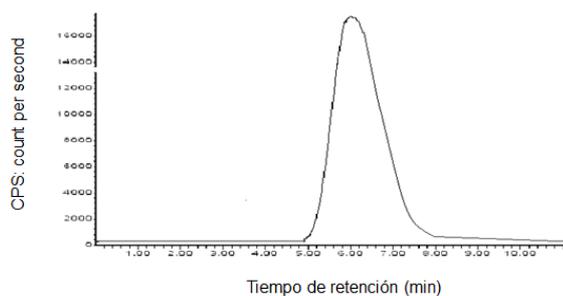


Figura 3. Cromatograma obtenido para una solución de CH_3Hg^+ (100 ppb) donde se observa valores adecuados de intensidad y tiempo de retención para esta especie.

Los estudios se iniciaron con una fase móvil compuesta por 0,06 M de acetato de amonio esta concentración se fijó ya que es capaz de mantener un pH favorable de 6,5 también se fijó en 0,1% de 2-mercaptoetanol como un compromiso entre la selectividad y el tiempo de retención. Por otra parte, se evaluaron diferentes concentraciones de metanol en la fase móvil y se varió entre 3% y 5%. Las concentraciones superiores al 5% no fueron evaluadas ya que conducen a la inestabilidad del plasma y a un aumento en los residuos de carbón en los conos. Luego se añadió un cuarto componente el EDTA 2 mM un agente quelante utilizando el metanol al 3% obteniendo una separación completa entre el CH_3Hg^+ y el Hg^{+2} .

Como se puede apreciar en la **Figura 3**, el CH_3Hg^+ presenta un menor tiempo de retención con respecto al Hg^{+2} esto es debido a la afinidad que presenta la fase estacionaria con los distintos iones, ya que la fase estacionaria es capaz de aumentar la retención de las especies a medida que se incrementa la relación carga/masa de éstos; por tanto disminuye el radio de hidratación y aumenta la polarizabilidad induciendo un dipolo y la atracción sobre la resina.

En la **Figura 4** se muestra una buena separación de las especies de mercurio usando una solución de metilmercurio y mercurio inorgánico (15 ppb). En la **Figura 5** se observa la separación cromatográfica para una muestra real de sangre completa.

En la **Tabla 5** se observan los valores de los parámetros cromatográficos como lo son: tiempo de retención, factor de retención, número de platos teóricos, factor de selectividad y resolución de la columna.

Los valores de K' y de los tiempos de retención demuestran una elución eficiente en términos de tiempo, los resultados de la resolución (R_s) muestran también un grado de separación correcta de los analitos ya que presentan valores por encima de 1,5 del mismo

modo los resultados en cuenta al factor de selectividad (α) demuestran que esta resultado efectiva para la separación de las dos especies de mercurio corroborando la eficiencia de la separación cromatográfica.

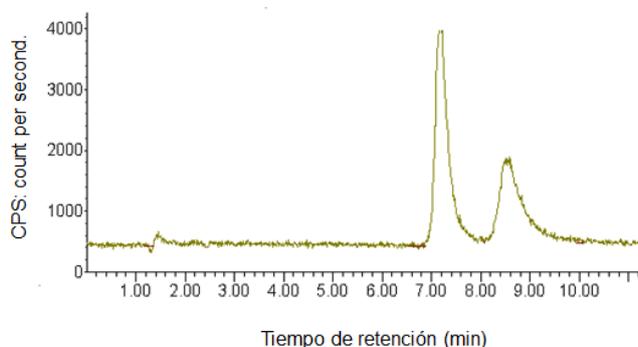
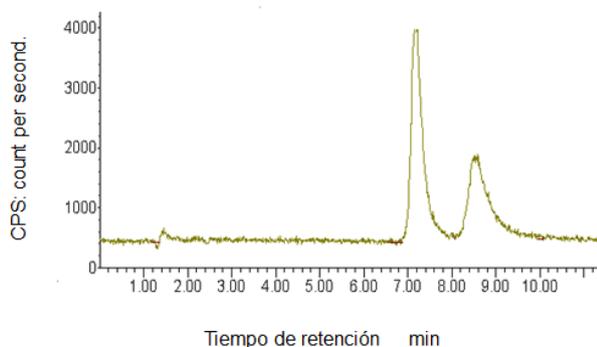


Figura 4. Cromatograma obtenido para una mezcla de CH_3Hg , Hg^{+2} (15 ppb c/u) donde se observan valores adecuados para la intensidad (CPS) y el tiempo de retención (min).

Figura 5. Cromatograma obtenido para las especies de mercurio en una muestra real de sangre completa.

4.3.2. Parámetros analíticos en el análisis de especiación

Las curvas de calibración para las especies Hg^{+2} ($y = 199,67X + 0$) ($R^2 = 0,9996$) y CH_3Hg^+ ($y = 369,78X + 194,44$) ($R^2 = 0,9971$) resultaron aceptables. Con límites de detección, cuantificación y sensibilidad de la metodología también aceptables: Para Hg^{+2} , LD: $0,53 \mu\text{g.L}^{-1}$, Lq: $0,53 \mu\text{g.L}^{-1}$, sensibilidad: 199,67 y para CH_3Hg^+ , LD: $0,70 \mu\text{g.L}^{-1}$, Lq: $0,71 \mu\text{g.L}^{-1}$, sensibilidad: 369,78.

Tabla 5. Parámetros cromatográficos para la separación de las especies de Hg estudiadas a una concentración de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ c/u utilizando una columna C_{18} , fase móvil acetato de amonio 0,06 M, EDTA 2 mM, 2- mercaptoetanol 0,1% y metanol al 3%, a un flujo de 1ml.min^{-1} .

Especie	Tiempo de retención (min)	Factor de retención (K')	Número de platos teóricos (N)	Factor de selectividad (α)	Resolución (R_s)
Hg^{+2}	8,76	5	71	1,26	1,77
CH_3Hg^+	7,24	3,96	117		

Los estudios de recuperación y de precisión se realizaron en muestras reales de sangre a las cuales se le agregaron cantidades conocidas de patrón (20 ppb), donde se obtuvo una

recuperación entre 97 y 98% del analíto las cuales fueron leídas por triplicado, estos resultados fueron favorables lo que indica que es un método confiable, reproducible y puede ser utilizado para la determinación de las especies de mercurio en muestras de sangre completa y plasma.

4.4. Concentraciones de mercurio inorgánico y mercurio orgánico en sangre y plasma de los pacientes con leucemia y los individuos controles

Se analizaron 5 muestras de sangre y 5 de plasma de pacientes con leucemia y de población control. Los resultados obtenidos en los análisis de especiación de mercurio realizados se muestran en la **Tabla 6**, donde todas las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Asimismo, se indican los valores promedio y la desviación estándar calculados de las especies de mercurio en plasma y sangre.

Las concentraciones de Hg^{+2} encontradas en la sangre de los pacientes con leucemia fue de $8,16 \pm 1,67$ [$6,96-10,97 \mu\text{g.L}^{-1}$] y para los controles $10,04 \pm 3,84$ [$5,41-15,86 \mu\text{g.L}^{-1}$]. Estas medias experimentales fueron comparadas encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Asimismo, las concentraciones encontradas de CH_3Hg^+ en sangre de pacientes con leucemia y la población control no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el caso de las concentraciones de CH_3Hg^+ y Hg^{+2} en plasma de los pacientes con leucemia al ser comparadas con las de la población control presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Tabla 6. Concentraciones de Hg^{+2} y CH_3Hg^+ en sangre y plasma de pacientes con leucemia e individuos controles.

Tipo de muestra	Pacientes con leucemia (n=5) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$		Individuos Controles (n=5) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$	
	Hg^{+2}	CH_3Hg^+	Hg^{+2}	CH_3Hg^+
Sangre completa	$8,16 \pm 1,67$	$9,85 \pm 6,22$	$10,04 \pm 3,84$	$12,24 \pm 5,76$
Plasma	$11,47 \pm 4,33$	$11,28 \pm 5,40$	$33,48 \pm 8,62$	$28,44 \pm 13,13$

Es probable que la mayor cantidad de mercurio encontrada en el plasma se debe a que la cantidad de proteínas totales del plasma es alrededor de 7 g a 7,5 g/100 mL de sangre y ellas constituyen la mayor parte de los sólidos del plasma (Harper, 1966).

El CH_3Hg^+ se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre con pequeñas variaciones entre los individuos, y parte del Hg^{+2} que se encuentra en los glóbulos rojos suele atribuirse a la de-metilación del CH_3Hg^+ . En la sangre más del 90% de CH_3Hg^+ se une a la hemoglobina en los glóbulos rojos, mientras que el Hg^{+2} se distribuye en el plasma y en los glóbulos rojos. Por lo tanto, el total de Hg en la sangre se utiliza a veces como una medida de la exposición de CH_3Hg^+ y el total de Hg en el plasma se utiliza como medida indirecta de la exposición a Hg^{+2} (Vesterberg, 1991).

En la literatura consultada no se encontró información sobre los valores de referencia para el Hg^{+2} y el CH_3Hg^+ presentes en la sangre.

5. CONCLUSIONES

A lo largo de la investigación realizada se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Las características analíticas evaluadas muestran que el método desarrollado para la determinación de mercurio total en sangre y plasma es confiable.

No se encontró ninguna relación entre las concentraciones totales de mercurio ni en las de sus especies en sangre completa y plasma con la leucemia.

Para la determinación de las especies estudiadas de mercurio en la sangre y plasma el método desarrollado es confiable y reproducible, con un límite de detección para las especies químicas de Hg estudiadas en sangre y plasma aceptables.

6. REFERENCIAS

- Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M. & Sato, M. (2003). "Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial- dependent pathway in human leukemia cells". *Toxicology*, 184, 1-9.
- Aschner, M. & Aschner, J.L. (1990). "Mercury Neurotoxicity: Mechanisms of Blood-Brain Barrier Transport". *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14, 169-176.
- Bello, S.C., Rodríguez, M.C., Fernández, D.R., Vásquez, A., Ocando, A.M., Contreras, J.R., Berglund, M., Lind, B., Bjornberg, K., Palm, B., Einarsson, O. & Vahter, M. (2005). "Interamericano de las variaciones individuales de la exposición al mercurio biomarcadores: una evaluación transversal". *Environmental Health*, 4, 20-24.
- Biasino, J., Domínguez, J. & Alvarado, J. (2007). "Hydrogen peroxide in basic media for whole blood sample dissolution for determination of its lead content by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry", *Talanta*, 73, 962-964.

- Caldwell, K.L., Mortensen, M.E., Jones, R.L., Caudill, S.P. & Osterloh, J.d. (2009). "Total blood mercury concentrations in the U. S. population: 1999-2006". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 1-11.
- Cámara, R. C. & Madrid, A. Y. (2005). "Acumulación-interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: Desarrollo de nuevas metodologías de análisis", Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Madrid, España.
- Castilhos, Z.C., Rodrigues-Filho, S., Rodrigues, A.P.C., Villas-Bôas, R.C., Siegel, S., Veiga, M.M. & Beinhoff, C. (2006). Mercury contamination in fish from gold mining areas in Indonesia and human health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 368, 320-325.
- Chen, C. L., Qu, B., Li, L., Xing, G., Jia, T., Wang, Y., Gao, P., Zhang, M., Li, W., Chen Y.Z. & Chai. (2005). "Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations and serum redox status in persons exposed to mercury". *Clinical Chemistry*, 51(4), 759-767.
- Colina, M.N., Gardiner, P.H.E., Rivas, Z. & Troncone, F. (2011). "Mercury Speciation in Lake Maracaibo, Venezuela, Using Reversed Phase HPLC and ICP-MS", *Atomic Spectroscopy*, 32, 1-11.
- Fernández, S. (2017). Nuevos materiales para la especiación de mercurio: biotransformación de metales en organismos modelo. Tesis Doctoral, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, ESPAÑA. <http://eprints.ucm.es/45630/1/T39427.pdf>.
- Florez, J., Armijo, J.A. & Mediavilla, A. (1997). *Farmacología Humana*, 3era edición, Masson, S.A., Barcelona, España, pp 1007-1014.
- Galignani, M., Bahsas, M.R., Brunetto, M.R., Burguera, J.L. & Petit de Peña, Y. (1998). "A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine". *Analytica Chimica Acta*, 369, 57-67.
- Granadillo, M. (2009). "Desarrollo metodológico para la especiación de metales en muestras de sangre de pacientes con Leucemia o Linfoma", Tesis Doctoral, Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumentación Analítica y Química Ambiental, Maracaibo, pp 37.
- Harper, H. (1966). *Manual de Química Fisiológica*, 1era edición, El manual moderno, S.A., México 11, D.F, pp 145.
- Hursh, J.B., Clarkson, T.W., Cherian, M.G., Vostal, J.V. & Mallie, R.V. (1976). "Clearance of mercury (Hg-197, Hg-203) vapor inhaled by human subjects". *Archives of Environmental & Occupational Health*, 31, 302-309.
- Issaro, N., Abi-Ghanem, C. & Bermond, A. (2009). "Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction", *Analytica Chimica Acta*, 631, 1-12.
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P. & Horvat, M. (2005). "Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation", *TrAC Trends Analytical Chemistry*, 24 (5), 383-393.
- Li, Y., Chen, C., Li, B., Li, W., Qc, L., Dong, Z., Nomura, M., Gao, Y., Zhao, J., Hu, W., Zhao, Y. & Chai, Z. (2008). "Mercury in human hair and blood samples from people living in Wanshan mercury mine area, Guizhou, China: An XAS study", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 500-506.
- Marcano, V. & Troconis, A.R. (2001). "Evaluación del contenido de mercurio en el pescado expendido en la ciudad de Mérida, Venezuela". *Revista de Ecología Latinoamericana*, 8(2), 15-24.
- Mckenzie, S.B. (2000). *Hematología Clínica*, 2da edición, México: Editorial El Manual Moderno S.A., pp 3,4.
- Miller, J.N. & Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ta edición, Prentice Hall, Madrid, España, pp 44-46, 126.
- Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D. & Donard, O. (2005). Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 854-862.
- Morales, I. & Reyes, R. (2003). "Mercurio y salud en la odontología". *Revista de Saúde Pública*, 37, 266-272.

Determinación de los Niveles de Mercurio en Sangre y Plasma de Pacientes con Leucemia

- Nash, M. & McSheehy, S. (2007). Isotopic Analysis, Laboratoire de Chimie-Analytique, Biologique et Environnement, University of Pau, France. The Speciation of Mercury in Biomedical and Environmental Samples using HPLC coupled to the XSERIES 2 ICP-MS, Part of Thermo Fisher Scientific, Application note: 40782.
- Nixon, D.E., Burritt, M.F. & Moyer, T.P. (1999). "The determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B*, 54, 1141-1153.
- Organización Mundial de la salud (OMS). (2013). Efectos de la exposición al mercurio en la salud de las personas que viven en comunidades donde se practica la minería aurífera artesanal y en pequeña escala. Ginebra, Suiza. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/mercury_asgm_es.pdf
- Ortega, M.A., Osnaya, M.L. & Rosas, J.V. (2007). "Leucemia linfoblástica aguda". *Medicina Interna de México* 23, 26-33.
- Rodrigues, J.L., De Souza, S.S., De Oliveira, V.C. & Barboza, F. (2009). "Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure". *Talanta*, 1-6.
- Rosen, A. L. & Hieftje, G. M. (2004). "Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation". *Spectrochimica Acta, Part B*, 59, 135-146.
- Silva, I., J. Nyland, A. Goman, A. Perisse, A. Ventura, C. Santos, J. De Souza, C. Bureo, N. Rose Y E. Silbergeld. (2004). "Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in amazon populations in Brazil: a cross-sectional study". *Environmental Health*, 3 (11), 1-12.
- Son, J., Lee, J., Paek, D. & Lee, J. (2009). "Blood levels of lead, cadmium, and mercury in the Korean population: Results from the Second Korean National Human Exposure and Bio-monitoring Examination", *Environmental Research*, 109, 738-744.
- Vesterberg, O. (1991). "Automatic method for quantitation of mercury in blood, plasma and urine", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 23, 227-235.
- Vupputuri, S., Longnecker, M., Daniels, J.L., Guo, X. & Sandler, D.P. (2005). "Blood mercury level and blood pressure among US women: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000", *Environmental Research*, 97, 195-200.
- Wilhelm, M., Muller F. & Idel, H. (1996). "Biological monitoring of mercury vapour exposure by scalp hair analysis in comparison to blood and urine". *Toxicology Letters*, 88, 221-226.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS AUTÓCTONAS EN VIÑEDO DE LA VARIEDAD MALVASÍA BLANCA

Dra. María Berradre^{a*}, Lcda. Luzmila Meza^b, Dr. Braulio Esteve-Zarzoso^c, MSc. Jorge Ortega^d, MSc. Betzabé Sulbarán^a, MSc. Graciela Ojeda^a, MSc. Laura Soto^a, MSc. Mairy Fuenmayor^a

^a Laboratorio de Alimentos. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

^b Laboratorio de Micología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

^c Departament de Bioquímica y Biotecnología. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili. Marcel·lí Domingo s/n, 43007. Tarragona, España.

^d Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

*Autor para la correspondencia. Email: marinaty@gmail.com

Recibido: 8-2-2018 / Aceptado: 30-4-2018

RESUMEN

Se realizó el aislamiento e identificación de levaduras nativas de un viñedo de la especie *Vitis vinifera* variedad Malvasía blanca, en la Región Zuliana. Se muestrearon aséptica y aleatoriamente bayas y partes de la planta (hojas, raquis, corteza y suelo), de un total de 123 plantas, correspondientes a un viñedo de la variedad de uva Malvasía. A aproximadamente a 500m del viñedo, se encuentra la bodega. La identificación de las levaduras aisladas en el viñedo se realizó por técnicas moleculares mediante PCR-RFLP, sometiendo los productos amplificados a un análisis de restricción con las enzimas Hinf I, Hae III, CfoI y DdeI. La distribución de las levaduras en los diversos sustratos fue en el suelo 60% *Hanseniaspora guilliermondii* y 40% *Hanseniaspora uvarum*, en la corteza 90% *Candida sake* y 10% *Hanseniaspora uvarum*, en hojas 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, en raquis 100% por *Aureobasidium pullulans* y en las bayas 96% *Rhodotorula mucilagenosa* y 4% *Aureobasidium pullulans*. En el viñedo están ampliamente difundidos los géneros Ascomycetos *Hanseniaspora*, *Candida* y *Aureobasidium* y el género Basidiomycetos *Rhodotorula*, siendo las levaduras oxidativas *Aureobasidium* y *Rhodotorula* las de mayor difusión en el mismo, sin embargo, cabe destacar la presencia de levaduras fermentativas como los géneros *Hanseniaspora* y *Candida*, importantes levaduras con reconocido potencial enológico, que podrán ser utilizadas en futuras fermentaciones alcohólicas para obtener vinos con calidad única por ser fermentados con levaduras autóctonas adaptadas a clima tropical.

Palabras clave: levaduras autóctonas, variedad Malvasía, PCR-RFLP 5,8S.

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF AUTOCHTHONOUS YEASTS IN THE VINEYARD OF THE MALVASÍA WHITE

ABSTRACT



The isolation and identification of native yeasts from a vineyard of the *Vitis vinifera* white variety Malvasia was carried out in Zulia, Venezuela. Aseptically and randomly, berries and parts of the plant (leaves, rachis, bark and soil) were sampled from a total of 123 plants, corresponding to a vineyard of the Malvasia grape variety. A winery is located at approximately 500 m from the vineyard. The identification of the yeasts isolated in the vineyard was carried out by molecular techniques by PCR-RFLP, subjecting the amplified products to a restriction analysis with the enzymes Hinf I, Hae III, CfoI and DdeI. The distribution of the yeasts in the different substrates was in the soil 60% *Hanseniaspora guillermondii* and 40% *Hanseniaspora uvarum*, in the bark 90% *Candida sake* and 10% *Hanseniaspora uvarum*, in leaves 100% by *Rhodotorula mucilagenosa*, in rachis 100% by *Aureobasidium pullulans* and in berries 96% *Rhodotorula mucilagenosa* and 4% *Aureobasidium pullulans*. In the vineyard, the Ascomycetes type *Hanseniaspora*, *Candida* and *Aureobasidium* and the genus Basidiomycetes *Rhodotorula* are widely spread, with the oxidative yeasts *Aureobasidium* and *Rhodotorula* being the most widespread, however, the presence of fermentative yeasts such as the *Hanseniaspora* and *Candida* genera, important yeasts with recognized oenological potential, which can be used in future alcoholic fermentations to obtain wines with unique quality by being fermented with native yeasts adapted to tropical climate.

Key words: native yeasts, Malvasia variety, PCR-RFLP 5.8S.

ISOLAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS NATIVAS EM VINHEDOS DE VARIEDADE DE UVAS MALVASIA BLANCA

RESUMO

O isolamento e identificação de leveduras nativas de uma vinha da espécie *Vitis vinifera* variedade Malvasia branco foi realizada na região do Zulia. A amostragem foi realizada de forma asséptica e aleatoriamente entre bayas e partes das plantas (folhas, rãquis, casca, solo), um total de 123 plantas, correspondentes a uma vinha Malvasia variedade de uva. Aproximadamente 500 m da vinha, encontra-se armazenadas. A identificação das leveduras isoladas na vinha foram realizadas por meio de técnicas moleculares como PCR-RFLP, submetendo produtos amplificados para análise de restrição com Hinf I, Hae III, CfoI e enzima DdeI. A distribuição de leveduras em vários substratos no solo foram de 60% *Hanseniaspora guillermondii* e 40% *Hanseniaspora uvarum*, na crosta 90% *Cândida sake* e 10% *Hanseniaspora uvarum*, folhas de 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, em raque 100% por *Aureobasidium pullulans*, bayas 96% *Rhodotorula mucilagenosa* e 4% *Aureobasidium pullulans*. Nos gêneros vinhedo Ascomycetes *Hanseniaspora*, *Candida* e *Aureobasidium pullulans* e do gênero Basidiomycetes *Rhodotorula* são generalizadas, assim, a levedura *Aureobasidium* *Rhodotorula* oxidativo foram as de maior difusão, no entanto, incluem a presença de produtos de fermentação de levedura como aquelas dos gêneros *Hanseniaspora* e *Candida*, importantes leveduras enológicas com reconhecido potencial, que podem ser utilizados em fermentações alcoólicas futuras para obter vinhos de qualidade únicas que possam ser fermentados com leveduras indígenas adaptadas ao clima tropical.

Palavras-chave: leveduras autóctones, variedade Malvasia, PCR-RFLP 5,8S.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación del jugo de uva en vino consiste en un complejo proceso bioquímico y ecológico que envuelve el desarrollo secuencial de diferentes especies de levaduras (Beltrán et al., 2002). El origen de la flora natural de levaduras que están involucradas en la elaboración de vino se ha estudiado extensamente, existiendo dos posibles fuentes de

levaduras responsables de la fermentación alcohólica: las provenientes del viñedo y las provenientes de la bodega (Sábate, Cano, Esteve-Zarzoso & Guillamón, 2002; Li *et al.*, 2010). La primera incluye las levaduras provenientes, especialmente de la piel de las uvas y otros órganos de la planta y la segunda incluye los equipos de la bodega (Francesca *et al.*, 2016; Boynton & Greig, 2016).

Estudios recientes indican que se han aislado levaduras del ecosistema del viñedo tales como suelo, aire, hojas, uvas y diversos animales vectores (Portillo & Mas, 2016), así como también del ecosistema de la bodega como en equipos, suelo, utensilios, paredes y cubas de fermentación (Raspor *et al.*, 2006). La composición de la población de levaduras sobre las bayas juega un rol importante en las fermentaciones de vinos (Tristezza *et al.*, 2013). La actividad metabólica de los diferentes géneros y especies influyen la calidad sensorial y las características organolépticas del vino (Raspor *et al.*, 2006). Los más recientes estudios están en común acuerdo en que las levaduras apiculadas han sido las especies predominantes sobre las superficies de las baya, *Hanseniaspora uvarum* (y su forma anamorfa *Kloeckera apiculata*) en 50-75% de la población total de levaduras (Grangateau *et al.*, 2015) y en menor población *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula* (Moreira *et al.*, 2011), la presencia de estas levaduras no- *Saccharomyces* durante las fermentaciones se limita a los primeros días de la fermentación por la elevada producción de etanol generada por las levaduras *Saccharomyces*, sin embargo, su presencia aporta beneficios como la mejora desde el punto de vista sensorial al vino en cuanto aromas y tipicidad, siendo esto debido a que las levaduras no- *Saccharomyces* poseen unas enzimas diferentes a las levaduras *Saccharomyces*, que interactúan con los metabolitos de la fermentación, generando compuestos aromáticos de calidad óptima desde el punto de vista sensorial, por eso lo importante de su participación en las fermentaciones (Tristezza *et al.*, 2013; Portillo & Mas, 2016). Contrario a lo que lógicamente se pensaba, las especies fermentativas de *Saccharomyces* (e.j. *Saccharomyces cerevisiae*) se han aislado en muy baja población sobre bayas sanas y han sido extrañamente aisladas de granos de uva intactos y de suelos de viñedos (Raspor *et al.*, 2006; Barrajon *et al.*, 2009). Se ha comprobado que estas especies fermentativas están asociadas con el área de la bodega (Beltrán *et al.*, 2002; Sábate *et al.*, 2002) y que son incorporadas dentro del mosto durante el tratamiento mecánico de la uva y el proceso de fermentación (Li *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2009).

El cultivo de la uva en el Municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela, es uno de los rubros que ha tenido mayor desarrollo, debido a que la zona presenta las condiciones climáticas

requeridas por el cultivo de la vid, que han permitido la adaptación de las diferentes variedades de uva de vino que se siembran en la región. Para el año 2.000 la producción de uva de vino en el estado Zulia alcanzó una producción de 1.600.000 Kg con un rendimiento de 20 toneladas.ha.año⁻¹ en una superficie sembrada de 80 hectáreas, de la cual el 50% es procesado en el Centro de Desarrollo Vitícola Tropical del estado Zulia y el otro 50% fue llevado a Industrias IPECA. Las únicas variedades de uva de vino que se cultivan en la región zuliana están la Variedad Malvasía (uva blanca) y la variedad Tempranillo (uva tinta) (Molero, Guerrero & Martínez, 2007). En la actualidad, en el estado Zulia las fermentaciones alcohólicas se llevan a cabo mediante inoculación de levaduras importadas, provenientes de ceparios de reconocida calidad, seleccionadas para fermentar mostos en países de climas templados con alta capacidad para la producción de vino, pero no con levaduras adaptadas a las condiciones climáticas de la región, que generen vinos con características sensoriales propias. Aunado a ello está el alto costo de las levaduras secas activas importadas, que encarecen el negocio de la producción de vinos en la región, mientras que al aislar e identificar las levaduras de la región se estarían disminuyendo esos costos. Ciertamente, se pueden aislar levaduras tanto del área del viñedo como del área de la bodega, como arriba se mencionó, sin embargo, es preciso conocer las levaduras del viñedo, para así seleccionar que género de levaduras no-Saccharomyces presentes en el viñedo con potencial enológico importante se puedan utilizar para futuras fermentaciones alcohólicas.

El objetivo de la investigación fue aislar e identificar las levaduras nativas de un viñedo de la especie *Vitis vinifera* variedad Malvasía blanca en la Región Zuliana que posteriormente serán empleadas para la elaboración de vinos tropicales en la región zuliana.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Muestreo

Se recolectaron tres bolsas plásticas ziplot de muestras para cada uno de los sustratos de hojas, raquis y bayas de la variedad agronómica Malvasía, así como, corteza de la vid y suelo, pertenecientes a viñedos del Centro de Desarrollo Vitícola Tropical, ubicado en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela, de la cosecha correspondiente a mayo 2008, a aproximadamente 500 m del viñedo está ubicada la bodega del mismo Centro. De un total de 123 plantas correspondientes a un viñedo de la variedad Malvasía blanca, se muestrearon aséptica y aleatoriamente los diferentes tejidos (uvas y partes de la planta

(hojas, raquis, corteza de árbol y suelo)), colocándolas en bolsas de polietileno, estériles y selladas inmediatamente con una banda. Las muestras de los diferentes tejidos se procesaron inmediatamente y por separado, siguiendo las recomendaciones de Sábate *et al.* (2002) y Raspor *et al.* (2006).

2.2. Aislamiento de levaduras

La preparación de las muestras y diluciones respectivas de cada uno de los tejidos de la vid y suelo asociado al viñedo, muestreados para el análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la Norma COVENIN 1126-89, posteriormente la aplicación de las diluciones en placas se realizó de acuerdo a la Norma Venezolana COVENIN 1337-90.

2.3. Selección de levaduras

Una vez contadas las levaduras, se seleccionaron al azar de acuerdo a su morfología colonial contrastante, aislando 20 colonias diferentes de cada sustrato, de acuerdo a Sábate *et al.*, 2002. Las colonias aisladas se hicieron crecer en agar YEPD a 28 °C y posteriormente se preservaron a 4 °C hasta la futura identificación (Raspor *et al.*, 2006).

2.4. Identificación molecular de las levaduras

Las colonias de levaduras, fueron identificadas a nivel de especies por amplificación y restricción de una región del rADN de acuerdo a Guillamón *et al.* (1998) y Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Se aplicó también esta técnica molecular estándar a la cepa de referencia de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4921 (American Type Culture Collection) con el fin de comprobar la eficacia de la técnica.

2.5. Extracción del ADN de las levaduras

Se realizó mediante la técnica propuesta por Querol, Barrio & Ramón (1992), cuyo fundamento consistió en romper la pared celular y la membrana plasmática y así poder acceder al núcleo de la célula, seguidamente se rompió la membrana nuclear para dejar libre el ADN, y por último se protegió el ADN de enzimas que puedan degradarlo y finalmente para aislarlo se precipitó en alcohol.

2.6. Análisis de restricción de regiones ribosomales (RFLPs) del rADN y ensayos

PCR

La región ribosomal del gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 del ADN extraído de cada una de las levaduras se sometieron a amplificación por PCR

(reacción en cadena de la ADN polymerasa) mediante los cebadores ITS1 (5`-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3`) e ITS4 (5`TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3`) según el procedimiento descrito por Guillamón *et al.* (1998) y Esteve-Zaroso *et al.* (1999). Todas las amplificaciones se ejecutaron en un Sistema PCR GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis sobre geles de agarosa al 1,4% p/v en solución amortiguadora TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X, teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MI, USA) y visualizados bajo luz UV.

2.7. Digestión con enzimas de restricción

Los productos amplificados obtenidos del ADN amplificado mediante PCR de cada levadura se digirieron con las endonucleasas de restricción HaeIII, HinfI, CfoI y DdeI (Boehringer Mannheim, Germany) (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zaroso *et al.*, 1999). La digestión de los productos amplificados del ADN se analizó por electroforesis sobre geles de agarosa al 3% p/v en solución amortiguadora TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X, teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MI, USA) y visualizados bajo luz UV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Levaduras aisladas e identificadas en sustratos del viñedo de la variedad de uva Malvasía.

Se aislaron e identificaron un total de 284 colonias de levaduras en el viñedo, 35 en suelo, 43 en corteza, 52 en hojas, 32 en raquis y 122 en bayas (**Tabla 1**). Se incluye también la distribución de las especies de levaduras aisladas por sustrato, donde se observa que en el suelo asociado al cultivo hubo presencia de un 60% *Hanseniaspora guillermondii* y 40% *Hanseniaspora uvarum*, en la corteza 90% *Candida sake* y 10% *Hanseniaspora uvarum*, en hojas estuvo representado en 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, en raquis 100% por *Aureobasidium pullulans* y en las bayas estuvo presente 96% *Rhodotorula mucilagenosa* y 4% *Aureobasidium pullulans*. Estos resultados demuestran que en el viñedo están ampliamente difundidos los géneros *Ascomycetos Hanseniaspora*, *Candida* y *Aureobasidium* y el género *Basidiomycetos Rhodotorula*. El viñedo se caracteriza por la presencia de levaduras con carácter oxidativo más que fermentativo, como son los géneros *Rhodotorula* y *Aureobasidium* (Raspor *et al.*, 2006), los cuales no presentan potencial enológico por ser levaduras incapaces de fermentar azúcares, también se ha asociado el género *Rhodotorula* con el área de viñedos por presentar compuestos carotenoides que lo

hacen resistente a las radiaciones solares (Sábate *et al.*, 2002). Cabe destacar, que *Aureobasidium pullulans* es un hongo filamentoso que crece como levadura en cultivo y que ha sido incluido en el grupo de levaduras como “levadura negra”, es considerado como parte de la microbiota de levaduras en viñedo, ya que está ampliamente difundido en el mismo (Sábate *et al.*, 2002; Tristezza *et al.*, 2013).

Tabla 1. Frecuencia de aparición de especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos del viñedo de la variedad de uva Malvasía.

SUSTRATO ¹	ESPECIE DE LEVADURA	FRECUENCIA (%)
Suelo	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	60
35 colonias	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	40
Corteza de árbol	<i>Candida sake</i>	90
43 colonias	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	10
Hojas	<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	100
52 colonias		
Raquis	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100
32 colonias		
Bayas variedad Malvasía, Cosecha mayo 2008	<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	96
122 colonias	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4

¹ Los resultados obtenidos son producto de análisis por triplicado.

En el suelo y corteza se observa una amplia presencia de dos géneros de levaduras *Hanseniaspora* y *Candida*, respectivamente, a pesar de ser sustratos con ausencia de azúcares (Carrascosa, Muñoz & González, 2005), es el medio a través del cual se difunden las levaduras con carácter fermentativo por efecto del viento e insectos hasta llegar a las bayas (Sábate *et al.*, 2002) y ser de esta manera las iniciadoras de los procesos de fermentación espontánea (Raspor *et al.*, 2006), siendo la presencia de la bodega cerca del viñedo la que pudo influenciar en la existencia de estas levaduras en estos sustratos (Grangeteau *et al.*, 2015). *H. uvarum* aislado de suelo, presenta características enológicas ya que actúa durante los primeros días de fermentación del mosto en vino, aportando beneficios en el aroma y sabor del vino (Milanovic, Comitini & Ciani, 2013).

En las bayas, se observa presencia abundante del género *Basidiomyceto Rhodotorula*, característico de variedades de uvas blancas, coincidiendo con lo reportado por Raspor *et*

al. (2006), sin embargo, a diferencia de otras investigaciones (Li *et al.*, 2010; Cordero-Bueso, Arroyo, Serrano & Valero, 2011) hay ausencia del género *Hanseniaspora* en las bayas, lo que puede estar asociado con factores como temperatura, pluviosidad, grado de maduración de la baya, altitud y uso de fungicidas, que pueden afectar el desarrollo de este género. La elevada presencia de levaduras oxidativas permite considerarlas como residentes del viñedo y a las levaduras fermentativas como habitantes transitorios (Sábate, *et al.*, 2002).

Se corroboró que el ascomyceto *A. pullulans* estuvo extendido en el viñedo (raquis y bayas) se considera como residente del mismo y parte de la microbiota (Barrajon *et al.*, 2009). Se comprobó la ausencia de la levadura *S. cerevisiae*, con alto potencial enológico en cualquiera de los sustratos del viñedo, por poseer estos sustratos bajo contenido de azúcares (Cordero-Bueso *et al.*, 2011).

En la **Tabla 2** se presentan los fragmentos de restricción de las especies de levaduras aisladas en los distintos sustratos del viñedo muestreados.

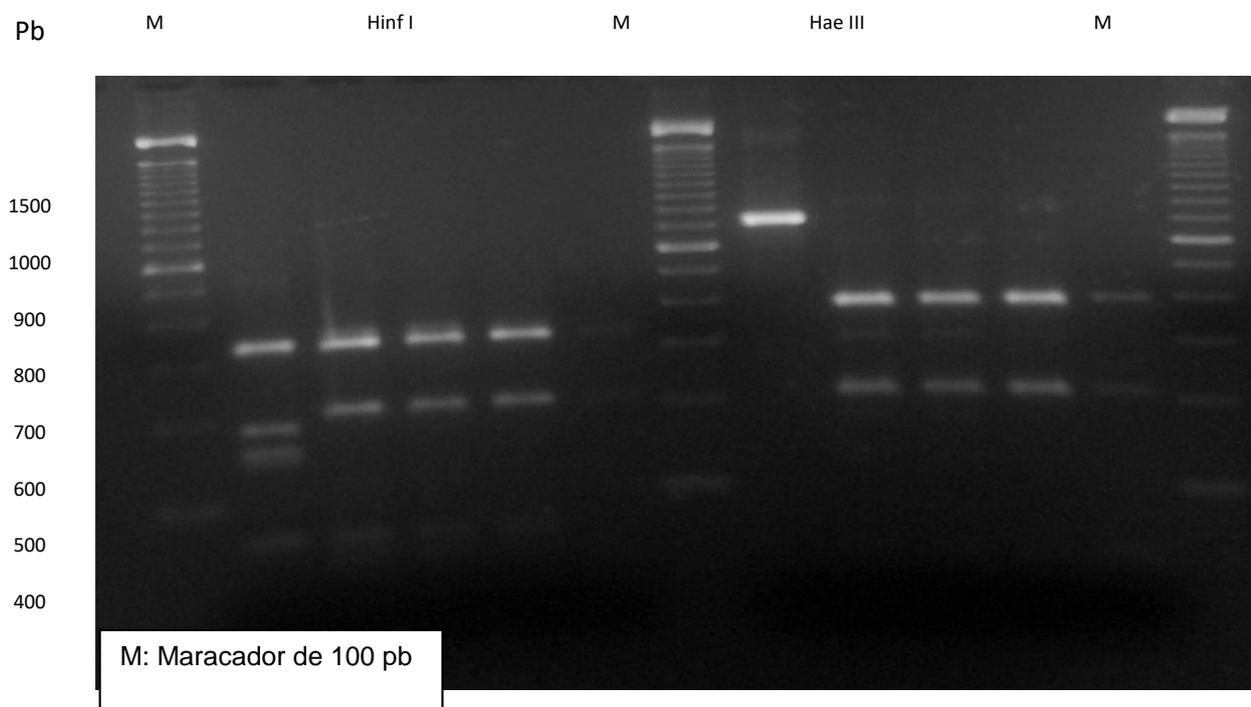
Tabla 2. Levaduras aisladas e identificación de acuerdo a longitud en pares de base (pb) de la región amplificada del gen 5.8S-ITS por PCR y fragmentos obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción.

ESPECIE DE LEVADURA	PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)	FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN			
		Hinf I	Hae III	CFol	Dde I
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	640	340+225+75	425+215	320+240+80	---
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	350+200+180	750	320+310+105	300+180+ 95+90+85
<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	750	350+200+180	750	320+310+105	380+180+ 95+80
<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	290+180+100	150+450	190+175+96	---
<i>Candida sake</i>	450	230+220	450	250+200	---

Los productos amplificados obtenidos estuvieron comprendidos entre 450-750 pb y estos se compararon directamente con los obtenidos en la investigación de Esteve-Zarsoso *et al.* (1999), que se encargó de desarrollar una base de datos disponible para un gran número de especies de levaduras aisladas de alimentos y bebidas. Los productos amplificados

fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinf I*, *HaeIII*, *CfoI* y con la enzima *DdeI* sólo los géneros de *Hanseniaspora*, para diferenciar entre dos especies de *H. uvarum* y *H. guillermondii* (Esteve-Zarsoso *et al.*, 1999; Milanovic *et al.*, 2013).

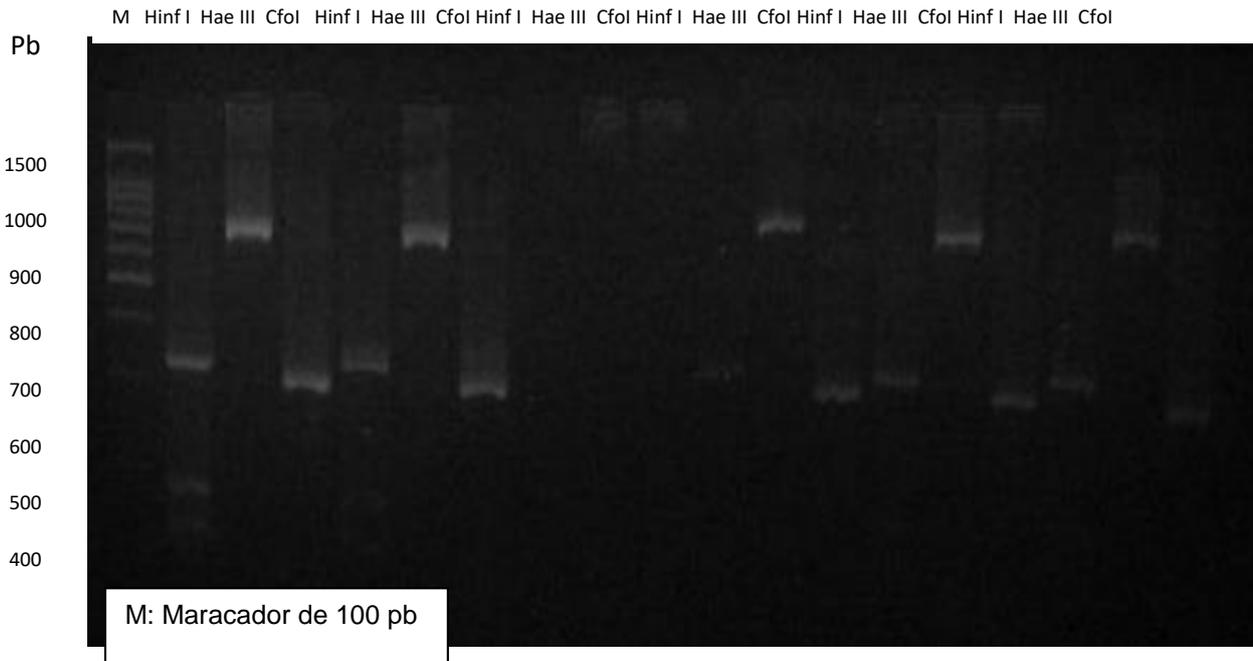
En las **Figuras 1, 2 y 3** se presentan patrones de restricción diferentes que después de ser comparados con las masas moleculares previamente descritas por Esteve-Zarsoso *et al.* (1999), se identificaron como *Rhodotorula mucilagenosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Aureobasidium pullulans* y *Candida sake*. En la **Figura 1** se observan los patrones de restricción de las especies de levaduras *Hanseniaspora uvarum* y *Rhodotorula mucilagenosa* presentes en sustratos como corteza, hoja y bayas.



Las columnas 2 y 8 muestran el fragmento de restricción correspondiente a la especie *Hanseniaspora uvarum* aislada de corteza. Las columnas 3-6 y 9-12 corresponden a la especie *Rhodotorula mucilagenosa* aislada de los sustratos baya y hoja.

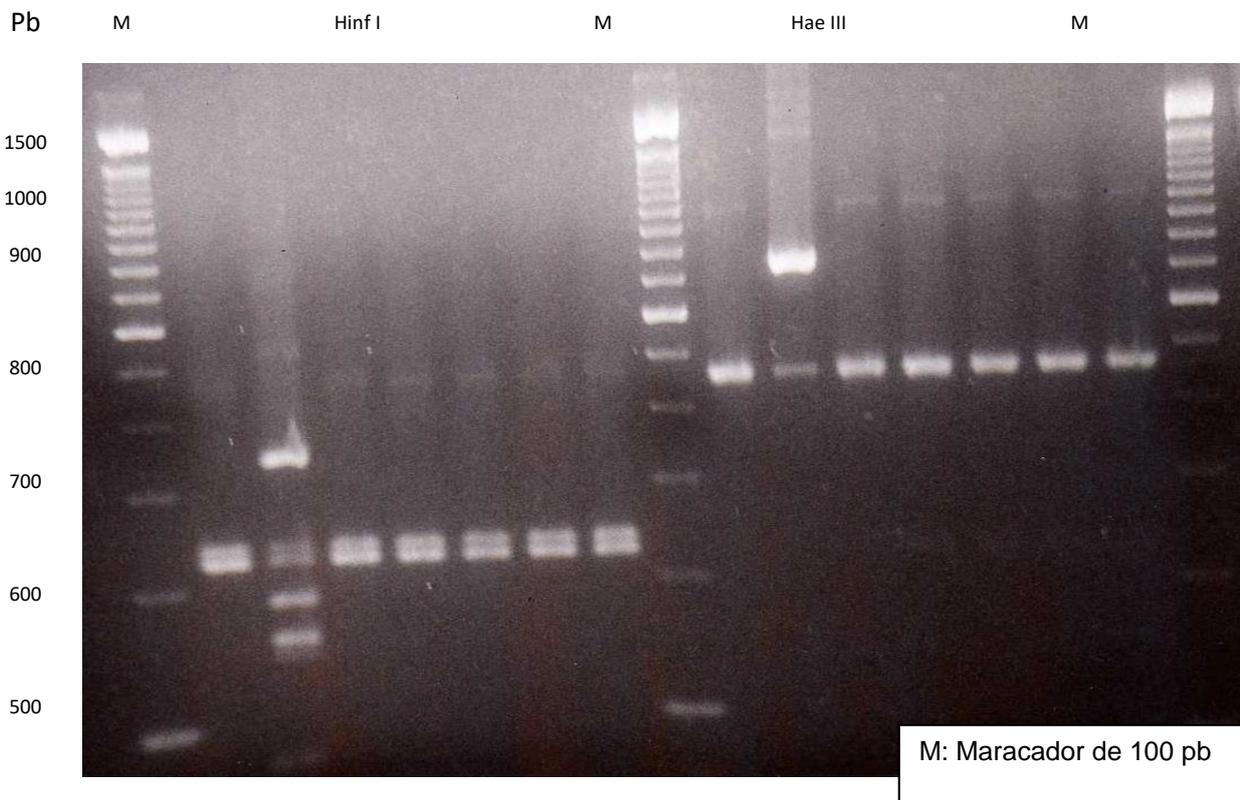
Figura 1. Gel de agarosa al 3% p/v representando los fragmentos de restricción con las enzimas *Hinf I* y *Hae III* de dos de las especies aisladas en sustratos de viñedo (corteza, baya y hoja) de la variedad de uva Malvasía.

En la **Figura 2** el género *Hanseniaspora* (*H. uvarum* y *H. guillermondii*) en suelo. En la **Figura 3** *Candida sake* y *Hanseniaspora uvarum* en corteza. Estas especies de levaduras han sido comúnmente aisladas de diversos sustratos del viñedo (Sábate *et al.*, 2002; Raspor *et al.*, 2006) y considerada parte de la flora de levaduras del mismo en investigaciones realizadas por Esteve-Zarsoso *et al.* (1999) y Chavan *et al.* (2009).



Las columnas 2-19 representan los fragmentos de restricción correspondientes al género *Hanseniaspora* aislada del suelo del viñedo.

Figura 2. Gel de agarosa al 3% p/v representando los fragmentos de restricción con las enzimas Hinf I, Hae III y CfoI de dos de las especies aisladas en el sustrato de viñedo (suelo) de la variedad de uva Malvasía.



Las columnas 2,10,12-16 muestran el fragmento de restricción correspondiente a la especie *Candida sake* aislada de corteza. Las columnas 3 y 11 corresponden a la especie *Hanseniaspora uvarum* aislada del sustrato corteza.

Figura 3. Gel de agarosa al 3% p/v representando los fragmentos de restricción con las enzimas Hinf I y Hae III de dos de las especies aisladas en el sustrato de viñedo (corteza) de la variedad de uva Malvasía.

4. CONCLUSIONES

En el viñedo se detectó la presencia de cinco especies de levaduras mediante la siguiente distribución por sustrato del viñedo, en suelo 60% *Hanseniaspora guillermondii* y 40% *Hanseniaspora uvarum*, en la corteza 90% *Candida sake* y 10% *Hanseniaspora uvarum*, en hojas 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, en raquis 100% *Aureobasidium pullulans* y en las bayas 96% *Rhodotorula mucilagenosa* y 4% *Aureobasidium pullulans*.

La Técnica molecular PCR-RFLP utilizada, sometiendo los productos amplificados a un análisis de restricción con las enzimas *Hinf* I, *Hae* III, *Cfo*I y *Dde*I fue eficiente para la identificación molecular de levaduras en viñedo de la variedad de uva Malvasía.

5. REFERENCIAS

- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L. & Briones, A. (2009). Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control*, 20, 778–783.
- Beltrán, G., Torija, M., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J., Rozès, N. & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A sixyear follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-293.
- Boynton, P. & Greig, D. (2016). Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. *Fungal ecology*, 22,61-72.
- Carrascosa, A., Muñoz, R. & González, R. (2005). *Microbiología del Vino*. Primera edición. Antonio Madrid Vicente (ed), España.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, DP., Shouche, Y. & Deshpande, MV. (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26, 801-808.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. & Valero, E. (2011). Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 23-29.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
- Francesca, N., Gaglio, R., Alfonzo, A., Settanni, L., Corona, O., Mazzei, P., Romano, R., Piccolo, A. & Moschetti, G. (2016). The wine: typicality or mere diversity? The effect of spontaneous fermentations and biotic factors on the characteristics of wine. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 769-773.
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., Wallbrunn, Ch., Alexandre, H. & Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation?. *Food microbiology*, 50, 70-77.
- Guillamón, J., Sábate, J., Barrio, E., Cano, J. & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species base on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392.
- Li, S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J., Yan, B., Han, B. & Reeves, M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 85-90.
- Milanovic, V., Comitini, F. & Ciani, M. (2013) Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 240-246.
- Molero, T., Guerrero, R. & Martínez, E. (2007). Caracterización del sistema de producción de uva de vino en el Municipio Mara, estado Zulia. Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 24, 343-366.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J., Hogg, T. & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guillermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22, 662-667.
- Norma Venezolana COVENIN 1126-89. (1989). Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. 7 p.
- Norma Venezolana COVENIN 1337-90. (1990). Método para recuento de Mohos y Levaduras. 6 p.

- Portillo, MC. & Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 317-321.
- Querol, A., Barrio, E. & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 439-446.
- Raspor, P., Milek, D., Polanc, J., Možina, S. & Čadež, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 97-102.
- Sábate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. & Guillamón, J. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial ADN. *Microbiological Research*, 157, 267-274.
- Sun, H., Ma, H., Hao, M., Pretorius, I. & Chen, S. (2009). Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China. *Annals of microbiology*, 59, 69-76.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G. & Grieco, F. (2013). Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food microbiology*, 36, 335-342.



COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE INTERPOLACIÓN PARA LA ESTIMACIÓN DE TEMPERATURA DEL RESERVORIO CEASA

MSc. Kalina Fonseca Largo¹, PhD. Cand. Mercy IlbayYupa¹, Sr. Luis Bustillos¹, Srta. Sara Barbosa¹, Srta. Alisson Iza¹

¹Universidad Técnica de Cotopaxi, 05108, CAREN 2266164. E-mail: merckyu@hotmail.com, luis.bustillos8838@utc.edu.ec, sara.barbosa5015@utc.edu.ec, alisson10595@gmail.com

*Autor para la correspondencia. Email: kalina.fonseca@utc.edu.ec

Recibido: 14-1-2018 / Aceptado: 12-4-2018

RESUMEN

La interpolación de temperatura en cuerpos de agua permite realizar predicciones de puntos de muestreo que no presentan datos. En la presente investigación se evaluaron 12 métodos de interpolación para estimar la temperatura del reservorio del Centro de Experimentación Académica Salache (CEASA) de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Los datos recolectados en campo fueron interpolados aleatoriamente y comparados con los reales en base al error medio (EM), error absoluto medio (MAE), error medio cuadrático (MSE), raíz del error cuadrático (RMSE) y coeficiente de determinación (R^2). La interpolación más apropiada para la representación de la variable temperatura en el reservorio fue el del método del Polinomio Local con un MSE de 0,22 y RMSE de 0,47 y R^2 de 0,53. Este método se puede utilizar para obtener datos de temperatura del reservorio, disminuyendo costos de tiempo y dinero que demandaría el levantamiento de información en campo.

Palabras clave: Interpolación, Temperatura, Polinomio Local, Reservorio CEASA.

COMPARISON OF INTERPOLATION METHODS FOR THE ESTIMATION OF TEMPERATURE OF CEASA RESERVOIR

ABSTRACT

The interpolation of temperature in bodies of water allows making predictions of sampling points that do not present data. In the present investigation, 12 interpolation methods were evaluated to estimate the reservoir temperature of the Salache Academic Experimentation Center (CEASA) at the Technical University of Cotopaxi. The data collected in the field were randomly interpolated and compared with the real ones based on the mean error (MS), mean absolute error (MAE), mean square error (MSE), the root of the quadratic error (RMSE) and coefficient of determination (R^2). The most appropriate interpolation for the representation of the variable temperature in the reservoir was the Local Polynomial method with an MSE of 0.22 and RMSE of 0.47 and R^2 of 0.53. This method can be used to obtain reservoir temperature data, decreasing the time and money costs that gathering information would require in the field require.

Key words: Interpolation, Temperature, Local Polynomial, CEASA Reservoir.

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE INTERPOLAÇÃO PARA ESTIMAR A TEMPERATURA DO RESERVATÓRIO DO CENTRO DE EXPERIMENTAÇÃO ACADÊMICA SALACHE (CEASA)

RESUMO

A interpolação da temperatura em corpos de água permite fazer previsões de pontos da amostragem que não apresentam dados. Na presente investigação foram avaliados 12 métodos de interpolação para estimar a temperatura do reservatório do Centro de Experimentação Acadêmica Salache (CEASA) da Universidade Técnica de Cotopaxi. Os dados coletados no campo foram interpolados aleatoriamente e comparados com os reais com base no erro médio (MS), erro absoluto médio (MAE), erro quadrático médio (MSE), raiz do erro quadrático (RMSE) e coeficiente de determinação (R^2). A interpolação mais apropriada para a representação da temperatura variável no reservatório foi a do método Polinômio Local com um MSE de 0,22 e RMSE de 0,47 e R^2 de 0,53. Este método pode ser usado para obter dados da temperatura do reservatório, diminuindo os custos de tempo e dinheiro que a coleta de informações no campo exigiria.

Palavras chaves: Interpolação, Temperatura, Polinômio Local, Reservatório CEASA.

1. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la distribución espacial de las variables que influyen en la calidad de agua es un paso previo para el manejo integral de los recursos hídricos. La caracterización del estado actual de las zonas de estudio, se realiza mediante mediciones en campo que generalmente están limitadas por los recursos económicos, temporales o por la naturaleza misma del fenómeno. La geoestadística, representa una herramienta que provee métodos para la estimación de variables de análisis en sitios no muestreados (Li & Heap, 2011). El análisis geoestadístico en Sistemas de Información Geográfica (SIG) se ha utilizado ampliamente en la interpolación de datos climáticos (Tveito & Forland, 1999; Tveito *et al.*, 2005). Los datos espacialmente continuos que no están disponibles, son difíciles de obtener y costosos de adquirir, por lo tanto variables no muestreadas deben estimarse para generar datos espacialmente continuos. Los métodos de interpolación espacial proporcionan una herramienta para estimar los valores de una variable ambiental en sitios no muestreados utilizando datos de observaciones puntuales. Este proceso se puede realizar mediante el uso del software Surfer, programa que grafica información geoespacial y transforma datos en contornos curvos continuos mediante la utilización de 12 interpoladores (Yang, Kao, Lee & Hung, 2004; Vohat *et al.*, 2013).

Los factores que afectan el rendimiento de los métodos de interpolación espacial son: densidad de muestreo (Dirks *et al.*, 1998; Hartkamp, 1998; Stahl *et al.*, 2006), distribución espacial de la muestra (Collins & Bolstad, 1996), agrupamiento de muestras (Laslett, 1994;

Zimmerman et al., 1999), tipo de superficie (Voltz & Webster, 1990; Zimmerman et al., 1999), la varianza de los datos (Schloeder et al., 2001), la normalidad de los datos (Wu et al. 2006), calidad de la información secundaria (Hernández-Stefanoni & Ponce Hernández, 2006; Hengl, 2007), estratificación (Brus et al., 1996), y tamaño o resolución de la cuadrícula (Hengl, 2007).

Los métodos de interpolación espacial se han aplicado ampliamente en las ciencias ambientales, varios estudios han comparado un conjunto de diferentes métodos, lo que hace difícil sacar conclusiones generales. Sin embargo, el kriging ordinario (OK), la ponderación de distancia inversa (IDW), incluida la distancia inversa cuadrada (IDS) y el cokriging ordinario (OCK) son los métodos más frecuentemente comparados. En esta investigación se determinó el mejor método de estimación de la temperatura para el reservorio del Centro de Experimentación Académica Salache (CEASA) mediante el software Surfer 8.0.

2. METODOLOGÍA

2.1. Datos

Para el estudio se recopilaron datos de temperatura del reservorio del CEASA, el muestreo se realizó desde abril-mayo correspondiente a la temporada lluviosa (**Tabla 1**).

Tabla 1. Puntos de muestreo de temperatura para el reservorio CEASA, serie abril-mayo 2017

Puntos	Latitud	Longitud	Temperatura
A1	764054.72	9889825.32	22.10
A2	764050.23	9889827.00	20.60
A3	764045.74	9889828.69	20.20
A4	764041.25	9889830.37	20.00
B1	764056.26	9889830.35	20.50
B2	764051.73	9889831.99	20.40
B3	764047.19	9889833.63	20.50
B4	764042.66	9889835.26	20.40
C1	764057.81	9889835.38	20.20
C2	764053.23	9889836.97	22.50
C3	764048.65	9889838.57	20.40
C4	764044.06	9889840.16	20.20
D1	764059.35	9889840.40	20.10
D2	764054.72	9889841.95	20.60
D3	764050.10	9889843.51	22.10
D4	764045.47	9889845.06	20.00

La metodología empleada para levantar datos de temperatura se basó en la norma NTE INEN 2176:2013. Se seleccionaron cinco puntos de control aleatoriamente: A2, A3, B2, C1 y D2 que fueron utilizados para estimar la temperatura mediante los 12 interpoladores del software Surfer 8.0: (**Figura 1**).

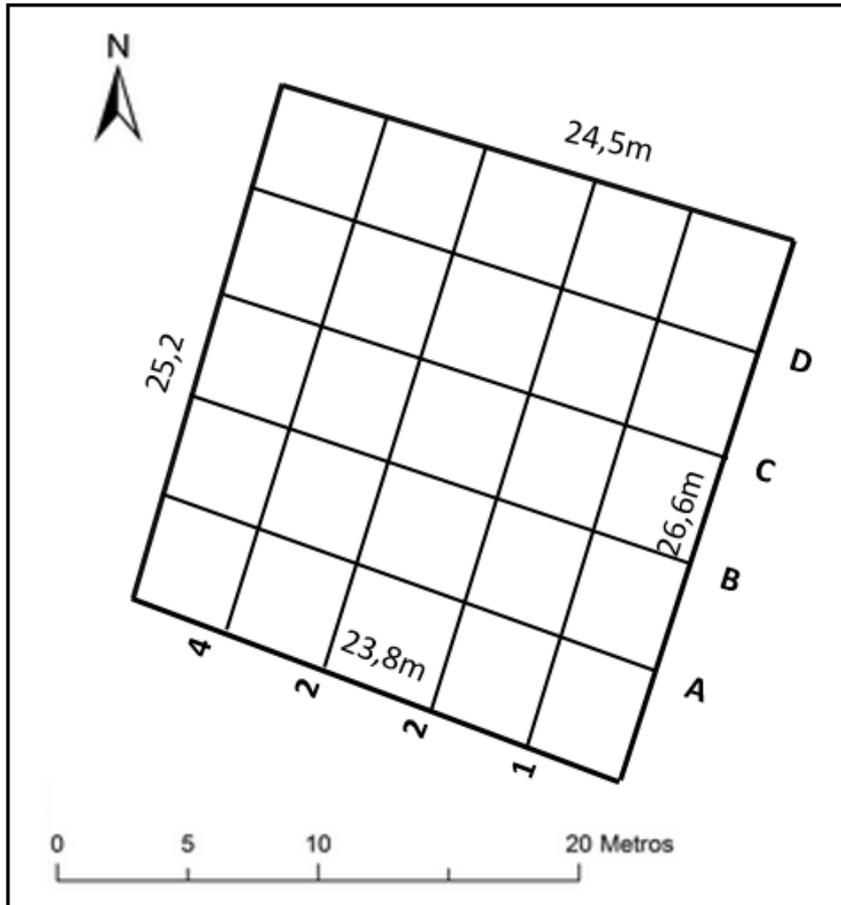


Figura 1. Grilla de puntos de medición de temperatura del reservorio del Centro de Experimentación Académica Salache (CEASA)

2.2. Área de Estudio

El CEASA de la Universidad Técnica de Cotopaxi está ubicado en Latacunga, provincia de Cotopaxi, zona centro del país, entre las coordenadas planas, 764871,7.m E y 9890295,7.m N, del sistema de referencia WGS84 UTM Zona 17S a una altitud promedio de 2730.msnm. El reservorio tiene área de 514,93.m² y 5 m de profundidad, almacenando 3000 m³ aproximadamente. El reservorio es alimentado por las aguas del río Cutuchi (**Figura 2**). Para la toma de muestras se diseñó una cuadrícula sobre la superficie del reservorio, con una separación aproximada de 5 m, obteniendo 16 puntos de muestreo (**Figura 1**).

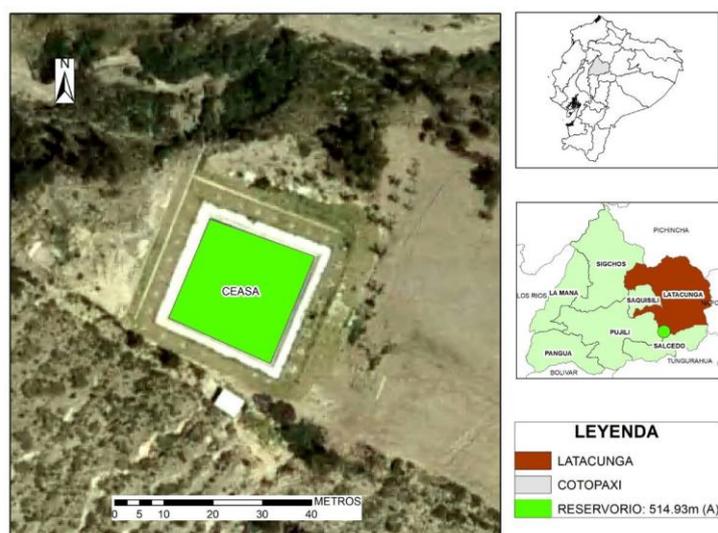


Figura 2. Ubicación del reservorio del Centro de Experimentación Académica Salache (CEASA)

2.3. Métodos de Interpolación

Para el análisis del mejor método de interpolación de temperatura del reservorio, se seleccionaron 5 puntos de control aleatoriamente de los 16 puntos de temperatura media obtenidos en campo, los métodos que se aplicaron, a continuación, se detallan:

2.3.1.- Kriging

Es un método interpolador exacto o de suavizado que depende de los parámetros especificados por el usuario, además este incorpora la anisotropía y las tendencias subyacentes mediante la construcción del variograma (Yilmaz, 2007).

2.3.2.- Distancia Inversa Ponderada

Es un método conocido como IDW por su nombre en inglés: *Inverse distance weighted*. La distancia inversa es un interpolador medio ponderado, puede ser exacto o suavizado, debido a que los datos se ponderan durante la interpolación de modo que la influencia de un punto, en relación con otro, disminuye con la distancia (Yang, Kao, Lee & Hung, 2004; Ilbay *et al.*, 2017). El IDW se basa en valores de las ubicaciones cercanas sin tomar en cuenta la relación espacial entre ellas. Este método es común para interpolar profundidad y contaminación del agua subterránea (Adhikary & Dash, 2017).

2.3.3.- El vecino más cercano o Nearest Neighbor

El método de vecinos más cercanos predice el valor de un atributo en un punto no muestreado basado en el valor de la muestra más cercana, dibujando perpendicularmente bisectrices entre puntos muestreados, formando polígonos de Thiessen (Li & Heat, 2008).

2.3.4.- Método de Shepard modificado

El método de Shepard modificado es similar a la distancia inversa a un interpolador de potencia, pero el uso de mínimos cuadrados locales elimina o reduce la apariencia de los contornos generados (Yilmaz, 2007).

2.3.5.- Triangulación con interpolación lineal

Este método se basa en la construcción de una red de triángulos con el propósito de identificar las observaciones más cercanas para ser usadas en la interpolación mediante un ajuste polinomial lineal (Li & Heat, 2008).

2.3.6.- Mínima curvatura

El interpolador de curvatura mínima controla el nivel de curvatura entre puntos de muestreo utilizando el parámetro de tensión interna y la velocidad de convergencia mediante el factor de relajación (Fallas, 2007).

2.3.7.- Vecino natural

El método de vecinos naturales está basado en el concepto de los polígonos de Thiessen, que utiliza un promedio ponderado de las observaciones vecinas, en donde la ponderación es proporcional al área obtenida al crear un nuevo polígono de Thiessen como resultado de incluir un nuevo punto en el set de datos (Fallas, 2007).

2.3.8.- Base Radial

La base radial permite interpolar valores a partir de un conjunto de puntos de muestreo, está basado en una ecuación multi-cuadrática que es considerada como el mejor interpolador, acepta barreras y líneas de inflexión (Chen, Cowan & Grant, 1991).

2.3.9.- Métrica de datos

La métrica de datos es un método que se basa en la creación de grillas de información de los datos observados. Se definen conjuntos de datos asociados a la grilla y sobre ellos se realiza la búsqueda de parámetros estadísticos (desviación estándar, varianza y coeficiente de variación) aplicada a cada nodo y al conjunto de datos asociados para luego usarlos en la estimación (Yang, Kao, Lee & Hung, 2004).

2.3.10.- Regresión polinómica

La regresión polinómica se utiliza para definir tendencias y patrones a gran escala en sus datos, el mismo que no es realmente un interpolador porque no intenta predecir valores Z desconocidos, pero existen opciones que se puede utilizar para definir el tipo de superficie de tendencia (Theil, 1992).

2.3.11.- Medias móviles

El método de media móvil asigna valores promediando los datos dentro de la elipse de búsqueda. Se utiliza los datos vecinos centrando la elipse de búsqueda. El valor de salida se establece igual al promedio aritmético de los datos vecinos identificados (Thompson & Weil, 1952).

2.3.12.- Polinomio local

El método Polinomio Local asigna valores usando un ajuste de mínimos cuadrados ponderados, con datos dentro de la elipse de búsqueda de la cuadrícula (Yang, Kao, Lee & Hung, 2004).

2.4. Calidad de estimación

Los datos interpolados fueron comparados con los datos muestreados, comparándoles entre sí, para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Las mediciones utilizadas para evaluar el rendimiento de los métodos de interpolación espacial fueron: error medio (ME), error absoluto medio (MAE), error medio cuadrático (MSE) y raíz del error cuadrático medio (RMSE). El ME se utiliza para determinar el grado de sesgo en las estimaciones y a menudo se denomina "sesgo" (Isaaks & Srivastava, 1989), El RMSE proporciona una medida del tamaño del error, pero es sensible a los valores atípicos, ya que concede gran importancia a los errores grandes (Hernández-Stefanoni & Ponce-Hernández, 2006). El MSE equivale a la suma de la varianza y la desviación al cuadrado del estimador. El MAE indica el grado en que la estimación puede ser errónea (Nalder & Wein, 1998).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los doce métodos analizados presentan gran variabilidad en la predicción de la temperatura en puntos de control (**Tabla 2**). El método del Polinomio Local mostró un MSE de 0,22 y un RMSE de 0,47, mientras que el R^2 resultó ser 0,53; siendo el método de mejor ajuste a los

valores muestreados en el reservorio del CEASA. Los mayores errores se observan en el método Vecino Natural, Triangulación y Métrica de datos. Los métodos de la Mínima curvatura, Método de Shepard modificado, Vecino más cercano, Regresión Polinómica, Función de base radial, Media Móvil, Distancia Inversa Ponderada y Kriging, presentaron un bajo rendimiento de las mediciones utilizadas para evaluar el rendimiento de los métodos de interpolación. Estos resultados discrepan con otros estudios (Boer, de Beurs, & Hartkamp, 2001; Osorio, Contreras & León, 2011; Chávez *et al.*, 2013; Shtiliyanova *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Xiao, Zhang, Breitkopf, Villon, & Zhang, 2018), donde el método de Distancia Inversa Ponderada y Kriging son los más utilizados y validados para variables de temperatura y precipitación a gran escala. Sin embargo, a pequeña escala el método del Polinomio Local parece ser el más eficiente.

Tabla 2. Error medio (ME), Error absoluto medio (MAE), Error medio cuadrático (MSE) y raíz del error cuadrático medio (RMSE) y coeficiente de determinación (R^2).

Métodos	ME	MAE	MSE	RMSE	R2
Distancia Inversa ponderada	0,50	0,50	0,39	0,62	0,10
Kriging	0,64	0,64	0,47	0,68	0,39
Mínima Curvatura	0,41	0,41	0,67	0,82	0,19
Método de Shepard modificado	0,59	0,59	0,43	0,66	0,01
Vecino Natural	6,81E+37	6,80564E+37	1E+76	1,076E+38	
Vecino más cercano	0,40	0,40	0,75	0,87	0,41
Regresión Polinómica	0,59	0,59	0,43	0,66	0,01
Función de base radial	0,67	0,67	0,52	0,72	0,45
Triangulación	3,4E+37	3,40282E+37	6E+75	7,609E+37	0,31
Media móvil	0,53	0,53	0,34	0,59	0,18
Métrica de datos	-9,40	9,40	88,39	9,40	
Polinomio Local	0,41	0,41	0,22	0,47	0,53

En el caso del método del Polinomio Local son evidentes las semejanzas en la distribución espacial de la temperatura en el reservorio del CEASA (**Figura 3**). La **tabla 2** y **figura 3** muestran el mejor ajuste en la distribución espacial y análisis estadísticos de la temperatura para el método Polinomio Local.

Comparación de Métodos de Interpolación para la Estimación de Temperatura del Reservorio CEASA

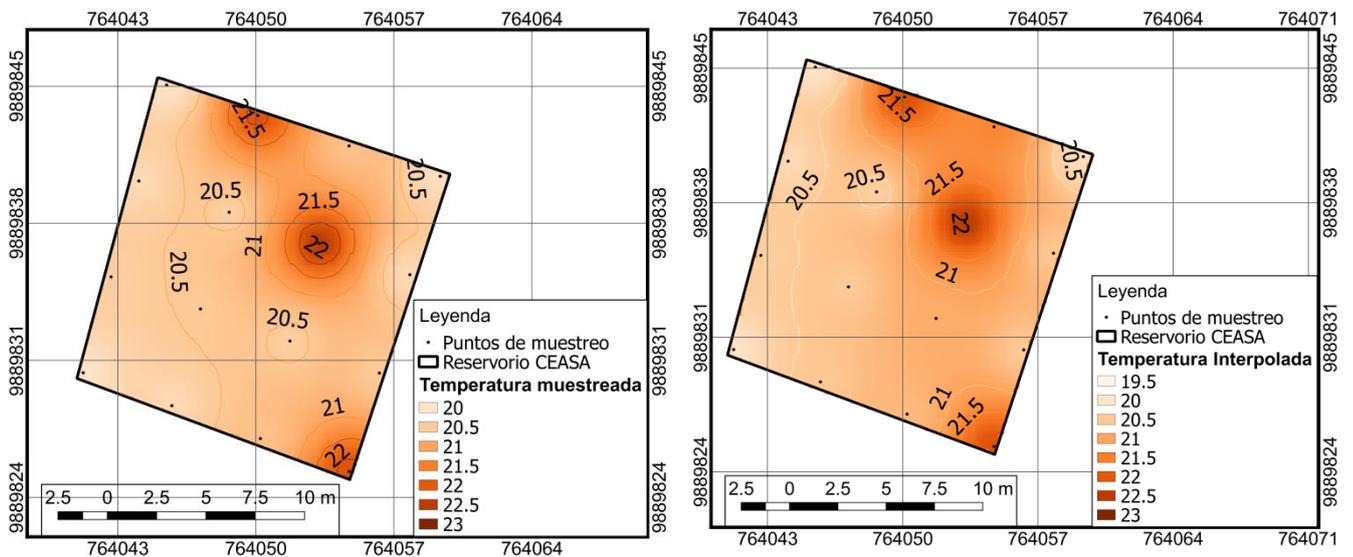


Figura 3. Distribución espacial de la temperatura del reservorio del Centro de Experimentación Académica Salache (CEASA) a) Interpolación de la temperatura con datos muestrada b) Interpolación de la temperatura por el método del Polinomio Local.

4. CONCLUSIONES

El método Polinomio Local mediante el software Surfer 8.0, es adecuado para la interpolación de varios puntos de temperatura en el reservorio del Centro de Experimentación Académica Salache (CEASA). Convirtiéndose en una herramienta valiosa para obtener información de temperatura en varios puntos de muestreo disminuyendo costos que implica el muestreo en campo.

El método de interpolación Inversa de la Distancia Ponderada, que son tradicionalmente utilizadas para la interpolación de datos de temperatura, proporcionaron predicciones menos precisas que el método Polinomio Local, y por lo tanto no es apropiado para interpolar temperatura en cuerpos de agua a pequeña escala.

5. REFERENCIAS

- Adhikary, P. P. & Dash, C. J. (2017). Comparison of deterministic and stochastic methods to predict spatial variation of groundwater depth. *Applied Water Science*, 7(1), 339-348. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0249-8>.
- Boer, E. P., de Beurs, K. M. & Hartkamp, A. D. (2001). Kriging and thin plate splines for mapping climate variables. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 3(2), 146–154.
- Brus, D.J., de Gruijter, J.J., Marsman, B.A., Visschers, B.A., Bregt, A.K. & Breeuwsma, A. (1996). The performance of spatial interpolation methods and choropleth maps to estimate properties at points: a soil survey case study. *Environmetrics*, 7, 1–16.
- Collins, F.C. & Bolstad, P.V. (1996) A comparison of spatial interpolation techniques in temperature estimation. *Proceedings, Third International Conference/Workshop on Integrating GIS and Environmental Modeling*,

Santa Fe, NM. National Center for Geographic Information and Analysis, Santa Barbara, Santa Barbara, CA.

- Chávez, L.S.A. & Moreano, R. (2013). Sistema de Información para la Interpolación de Datos de Temperatura y Precipitación del Ecuador. *Revista Politécnica*, 32.
- Chen, S., Cowan, C. F. & Grant, P. M. (1991). Orthogonal least squares learning algorithm for radial basis function networks. *IEEE Transactionson neural networks*, 2(2), 302-309.
- Dirks, K.N., Hay, J.E., Stow, C.D. & Harris, D. (1998). High-resolution studies of rainfall on Norfolk Island Part II: interpolation ofrain fall data. *Journal of Hydrology*, 208, 187–193.
- Fallas, J. (2007). Modelos digitales de elevación: Teoría, métodos de interpolación y aplicaciones. Mapealo. Com, San José, Costa Rica, 83. https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Fallas5/publication/229021279_Modelos_digitales_de_elevacion_Teoria_metodos_de_interpolacion_y_aplicaciones/links/55a529ef08ae00cf99c94ee6/Modelos-digitales-de-elevacion-Teoria-metodos-de-interpolacion-y-aplicaciones.pdf.
- Hengl, T. (2007). A Practical Guide to Geostatistical Mapping of Environmental Variables. JRC Scientific and Technichal Reports. Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg.
- Hernandez-Stefanoni, J.L. & Ponce-Hernandez, R. (2006). Mapping the spatial variability of plant diversity in a tropical forest: comparison of spatial interpolation methods. *Environmental Monitoring and Assessment* 117, 307–334.
- Ilbay Yupa, M., Largo, K. F., Miguitama, A. Q., Landázuri, R. L. & Toasa, J.T. (2017). Estimación de datos faltantes de precipitación en la Subcuenca del río Patate. *Revista Bases de la Ciencia*, 2 (3), 37-49.
- Isaaks, E.H. & Srivastava, R.M. (1989). *Applied Geostatistics*. Oxford University Press, New York, p. 561.
- Laslett, G.M. (1994). Kriging and splines: an empirical comparison of their predictive performance in some applications. *Journal of the American Statistical Association*, 89, 391–400.
- Li, J. & Heap, A. D. (2008). A review of spatial interpolation methods for environmental scientists. *Geosciences Australia, Record* 2008/23.
- Li, J. & Heap, A.D. (2011). A review of comparative studies of spatial interpolation methods in environmental sciences: Performance and impact factors. *Ecological Informatics*, 6(3), 228-241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2010.12.003>.
- Nalder, I.A. & Wein, R.W. (1998). Spatial interpolation of climatic normals: test of a new method in the Canadian boreal forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, 92, 211–225.
- Osorio, D.S.Á., Contreras, A.C. & León, J.C.M. (2011). Modelos digitales batiMétricos generados por Métodos de interpolación idw, kriging, shepard y b-spline en el archipiélago de islas del rosario. *UD y la geomática*, 5, 3–14.
- Schloeder, C.A., Zimmerman, N.E. & Jacobs, M.J. (2001). Comparison of methods for interpolating soil properties using limited data. *Soil Science Society of American Journal*, 65, 470–479.
- Shtiliyanova, A., Bellocchi, G., Borrás, D., Eza, U., Martín, R. & Carrère, P. (2017). Kriging-based approach to predict missing air temperature data. *Computers and Electronics in Agriculture*, 142, 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.09.033>.
- Stahl, K., Moore, R.D., Floyer, J.A., Asplin, M.G. & McKendry, I.G. (2006). Comparison of approaches for spatial interpolation of daily air temperature in a large region with complex topography and highly variable station density. *Agricultural and Forest Meteorology*, 139, 224–236.
- Theil, H. (1992). A rank-invariant method of linear and polynomial regression analysis. In Henri Theil's *Contributions to Economics and Econometrics*. Springer Netherlands.
- Thompson, W.R. & Weil, C.S. (1952). On the construction of tables for moving-average interpolation. *Biometrics*, 8(1), 51-54.

Comparación de Métodos de Interpolación para la Estimación de Temperatura del Reservorio CEASA

- Tveito, O.E., Bjørndal, I., Skjelvåg, A.O. & Aune, B. (2005). A GIS-based agroecological decision system based on gridded climatology. *Meteorological Applications*, 12, 57–68.
- Tveito, O.E. & Førland, E. (1999). Mapping temperatures in Norway applying terrain information, geostatistics and GIS. *Norsk Geografisk Tidsskrift.—Norwegian Journal of Geography*, 53, 202–212.
- Vohat, P., Gupta, V., Bordoloi, T.K., Naswa, H., Singh, G. & Singh, M. (2013). Analysis of different interpolation methods for uphole data using Surfer software. *En10th Biennial International Conference & Exposition* (pp. 23–25).
- Voltz, M. & Webster, R. (1990). A comparison of kriging, cubic splines and classification for predicting soil properties from sample information. *Journal of Soil Science*, 41, 473–490.
- Wu, J., Norvell, W.A. & Welch, R.M. (2006). Kriging on highly skewed data for DTPA extractable soil Zn with auxiliary information for pH and organic carbon. *Geoderma*, 134, 187–199.
- Xiao, M., Zhang, G., Breitkopf, P., Villon, P. & Zhang, W. (2018). Extended Co-Kriging interpolation method based on multi-fidelity data. *Applied Mathematics and Computation*, 323, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.amc.2017.10.055>.
- Xu, W., Collingsworth, P., Bailey, B., Carlson Mazur, M., Schaeffer, J. & Minsker, B. (2017). Detecting spatial patterns of rivermouth processes using a geostatistical framework for near-real-time analysis. *Environmental Modelling & Software*, 97, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2017.06.049>.
- Yang, C.S., Kao, S.P., Lee, F.B. & Hung, P.S. (2004). Twelve different interpolation methods: A case study of Surfer 8.0. In *Proceedings of the XXth ISPRS Congress*, 35, 778-785.
- Yilmaz, H.M. (2007). The effect of interpolation methods in surface definition: an experimental study. *Earth Surface Processes and Landforms*, 32(9), 1346-1361.
- Zimmerman, D., Pavlik, C., Ruggles, A. & Armstrong, M.P. (1999). An experimental comparison of ordinary and universal kriging and inverse distance weighting. *Mathematical Geology*, 31, 375–390.



La Enseñanza del Diagrama de Caja y Bigotes para Mejorar su Interpretación

MSc. Jorge Flores¹, MSc. Roberto Flores²

¹Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

²Universidad Laica VICENTE ROCAFUERTE de Guayaquil, Ecuador.

*Autor para la correspondencia. Email: jrflores@utm.edu.ec

Recibido: 14-1-2018 / Aceptado: 30-4-2018

RESUMEN

El propósito de este estudio fue mejorar la interpretación del diagrama de caja y bigotes utilizando un módulo autoinstruccional en combinación con la instrucción por pares. Participaron en este estudio 30 estudiantes de un programa de grado de una universidad ecuatoriana. La unidad bajo estudio fue el "Tratamiento Estadístico de Datos" y en el tema "Diagrama de caja y bigotes". Se administró la prueba de entrada, luego se entregó el módulo autoinstruccional "Diagrama de caja y bigotes" y posteriormente se realizó la instrucción por pares y finalizada la misma se administró la prueba de salida. La prueba t emparejada dio un valor de $t = 14,64$ con 29 grados de libertad que es significativo a un valor de $p < 0,0001$. Este estudio en su primera fase comprobó que la combinación del módulo autoinstruccional con la instrucción por pares resulta en un mejor aprendizaje. Además, la media de las calificaciones de la prueba de salida avala el logro de la alfabetización estadística, mientras que la media de las calificaciones de la prueba de concepto avala el razonamiento estadístico.

Palabras clave: Estadística, diagrama de caja y bigote, módulo autoinstruccional, instrucción por pares, alfabetización y razonamiento estadístico.

The Teaching of Box and Whiskers Plot to Improve their Interpretation

ABSTRACT

The purpose of this study was to improve the interpretation of the box and whisker plot using a self-instructional module in combination with peer instruction. In this study 30 undergraduate students of an Ecuadorian University participated in the experiment. The intervention combined a self-instructional module and the peer instruction, in the unit of "Statistical data processing" and on the topic "Box and whisker plot". The students received the pretest, then they studied the self-instructional module "Box and whisker plot" and subsequently held the peer instruction and finally they received the posttest. The paired t-test results in t value of $t = 14.64$ with 29 degrees of freedom which is significant at a p-value < 0.0001 . This study in its first phase proved that the combination of the self-instructional module with peer instruction results in better learning. In addition, the

average scores of the posttest supports achievement of statistical literacy, while the average score of the concept test support the statistical reasoning.

Key words: Statistics, box and whisker plot, self-instructional module, peer instruction, statistical literacy and reasoning

O Ensino do Diagrama Caixa e Bigodes para Melhorar sua Interpretação

RESUMO

O objetivo deste estudo foi melhorar a interpretação do diagrama de caixa e whisker usando o módulo autoinstrucional em combinação com a instrução por pares. 30 um programa de grau de estudantes universitários equatorianos participaram deste estudo. A unidade em estudo foi o "processamento de dados estatístico" e clique no tópico "diagrama de caixa e whisker". Dado o teste de entrada, se rendeu o módulo de autoinstrucional "diagrama de caixa e whisker" posteriormente realizada a instrução e completada por pares o teste de saída foi utilizado. O teste combinado t deu um valor de $t = 14.64$ com 29 graus de liberdade, que é significativo com um p -valor $< 0,0001$. Este estudo em sua primeira fase provou que a combinação do módulo autoinstrucional com a instrução do mesmo nível resulta em uma melhor aprendizagem. Além disso, a média do teste de saída suporta a conquista da alfabetização estatística, enquanto a pontuação média da prova conceitual apoia o raciocínio estatístico.

Key words: estatísticas, diagrama caixa e whisker, módulo autoinstrucional, instrução pelos pares, alfabetização e raciocínio estatístico.

1. INTRODUCCION

La Estadística se apoya en las representaciones gráficas para mostrar cómo se distribuyen los datos. Entre ellas se encuentran el diagrama de caja y bigotes, el cual es la representación gráfica de una distribución de datos, diseñada para tomar decisiones y razonar acerca de esas distribuciones. Esta representación consta de cinco elementos: el valor mínimo, el primer cuartil (Q_1), el segundo cuartil (Q_2), el tercer cuartil (Q_3) y el valor máximo; como puede notarse ellos dividen a los datos en cuatro grupos. Esta representación presenta al mismo tiempo una medida de tendencia central (mediana), dos medidas de dispersión (rango y rango intercuartil) e indica la simetría o asimetría de la distribución (Devore, 2012; Triola, 2013; Johnson & Kuby, 2012).

Los estudiantes al momento de interpretar el diagrama de caja y bigotes tienen serias dificultades relacionadas con la mediana, a la cual ellos no la perciben como una medida de tendencia central. También confunden el ancho de la caja, no el largo, con la dispersión de los datos (Bakker, Biehler & Konold, 2004). Otros autores han encontrado que los

estudiantes piensan que cuando una de las áreas de la caja es más grande en ella se encuentran mayor cantidad de datos (Lem, Onghena, Verschaffel & Van Dooren, 2012; Lem, Onghena, Verschaffel & Van Dooren, 2013)

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue mejorar la interpretación del diagrama de caja y bigotes utilizando un módulo autoinstruccional en combinación con la instrucción por pares.

1.1. Alfabetización y razonamiento estadístico

La Asociación Americana de Estadística (ASA por sus siglas en Inglés) recomienda lo siguiente para la enseñanza de la Estadística: (1) Enseñar el razonamiento estadístico. (2) Enfocarse en la parte conceptual. (3) Integrar datos reales con un contexto y un propósito. (4) Fomentar el aprendizaje activo. (5) Usar la tecnología para explorar los conceptos y analizar datos. (6) Usar la evaluación para mejorar el aprendizaje de los estudiantes (American Statistical Association, 2016). La aplicación de estas recomendaciones logra la alfabetización y razonamiento estadístico.

La alfabetización estadística involucra comprender y usar el lenguaje y herramientas estadísticas y, además, conocer lo que significan los términos estadísticos, comprender el uso de los símbolos estadísticos y ser capaz de interpretar las diferentes representaciones de los datos. La alfabetización estadística procura que los estudiantes estén familiarizados con los conceptos estadísticos ya que ellos juegan un rol muy importante en el razonamiento y lo que es más importante ellos permiten comunicar esos razonamientos (Jonassen, 2006).

El razonamiento estadístico involucra argumentar con las ideas estadísticas, dar sentido a la información estadística, relacionar los conceptos de la estadística e interpretar los resultados estadísticos (Garfield, delMas & Chance, 2003). El razonamiento es uno de los procesos cognitivos más básicos e importantes, ya que este apoya la comprensión conceptual y la resolución de problemas. Además, el razonamiento se requiere para formular predicciones, sacar conclusiones, establecer inferencias y explicar los fenómenos (Jonassen & Ionas, 2008). En definitiva, estos dos procesos están interrelacionados.

Por lo tanto, es esencial que los estudiantes aprendan los conceptos centrales de la Estadística y que también aprendan a razonar estadísticamente, usando un módulo autoinstruccional relacionado con el concepto de caja y bigotes. Además, para que los estudiantes logren el razonamiento estadístico, en el salón de clase hay que implementar

lo que se denomina las pedagogías personalizadas, en las cuales los estudiantes discuten con sus pares preguntas de estadística relacionadas con el diagrama de caja y bigotes (Chick, Haynie & Gurung, 2009).

Además, la enseñanza de la Estadística es importante impartirla en ambientes de aprendizaje centrados en los estudiantes, de tal manera que ellos apliquen el aprendizaje activo. En estos ambientes de aprendizaje, los estudiantes, por medio de actividades auténticas, es decir, utilizando datos reales y apoyados por la tecnología, ellos analizan los datos; y de esta manera conectan estas actividades de aprendizaje con los contenidos de la Estadística. Asimismo, es un requerimiento que estos ambientes de aprendizaje sean de naturaleza colaborativa para que ellos interactúen con sus pares y como producto de la misma construyan el conocimiento (Jonassen & Howland, 1997).

1.2. Diseño instruccional

Para lograr la alfabetización estadística se diseñó un módulo autoinstruccional sobre el tema “Diagrama de caja y bigotes”. En este módulo se enseñan los conceptos estadísticos relacionados con la construcción del diagrama de caja y bigotes, que son el primero, segundo y tercer cuartil, el límite inferior y el límite superior y se muestra el procedimiento de construcción. Este módulo, el estudiante lo aprende a su propio ritmo y de manera independiente. Esto es necesario ya que para la aplicación de la instrucción por pares se requiere que los estudiantes vengan preparados a la clase y este módulo autoinstruccional les proporciona la información necesaria para comprender los diagramas de caja y bigotes.

El “diseño instruccional es un proceso sistemático y reflexivo que traduce los principios de aprendizaje e instrucción en planes para los materiales instruccionales, actividades, fuentes de información y evaluación” (Smith & Ragan, 1999, p. 2). Este modelo está basado en la teoría del aprendizaje de R. Gagne y tiene los siguientes pasos: (1) Actividades preinstruccionales; (2) Presentación de la información; (3) Participación del estudiante; (4) Evaluación; (5) Seguimiento y retroalimentación (Gagne, 1985; Gagne, Briggs & Wager, 1988; Gagne & Driscoll, 1988; Dick & Carey, 1987).

Para el diseño del módulo autoinstruccional se tomó en cuenta los resultados de las investigaciones realizadas sobre diagramas de caja y bigotes. Además, el módulo autoinstruccional fue evaluado formativamente por un grupo de cinco estudiantes y luego fue evaluado sumativamente con un grupo de diez estudiantes. Los estudiantes que participaron en estas evaluaciones tienen las mismas características que los estudiantes a

quienes se aplicó la intervención. La razón de la evaluación formativa y sumativa fue la de presentar a los estudiantes que participaron en el experimento una instrucción clara.

1.3. Instrucción por pares

En el área de la física, una pedagogía personalizada es la Instrucción por Pares, desarrollada por Erick Mazur profesor de física de la Universidad de Harvard, ella privilegia el dominio conceptual y promueve la discusión entre los estudiantes (Mazur, 1997). En la enseñanza de la Estadística también se puede aplicar esta metodología para aprender los conceptos de la Estadística y razonar estadísticamente. La instrucción por pares se inicia con una presentación de cinco a siete minutos de duración, en donde se enseñan los puntos más importantes del tema bajo estudio, para a renglón seguido administrar la prueba de conceptos, que generalmente es una prueba de múltiple respuesta y la cual mide la comprensión de los estudiantes acerca de lo explicado. Es importante destacar que la prueba de concepto está creada para observar las dificultades conceptuales que tienen los estudiantes sobre el tema bajo discusión. Los estudiantes contestan la pregunta y registran su respuesta ya sea manualmente o automáticamente. Esto tiene una duración de tres minutos. Luego el profesor solicita a los estudiantes que discutan con sus compañeros más cercanos la respuesta que ellos han dado y nuevamente presentan la respuesta. Esto tiene una duración de dos minutos. Finalmente, el profesor explica la respuesta correcta a los estudiantes, lo cual tiene una duración de tres minutos. En la instrucción por pares se siguen los siguientes pasos: (1) Presentación de la información. (2) Evaluación del estudiante mediante la prueba de concepto. (3) Participación del estudiante en la discusión entre pares. (4) Retroalimentación (Mazur, 1997).

Si el porcentaje de respuestas correctas es menor que el 30% se revisa el concepto. Si el porcentaje de respuestas correctas esta entre 30% y 70% se discute entre pares y se vuelve a dar la nueva respuesta. Si el porcentaje de respuestas es mayor que el 70% se explica la respuesta correcta y se continúa al nuevo tema de la unidad.

En la instrucción por pares se insiste en la alfabetización estadística, enseñando los puntos más importantes del diagrama de caja y sus usos en la estadística exploratoria. El razonamiento estadístico se revela cuando los estudiantes discuten con sus compañeros la respuesta que ellos dieron en la prueba de conceptos relacionada con el diagrama de caja y bigotes. Por lo tanto, se puede concluir que este ambiente de aprendizaje es activo porque el estudiante realiza una serie de actividades que conducen a un mejor aprendizaje: es constructivista porque el estudiante durante las actividades planificadas construye el

conocimiento; es colaborativo porque discute con sus compañeros las respuestas de las pruebas de conceptos e intencional porque tiene metas claras y específicas.

1.4. Representaciones externas múltiples

El diagrama de caja y bigotes es un concepto estadístico que tiene una representación pictórica, una descripción del concepto, el cual corresponde a su representación verbal y su construcción tiene un procedimiento que involucra la representación matemática y se lo puede graficar manualmente o computacionalmente. Es esencial, que ambos sean utilizados. El primero para que noten que el número de datos son aproximadamente iguales en cada grupo y el segundo para que usen la tecnología, como lo recomienda la ASA (Figura 1).

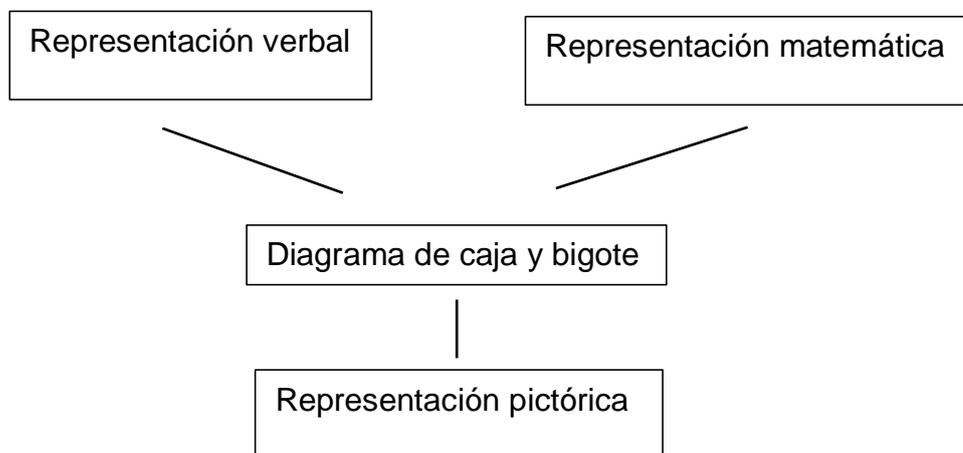


Figura 1. Representación externa múltiple del diagrama de caja y bigote

1.5. Hipótesis

La hipótesis alternativa: La media de la prueba de salida es mayor que la media de la prueba de entrada.

La hipótesis nula: La media de la prueba de entrada es igual a la media de la prueba de salida.

2. MÉTODO

2.1 Participantes

Los participantes fueron 30 estudiantes con una edad comprendida entre los 18 y 19 años quienes están matriculados en un programa de grado de una universidad privada ecuatoriana, y recibieron la materia de Estadística.

2.2 Tareas y materiales instruccionales

La unidad instruccional fue el “Tratamiento Estadístico de Datos” y el tema fue el “Diagrama de caja y bigotes”. El tiempo dedicado para la enseñanza fue de 120 minutos. El material instruccional fue el módulo autoinstruccional “Diagrama de caja y bigotes”. Los instrumentos fueron las pruebas de entrada y de salida y la prueba de conceptos. Las pruebas administradas a los estudiantes eran de referencia por criterio, estas pruebas miden el progreso de los estudiantes y dan información acerca de la efectividad de la instrucción. Además, estas pruebas miden el desempeño de los estudiantes en términos de los objetivos instruccionales.

2.3 Procedimiento

En primer lugar, se administró la prueba de entrada que tuvo una duración de 30 minutos; en segundo lugar, se entregó el módulo autoinstruccional al cual los estudiantes le dedicaron 45 minutos; en tercer lugar, se aplicó la instrucción por pares que tuvo una duración de 15 minutos. Los estudiantes respondieron la pregunta conceptual de múltiple respuesta con una hoja que contenía la alternativa que ellos estimaban era la correcta y en cuarto lugar se administró la prueba de salida que tuvo una duración de 30 minutos.

2.4 Análisis de datos

Se aplicó la prueba t emparejada con un nivel de significación $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados de la prueba de entrada y de salida

En la **Tabla 1** se presenta el número de estudiantes, la media, la desviación estándar, el valor máximo y el valor mínimo de la prueba de entrada y de salida. Las dos pruebas eran iguales y estaban calificadas sobre 20.

Tabla 1. Información estadística de la prueba de entrada y de salida

Pruebas	Número de estudiantes	Media	Desviación estándar	Máximo	Mínimo
Prueba de entrada	30	11,97	2,48	17	8
Prueba de salida	30	17,30	2,38	20	11

3.2 Resultados de la prueba t emparejada.

La prueba t emparejada dio un valor de $t = 8,407$ con 29 grados de libertad que es significativo para un valor de $p < 0,00001$. Este estudio comprobó la hipótesis; que la combinación del módulo autoinstruccional con la instrucción por pares resulta en un mejor aprendizaje. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación.

3.3 Resultados de la prueba de conceptos

El 80% de los estudiantes contestaron correctamente la prueba de conceptos después de la discusión entre pares. En vista de que se satisface la condición de que el 80% de los estudiantes contestaron correctamente no se discutió la respuesta. De todos modos, se explicó la respuesta correcta. En la **Figura 2** se muestra las respuestas correctas de los estudiantes.

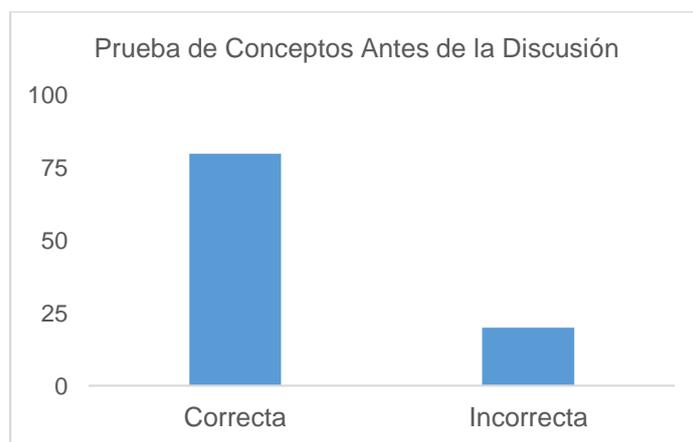


Figura 1. Diagrama de barras de las respuestas antes.

4. CONCLUSIÓN

Este estudio comprobó que el uso de un módulo autoinstruccional en la instrucción por pares mejora el rendimiento de los estudiantes. Primero porque el módulo autoinstruccional permitió que los estudiantes estén preparados para la instrucción y por ello en la instrucción por pares mostraron evidencia de alta comprensión conceptual. Otro de los factores que también incidió en los resultados fue el uso de las representaciones externas múltiples las cuales permitieron conectar la representación visual con los conceptos y distinguir los aspectos relevantes e irrelevantes de la representación visual (Ainsworth, 2006; Schnotz,

2005). Es importante considerar los resultados de otras investigaciones para mejorar la instrucción.

Este estudio tiene mayor valor práctico que valor teórico. Además, fue realizado en una institución privada, sería conveniente replicarlo en una institución pública. Además, hacer un diseño experimental más adecuado para poder generalizar los resultados con mayor precisión.

5. REFERENCIAS

- Ainsworth, S. (2006). Deft: A conceptual framework for considering learning with multiple representations. *Learning and Instruction*, 16(3), 183-198.
- American Statistical Society. (2016). GAISE College Report ASA Revision Committee. (2016). Guidelines for Assessment and Instruction En Statistics Education College Report 2016, <http://www.amstat.org/education/gaise>.
- Bakker, A., Biehler, R & Konold, C. (2004). Should young students learn about boxplots. En *Curricular development in statistical education: International Association for Statistical Education*. En G. Burrill, Ed. Lund: Presented at Curricular development in statistical education: International Association for Statistical Education.
- Chick, N., Haynie, A. & Gurung, R. (2009). From generic to signatures pedagogies: teaching disciplinary understanding. En *Exploring signature pedagogies: Approaches to reaching disciplinary habits of mind*. R. Regan, R. Gurung, N. Chick, & A. Haynie, Eds. Sterling, VA: Stylus Publishing, LLC.
- Devore, J. (2012). *Probabilidad y Estadística para ingeniería y ciencias*, México: Cengage Learning Editores S.A. de C.V.
- Dick, W. & Carey, L. (1987). *The systematic design of instruction*, Glenview, Illinois: Scott, Foresman Company.
- Gagne, R. & Driscoll, M. P. (1988). *Essentials of learning for instruction*, Englewood Cliff, NJ: Prentice Hall.
- Gagne, R. (1985). *The conditions of learning and theory of instruction*, New York, NY: Holt Rinehart and Winston.
- Gagne, R., Briggs, L. & Wager, W. (1988). *Principles of instructional design*, New York, NY: Holt Rinehart and Winston.
- Garfield, J., delMas, R. & Chance, B. (2003). The web-based ARTIST: Assessment resource tools for improving statistical thinking. Recuperado de https://app.gen.umn.edu/artist/articles/AERA_2003.pdf.
- Johnson, R. & P. Kuby, P. (2012). *Estadística elemental*. México: Cengage Learning Editores S.A. de C.V.
- Jonassen, D. & Howland, J (2003). *Learning to solve problems with technology*, Upper Saddle River, NJ: Pearson Education.
- Jonassen, D. & Ionas, I. (2008). Designing effective supports for causal reasoning, *Educational Technology Research and Development*, 56, 287-308.
- Jonassen, D. (2006). On the role of concepts in learning and instructional design," *Education Technology Research Development*, 54(2), 196-206.
- Lem, S., Onghena, P., Verschaffel, L. & Van Dooren, W. (2012). "On the misinterpretations of histograms and boxplots," *Educational psychology: An International Journal of Experimental Educational Psychology*, 33(2), 155-174.
- Lem, S., Onghena, P., Verschaffel, L. & Van Dooren, W. (2013). "The heuristic interpretation of box plots," *Learning and Instruction*. 26, 22-35.
- Mazur, E. (1997). *Peer instruction*, Upper Saddle River, VA: Prentice Hall.
- Schnotz, W. (2005). An integrated model of text and picture. En R. Mayer (Ed.). *The Cambridge Handbook of Multimedia Learning*, (49-69), New York, NY: Cambridge University Press.
- Smith, P. & Ragan, T. (1999). *Instructional Design*. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.
- Triola. M. (2013). *Estadística*. México: Pearson Educación de México S.A. de C.V.



Normas de Publicación para Autores

REVISTA BASES DE LA CIENCIA

BASES DE LA CIENCIA es una Revista Científica Arbitrada, que inició sus actividades de publicación en diciembre 2016, que incluye las áreas de las ciencias: Biológicas, Físicas, Matemáticas, Químicas y Geociencias.

La revista tiene una periodicidad cuatrimestral (tres números en el año), es editada por el Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Técnica de Manabí y recibe artículos tanto en español, inglés y portugués.

La revista BASES DE LA CIENCIA (ISSN WEB: 2588-0764), está dirigida a autoridades, docentes, estudiantes de maestría y doctorado, emprendedores, investigadores, profesionales, instituciones públicas y privadas y todas las personas interesadas por las áreas de ciencias biológicas, físicas, matemáticas, químicas y geociencias. Se encuentra disponible en versión digital con acceso libre (<http://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/index>) y no tiene costos asociados por publicación.

ENVIO DE LOS MANUSCRITOS

La recepción de los artículos es permanente. Los autores que deseen publicar pueden solicitar el registro en la Revista bases de la ciencia, enviando los siguientes datos: nombre, apellido, afiliación institucional, país, temática en la cual estaría dispuesta a ser revisor externo de la revista, al siguiente correo revistabasesdelaciencia@gmail.com y se le asignara un usuario y clave. La clave es temporal puede ser modificada por el investigador. También pueden registrarse directamente en el Open Journal System (<http://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/user/register>) y enviar desde allí el artículo con una carta de intención y aprobación en la que se debe indicar lo siguiente: Nombre(s) completo(s) del(los) autor(es) y direcciones para envío de correspondencia (es necesario colocar una dirección de correo electrónico con el autor o persona encargada con la cual estableceremos contacto). Se debe llenar los 2 formatos siguientes: 1.- Cesión de derechos y 2.- Solicitud de publicación de artículo.





Aunque el autor podrá remitir esta información a través de los correos electrónicos: revistabasesdelaciencia@gmail.com; revistabasesdelaciencia@utm.edu.ec.

El envío de un artículo a la revista implica que ha sido aprobado por todos los autores y están de acuerdo con su contenido en el caso de ser publicado. Se entenderá que el documento sometido a la revista no ha sido enviado, ni publicado en ninguna otra revista científica, es decir, es inédito y original. Aunque todas las contribuciones estarán sujetas a revisión previa, la responsabilidad por el contenido de las mismas recae sobre los autores y no sobre los editores, el comité editorial o la Universidad técnica de Manabí.

Artículos aceptados por la revista Bases de la Ciencia

La revista BASES DE LA CIENCIA publica artículos originales, notas técnicas, comunicaciones cortas, artículos de divulgación y revisiones bibliográficas de investigadores relacionadas con todos los aspectos científicos modernos de las áreas de interés de la revista que representen aportes significativos al conocimiento y que no hayan sido propuestos simultáneamente a otras revistas.

Los artículos originales deben ser el resultado de estudios de campo o de laboratorio que aporten información nueva o el análisis estadístico de una gran colección de resultados de trabajos individuales con el propósito de integrar los hallazgos. Las Notas Técnicas o Comunicaciones Cortas están reservadas a tópicos de interés tales como observaciones, extensión de datos u otros hallazgos que por sí solos no constituyen un estudio comprensivo.

- a. Para los artículos originales se recomienda su división en: Título se escribe con mayúsculas (en inglés, español y portugués), autores y procedencia (dirección postal institucional precisa, incluir Email), Resumen, Palabras Clave, Abstract, Key Words, Introducción, Metodología (si el autor desea puede ser dividido en Materiales y Métodos), Resultados, Discusión (o Resultados y Discusión), Conclusiones, Agradecimientos y Referencias. Las tablas y leyendas de las figuras deben ser incluidas en el texto.
- b. Las Notas Técnicas o Comunicaciones Cortas se escriben de forma corrida con la estructura siguiente: Título, autores y procedencia, Resumen, Introducción, Metodología (si el autor desea





puede ser dividido en Materiales y Métodos), Resultados y Discusión, Conclusiones, Referencias.

c. Las Revisiones se recomienda citar por lo menos 40 referencias del tema a analizar. Su estructura es la siguiente: Resumen, Introducción, Metodología, Desarrollo y discusión, Conclusiones y Referencias. Igualmente, en el envío del manuscrito debe señalarse el área de pertinencia del mismo o la línea de investigación a la cual pertenece.

Los artículos deben someterse a arbitraje en línea a través de la siguiente dirección: <http://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia>. Presentar el artículo mediante comunicación escrita dirigida al Director (a) de la Revista Bases de la Ciencia, en soporte digital a los Correos electrónicos: revistabasesdelaciencia@utm.edu.ec; revistabasesdelaciencia@gmail.com. En la comunicación escrita el autor debe expresar el tipo de documento (artículo original, nota técnica, comunicaciones cortas o revisiones) y sección a la que postula su trabajo (Ciencias físicas, Ciencias Químicas, Ciencias Matemáticas, Ciencias Biológicas o Geociencias). Debe adjuntar la hoja de vida del autor en Correspondencia, y carta de postulación en la que exprese claramente que conoce y acepta la política editorial de Bases de la Ciencia; cede los derechos de reproducción y distribución del artículo; la originalidad del trabajo y su declaración de que no tiene conflicto de intereses (en lo comercial, propiedad intelectual, relevancia académica, financiero). Llenar formatos de Cesión de derechos y Solicitud de publicación.

ESTRUCTURA DE LOS ARTÍCULOS

Normas Editoriales Generales: El texto completo debe hacerse en Word, con todos los márgenes de 2,0 cm, a 1 1/2, letra Times New Roman tamaño 12, escrito por una sola cara. El texto no debe exceder de 20 páginas (incluyendo tablas y figuras). Numere todas las páginas margen inferior derecho. Los números decimales deben ser separados por comas (,) si el trabajo está en español y punto (.) si es en inglés. Los artículos pueden ser escritos en español, portugués o en inglés (en todos los casos el resumen debe estar en los tres idiomas).





1. Título. En español e inglés y no exceder de 20 palabras. Debe ser explicativo y contener la esencia del trabajo, evite el uso de fórmulas o expresiones técnicas muy largas. En mayúscula, negritas y centrado.

2. Autores. Deben indicarse nombres, apellidos y títulos profesionales. Ejemplo:

Dra. Lelly María Useche Castro^{1*}, MSc. Olga Lilian Mendoza Talledo¹, MSc. Rosalba Karen Bravo Saltos¹, MSc. Miguel Ángel Lapo Palacios¹

3. Direcciones. Se debe escribir la dirección completa de la Institución donde se realizó el trabajo y aquellas a las cuales donde pertenecen los autores. Indique con símbolos a que autor corresponde cada dirección. Indique, además, el autor de correspondencia, su dirección electrónica mediante un asterisco (*).

Ejemplo: ¹Departamento de Matemáticas y Estadística. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.

*Autor para correspondencia: luseche@utm.edu.ec

4. Resumen, Abstract y Resúmen. No mayor de 250 palabras. Debe presentarse en español, inglés y portugués. Los resúmenes en los diferentes idiomas deben parecerse lo más posible entre sí. Los autores pueden buscar asistencia con alguna persona que hable el idioma (que el autor no domine) de manera fluida. La traducción mediante el uso de programas de traducción no debe ser utilizada en ningún caso. El resumen contendrá los objetivos, metodología, principales resultados y conclusiones. No incluir referencias y debe escribirse en letra Times New Roman 10 a un solo párrafo.

5. Palabras clave. Deben colocarse al finalizar el resumen, abstract o resúmen. Incluir un máximo de 5 palabras clave, necesarias para la mejor ubicación en los índices internacionales.

6. Introducción. En esta sección, redactada en presente, el autor expresa el propósito del artículo, alcances, el contexto del problema a resolver, para lo cual presenta en forma breve las más recientes e importantes investigaciones relacionadas con el tema, que en promedio tengan 10 años de antigüedad, salvo los clásicos de consulta obligada. Son fundamentales la hipótesis



o pregunta de la investigación y el problema planteado. Finalice con el objetivo de la investigación.

7. Metodología (Materiales y métodos). esta sección tiene como propósito entregar información para que el estudio sea replicado. Se redacta en pasado. Debe señalar cómo estudió el problema, por tanto, expresar claramente todos los protocolos, métodos y características relevantes de los materiales empleados para llegar a los resultados. No debe describirse un método si ya está descrito en la bibliografía; basta con presentar la cita bibliográfica. Si utiliza un método modificado, debe señalarse claramente la modificación. Es fundamental presentar los materiales evaluados (especificaciones técnicas, cantidades, procedencia o método de preparación, nombres genéricos o químicos evitando los comerciales), y el análisis estadístico (debe realizarse mediante software especializado).

8. Resultados. se debe explicar con claridad y precisión los hallazgos, complementados con tablas y figuras las que se enumeran correlativamente a medida que se mencionan en el texto. Evite repetir la información de las tablas y figuras, sólo destaque lo más relevante. Las tablas y figuras deben ser autoexplicativos de tal manera que el lector no tenga que ir al texto para entender la información que se entrega; los nombres científicos, abreviaturas, unidades, entre otros, deben ser incluidos. Se redacta en pasado.

9. Discusión. es la sección para interpretar los hallazgos, exponer su importancia, implicaciones, relaciones con otros estudios, alcances teóricos y aportes al avance de la ciencia. La discusión debe sustentarse en el análisis estadístico y aportes de otros autores con estudios similares, más no en apreciaciones subjetivas. Si el autor desea puede unir resultados y discusión.

10. Conclusión. es una síntesis de los hallazgos y deben corresponderse con los objetivos planteados.

11. Agradecimiento. es opcional y no debe extenderse más allá de las 100 palabras.

12. Tablas. Se deben incluir y citarse en el texto. Deben presentarse con líneas en la parte superior e inferior de los encabezados de la misma, así como al final de la tabla. Se identificarán con números arábigos (Ejemplo: Tabla 1) y llevarán un encabezamiento descriptivo. Las abreviaturas se explicarán al pie de la tabla.



13. Figuras. Se deben incluir y citarse en el texto. Las figuras se identificarán con números arábigos (Ejemplo: Figura 1). Evite el uso de fondos coloreados o grises. Utilice diferentes tipos de líneas y símbolos en figuras con múltiples líneas. Las leyendas sobre los ejes X y Y deben ser de tamaño legible.

14. Fotografías. Se deben incluir y citarse en el texto. Deberán ser reproducciones nítidas. Su tamaño no excederá el de la hoja impresa. No deben montarse. Se indicará la magnificación de las microfotografías.

15. Referencias. Estas deben ser actualizadas. Los autores son responsables de la fidelidad de las referencias. Se debe incluir una lista completa de todas las referencias, las cuáles serán ordenadas alfabéticamente por el apellido del primer autor de cada cita del documento y con sangría francesa, siguiendo las normas de citación y de estilo de la American Psychological Association (APA), última versión.

Cuando las evaluaciones de los árbitros estén completas, éstas serán remitidas a los autores para su corrección y serán recibidas en un lapso no mayor a 45 días (para evaluaciones con ligeras modificaciones) o no mayores a 60 días (para modificaciones sustanciales). De no recibirse en el lapso establecido, se asumirá el retiro del manuscrito por parte del autor o autores.



Solicitud de Publicación de Artículo

Día de Mes del Año

A: Comité Editorial de la Revista Bases de la Ciencia.

Solicito la revisión para su publicación, de considerarlo conveniente, del artículo titulado:

Tema del artículo. Afirmamos que lo expresado en el artículo es creación propia de los autores y las partes seleccionadas de otros documentos científicos han sido correctamente citadas respetando los derechos de cada autor.

Los autores ratifican mediante su firma que se comprometen a cumplir con el **Código de Ética de los Autores** publicado en la segunda página y que han utilizado el documento **Autoevaluación del trabajo antes de ser enviado para su consideración de publicación en la revista** el cual adjuntan al envío de esta solicitud.

En espera de su respuesta, atentamente;

	Nombres y Apellidos	Firma
Autor 1		
Autor 2		
Autor 3		
Autor 4		
Autor 5		
Autor 6		

Observación: El orden de los autores expresa la forma de participación en el artículo.
Describa en un párrafo no mayor de cinco (5) líneas la novedad del trabajo presentado



Código de Ética de los Autores

1. La responsabilidad principal del autor es presentar para su publicación una descripción científica y rigurosa de su trabajo de investigación experimental, teórica o tecnológica, con una discusión objetiva de sus resultados.
2. El artículo presentado debe contener suficientes referencias de fuentes públicas. Esto debe permitir que los profesionales que consulten su trabajo puedan verificar las fuentes. El autor debe citar y dar la adecuada atribución a aquellas publicaciones que han influido y determinado la naturaleza del artículo a publicar con el objetivo de guiar al lector hacia trabajos anteriores que le ayuden a comprender el trabajo publicado.
3. Las informaciones obtenidas por el autor de forma privada, producto de la conversación, la correspondencia o la discusión con terceros, no será usada o declarada en el trabajo sin el permiso explícito de las personas a través de la cuales fue obtenida. La información adquirida a partir de trabajos en fase de revisión o aplicaciones de colaboración, serán tratadas de la misma forma.
4. El artículo presentado no contendrá material plagiado o falseará los datos de la investigación. Además, los autores deben confirmar que el artículo no ha sido publicado en ningún tipo de medio con anterioridad ni tampoco pueden haberlo presentado a otra revista simultáneamente.
5. El autor no debe fragmentar su trabajo de investigación para su publicación. Los autores que han realizado su trabajo sobre un sistema o grupo de sistemas relacionados organizarán la publicación del mismo con el propósito de que cada artículo dé una descripción completa de un aspecto especial del estudio general. No es ético que un autor presente, para su publicación más de un trabajo que describa la misma investigación o proyecto a más de una revista.
6. Es ética la crítica sobre los contenidos y criterios de un trabajo publicado; sin embargo, no es aceptable la crítica personal.
7. Para proteger la integridad de la autoría del trabajo, solamente los profesionales que han colaborado en la investigación o el proyecto y confección del artículo serán enumerados como coautores. El autor principal da fe del hecho de haber incluido a todos los coautores del trabajo al entregar la solicitud de publicación.



Día de Mes del Año

A: Comité Editorial

Cesión de Derechos de Autor

Hacemos constar mediante el presente documento, que el(los) autor(es) cede(n) a la revista Bases de la Ciencia los derechos de autor del artículo titulado:

Título del artículo

El(los) autor(es) autoriza(n) la publicación y difusión del artículo mencionado, según lo disponga la Revista Bases de la Ciencia.

El(los) autor(es) firmantes garantiza(n) que el documento es original, no ha sido publicado total, ni parcialmente, en otra revista o medio de difusión físico o electrónico, ni ha sido presentado para publicar en otra revista.

De igual forma, los autores firmantes reconocemos que la revista asume como suyos los principios del acceso abierto establecidos en las declaraciones de Berlin, Bethesda y Budapest, razón por la cual aceptamos que el trabajo que se presenta sea distribuido en acceso abierto, protegiendo los derechos de autor bajo una licencia “creative commons”.

Declaramos nuestro acuerdo con todo lo expresado en el presente documento.

	Nombres y Apellidos	Firma
Autor 1		
Autor 2		
Autor 3		
Autor 4		
Autor 5		
Autor 6		

Observación: El orden de los autores expresa la forma de participación en el artículo.
Envíe este documento en formato .pdf







CONSEJO EDITORIAL

DIRECTORA

Dra. Yulixis Nohemi Cano de Torres. (**Ecuador**)/ycano@utm.edu.ec,
yulixiscano@gmail.com / Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí

EDITOR GENERAL

Dr. Julio Cesar Torres Puentes. (**Ecuador**)/jctorres@utm.edu.ec, jtorres11912@gmail.com
/ Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí

EDITORES POR SECCIÓN

BIOLOGÍA

Dr. Carlos L. Vásquez Freytez (**Ecuador**)/ca.vasquez@uta.edu.ec / Facultad de Ciencias
Agropecuarias. Universidad Técnica de Ambato (UTA)

MATEMÁTICA

Dr. Miguel José Vivas-Cortez. (**Ecuador**)/mjvivas@puce.edu.ec / Pontificia Universidad
Católica del Ecuador (PUCE)

Dr. Michel Enrique Gamboa
Gaus. (**Cuba**)/michelgamboagraus@gmail.com, michelgg@ult.edu.cu, michelenriquegg@ya
hoo.com/ Universidad de las Tunas, Las Tunas (Cuba)

QUÍMICA

Dr. Gilberto Colina. (**Venezuela**)/gjcolinaa@gmail.com / Universidad del Zulia.





Dra. Elvia Victoria Cabrera
Maldonado. (**Ecuador**)/vicky_label2000@yahoo.es, vicky_label2000@hotmail.com /
Facultad de Ingeniería Química. Universidad Central del Ecuador

APOYO LOGÍSTICO E INFORMÁTICO

Ing. Rosalba Karen Bravo Saltos. (**Ecuador**)/rosybravo777@gmail.com / Instituto de
Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí

Ing. Carlos Rivero Torres. (**Ecuador**)/crivero@utm.edu.ec / Universidad Técnica de Manabí

CORRECTOR DE TRADUCCIÓN DEL IDIOMA ESPAÑOL AL INGLÉS

Ing. Angel E. Hernandez B. (**Jamaica**)/aehb86@gmail.com / University Technology of
Jamaica

MSc. Ocando Pereira Yaneth Chiquinquirá. (**Ecuador**)/ychocando@gmail.com / Universidad
de Cuenca

CORRECTOR DE TRADUCCIÓN DEL IDIOMA ESPAÑOL AL PORTUGUÉS

Dra. Noroska Gabriela Salazar
Mogollón. (**Ecuador**)/noroska.salazar@ikiam.edu.ec / Universidad Regional Amazónica.
IKIAM

COMITE EDITORIAL INTERNO

Dr. Enrique Ruiz Reyes. (**Ecuador**)/eruiz@utm.edu.ec / Instituto de Ciencias
Básicas. Universidad Técnica de Manabí

Dr. Jean Carlos Pérez Parra. (**Ecuador**)/jcarlosp@utm.edu.ec / Instituto de Ciencias
Básicas. Universidad Técnica de Manabí





Dr. Victor Ernesto Marquez Perez. (**Ecuador**)/victore.marquezp@gmail.com / Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí

Dra. Lelly Maria Useche Castro. (**Ecuador**)/luseche@utm.edu.ec / Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí

MSc. Felipe Rumbaut León (**Ecuador**)/frumbaut@gmail.com / Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Técnica de Manabí

Dr. Roberto Bauza Fermin. (**Ecuador**)/rbauza7@gmail.com, robertomapor@gmail.com / Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Manabí

COMITE EDITORIAL EXTERNO

MSc. Romualdo S. Silva Jr. (**Brasil**)/romu.fisica@gmail.com / Departamento de Física. Universidad Federal de Sergipe

Dr. Tony Jesus Viloría Ávila. (**Ecuador**)/tviloría63@yahoo.es, tviloría@ups.edu.ec / Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana

Dra. Marinela Nazareth Colina Rincón. (**Venezuela**)/colinamarinela@gmail.com / Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela. Presidente de la empresa Innovación Ambiental Quitoano (INNOVAQUITO C.A)

Dra. Belgica B. Bravo de Salcedo. (**Venezuela**)/marinelacolina@gmail.com / Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia

Dr. José Gerardo Ortega Fernández (**Venezuela**)/jgoft1970@gmail.com / Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia

Dr. Ullrich Stahl. (**Ecuador**)/ustahl@uce.edu.ec / Facultad de Ingeniería Química. Universidad Central del Ecuador

Dr. Julio Marín. (**Venezuela**)/jmarin@fing.luz.edu.ve / Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia





Dr. Ever Darío Morales Avendaño. (**Ecuador**)/evermster@gmail.com / Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil

Dra. Noroska Gabriela Salazar Mogollón. (**Ecuador**)/noroska.salazar@ikiam.edu.ec / Universidad Regional Amazónica. IKIAM

Dra. Nacarid del Valle Delgado Parra. (**Chile**)/nacadel@gmail.com / Universidad Andrés Bello. Facultad de Ingeniería

MSc. Manuel S. Álvarez
Alvarado. (**Ecuador**)/manuel.alvarez.alvarado@ieee.org, manuel.alvarez.alvarado@gmail.com / Facultad de Ingeniería en Electricidad y Computación (FIEC). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Dr. Raúl Rodríguez Herrera. (**México**)/rrh961@hotmail.com / Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila

Dra. María Natividad Berradre Ramos. (**Venezuela**)/marinaty@gmail.com / Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia

Dr. Jesús Gabalán Coello. (**Colombia**)/jgabalán@uao.edu.co / Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Occidente

Dr. Saba Rafael Infante. (**Ecuador**)/Sinfante64@gmail.com / Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay

Dra. Karelen Cristina Araujo Vargas. (**Venezuela**)/karelenaraujo@gmail.com / Universidad del Zulia (LUZ)

Dra. María Tere Varela Costa. (**Venezuela**)/mtvarela@usb.ve / Universidad Simón Bolívar (USB)

Dra. Viviana García Mir. (**Ecuador**)/vgarciamir@yahoo.es / Universidad Técnica de Machala





MSc. Kalina Fonseca Largo. (**Ecuador**)/kalina.fonseca@utc.edu.ec / Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)

Dra. Mercy Ilbay Yupa. (**Ecuador**)/merckyu@hotmail.com / Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)

Dra. Lauris Urribarrí. (**EEUU**)/laurisurribarri@gmail.com / Investigadora Independiente

Dra. Zoraida M. Sivoli Barrios. (**Ecuador**)/zoraida.sivoli@epoch.edu.ec / Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Dra. Marianela Luzardo Briceño. (**Colombia**)/manelubri@gmail.com / Pontifical Bolivarian University. Faculty of Industrial Engineering

Dr. Franklin José Camacho. (**Ecuador**)/cfranklinj@gmail.com / Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay

Dr. Yonathan Parra. (**Ecuador**)/ydparra@uce.edu.ec / Facultad de Ingeniería en Geología, Minas Petróleos y Ambiental (FIGEMPA). Universidad Central del Ecuador

Dr. Luis Fernando Mejias. (**Ecuador**)/fmejias.ula@gmail.com/lfmejias@espol.edu.ec / Escuela superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Dr. Edgar Fabián Espitia Sarmiento. (**Ecuador**)/edgar.espitia@ikiam.edu.ec / Universidad Regional Amazónica (IKIAM)

MSc. Juan Miguel Espinosa Soto. (**Ecuador**)/juanmiguelmanos@gmail.com / Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE)

Dr. Ernesto Mora Queipo. (**Venezuela**)/emoraqueipo@gmail.com / Universidad del Zulia (LUZ)





MSc. Juan Sebastian Acero Triana. (**EEUU**)/jsa2@illinois.edu / University of Illinois

Dr. Juan Carlos Osorio López. (**Ecuador**)/osoriojuanc@gmail.com / Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE)

Dra. Marta Beatriz Infante Abreu. (**Cuba**)/martica840527@gmail.com / Universidad Tecnológica de la Habana José Antonio Echeverría (CUJAE)

Dr. Víctor Alberto Granadillo Morán (**Venezuela**)/vgranadillo@gmail.com / Universidad del Zulia (LUZ)

Dr. Carlos Daniel Ayala Montilla (**Venezuela**)/carlosdaniel55@gmail.com / Universidad de los Andes (ULA)

Dr. Alexis José Zambrano García (**Venezuela**)/alexiszve@gmail.com / Universidad de los Andes (ULA)

Dr. Argenis Montilla Pacheco (**Ecuador**)/argenismontillap@gmail.com / Universidad Layca Eloy Alfaro de Manabí (ULEAM)

Dra. Brightdoom Márquez de García (**Venezuela**)/bmarquez2001@gmail.com / Universidad de Oriente (UDO)

Dr. López González Wilmer Orlando (**Venezuela**)/lgwilmer@yahoo.com / Universidad de los Andes (ULA)

Dra. Zenaida Castillo (**Ecuador**)/zcastillo@yachaytech.edu.ec / Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay

Dr. Ernesto Antonio Ponsot Balaguer (**Ecuador**)/ernesto.pb@gmail.com / Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay





Dr. Isidro Rafael Amaro M. (**Ecuador**)/iamaro@yachaytech.edu.ec / Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay

Dr. Alberto Luis Rosa (**Argentina**)/alrosa@ucc.edu.ar / Universidad de Córdoba

Dr. Ebner Alexander Pineda Mogollón (**Ecuador**)/ebner.pineda@gmail.com / Escuela Politecnica del Litoral (ESPOL)

MSc. Francisco Javier Quiroz Chávez (**Ecuador**)/francisco.quiroz@epn.edu.ec / Escuela Politecnica Nacional (EPN)

MSc. Diego German Piccardo Silva (**Uruguay**)/dpiccardo@fagro.edu.uy / Universidad de la República. Facultad de Agronomía

Dr. Alexander López (**Ecuador**)/tula1971@gmail.com / Escuela Politécnica del Litoral (ESPOL)

Dra. Esther Desireé Gutiérrez Moreno (**Venezuela**)/sterguti@gmail.com / Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

Dr. Rubén E. Cadenas Martínez (**Ecuador**)/ruben.cadenas@unesum.edu.ec / Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM)

MSc. Richard Pérez Roa (**Venezuela**)/rperez1984@gmail.com / Universidad Central de Venezuela (UCV)

Asesor de Gestión e Imagen

Dr. Ulises Mestre. (**Cuba**)/umestre@utm.edu.ec / Universidad de las Tunas, Las Tunas (Cuba)





Los Miembros del comité editorial interno y externo actúan como pares revisores de los trabajos por el sistema doble ciego.

Revista del Instituto de Ciencias Básicas

e-ISSN: 2588-0764

E-Mail: revistabasesdelaciencia@gmail.com/revistabasesdelaciencia@utm.edu.ec

Dirección: Av. Urbina y Che Guevara

Apartado postal: 82

Teléfonos: (593-5) 2651613

Portoviejo - Manabí - Ecuador

