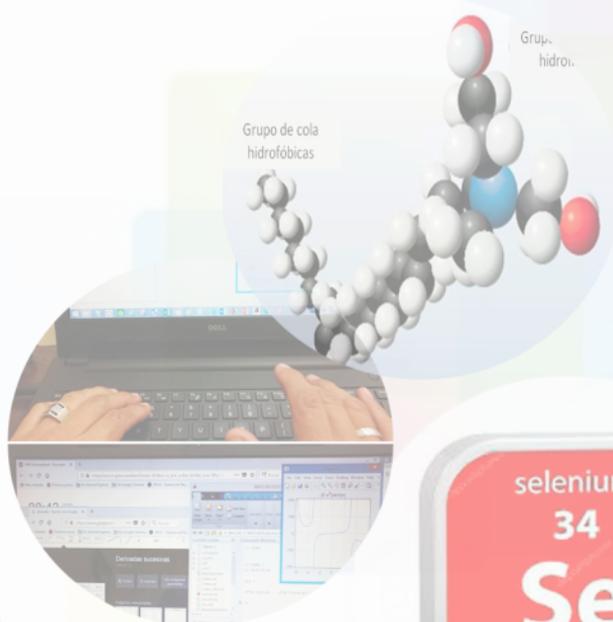




REVISTA BASES DE LA CIENCIA

ISSN 2588-0764 - Instituto de Ciencias Básicas



Mayo - Agosto 2018

ISSN 2588-0764

Vol. 3 Num.

2



Índice

Ciencias Químicas

Comportamiento de agregación de noveles surfactantes de par iónico 1
Belgica Bravo, Gerson Chávez, Nelson Márquez, Nacarid Delgado, Ana Cáceres,
Milangel Luzardo, Iran Parra, Mariana Collins, Azeneth Borja

**Hidrogeles derivados de acrilamida y ácido itacónico como soporte en
medios de cultivo de plántulas de papa** 11

Jesús Miguel Contreras Ramírez, Jessica Juárez, Juan Jaimez

**Especiación de Selenio en muestras de sangre y plasma en pacientes con
leucemia por HPLC-ICP-MS** 31

Jervis Nava, Marinela Colina, Carolina Sthormes, Ana Cáceres, Brinolfo
Montilla

Ciencias Matemáticas

**Asistencia de softwares matemáticos en el estudio de cálculo diferencial en
estudiantes de ingeniería** 61

Ulbio Colon Duran Pico, Leonor Alexandra Rodríguez Alava

Números primos; método gráfico de la conjetura de GOLDBACH 77

Yandry Marcelo Intriago Delgado

Guía de autores 96

Créditos 106

COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN DE NOVELES SURFACTANTES DE PAR IÓNICO

Dra. Bélgica Bravo^{1*}, Dr. Gerson Chávez¹, Dr. Nelson Márquez¹, Dra. Nacarid Delgado¹, Dra. Ana Cáceres², Dra. Milangel Luzardo¹, Dr. Iran Parra¹, Lic. Mariana Collins¹, Lic. Azeneth Borja¹

¹Laboratorio de Petroquímica y Surfactantes, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela.

²Laboratorio de Desarrollo de Métodos de Análisis, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela.

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

Recibido: 7-2-2018 / Aceptado: 15-5-2018

RESUMEN

Los ácidos alquilcarboxílicos pueden dar origen a la formación de una especie iónica con características anfífilas que disminuye la tensión superficial de un sistema agua/aire. El tipo de contraión de estas especies juega un papel fundamental en las propiedades superficiales del compuesto. Se preparó una novedosa clase de surfactantes de par iónico (SPI) por neutralización de cantidades equimolares del ácido carboxílico con una base de tipo ciclohexilamina (cHACn) bajo condiciones suaves de reacción. Se estudió el comportamiento de agregación por tensión superficial. Los compuestos obtenidos disminuyeron la tensión superficial presentando baja concentración micelar crítica (CMC) y por tanto una mayor actividad superficial. La CMC de todos los compuestos estudiados disminuyó con la longitud de la cadena alquílica aniónica (n).

Palabras clave: ácidos alquilcarboxílicos, surfactantes de par iónico, comportamiento de agregación, tensión superficial.

AGGREGATION BEHAVIOR OF NOVEL ION PAIR SURFACTANTS

ABSTRACT

The alkylcarboxylic acids can give origin to the formation of ionic species with amphiphilic characteristics that decreases the surface tension of a water/air system. The type of counterion of these species plays a fundamental paper in the surface properties of the compound. Novel class ion pair surfactants (IPS) were prepared by neutralization of equimolar amounts of carboxylic acid with a base of type cyclohexylamine (cHACn) though mild reaction conditions. The aggregation behavior through surface tension was studied. The compounds obtained reduced the surface tension presenting low critical micellar concentration (CMC) and therefore a greater surface activity. The CMC of all compounds studied decreased with the length of the anionic alkyl chain (n).

Key words: Alkylcarboxylic acids, ion pair surfactant, aggregation behavior, surface tension.

COMPORTAMENTO DE AGREGAÇÃO DE NOVOS SURFACTANTES DE PAR IÔNICO

RESUMO

Os ácidos alquilcarboxílicos podem originar a formação de espécies iônicas com anfífilos característicos que diminuem a tensão superficial de um sistema água / ar. O tipo de contra-íon dessas espécies desempenha um papel fundamental nas propriedades da superfície do composto. Novos surfactantes de par de íons de classe (IPS) foram preparados por neutralização de quantidades equimolares de ácido carboxílico com uma base de ciclohexilamina tipo (cHACn) por condições de reação suaves. O comportamento de agregação foi estudado pela tensão superficial. Os compostos obtidos reduzem a tensão superficial apresentando baixa concentração micelar crítica (CMC) e, portanto, maior atividade superficial. O CMC de todos os compostos estudados diminuiu com o comprimento da cadeia alquílica aniônica (n).

Palavras-chave: Ácidos alquilcarboxílicos, surfactante de pares iônicos, comportamento de agregação, tensão superficial.

1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos carboxílicos son de gran interés debido a su comportamiento semejante a un surfactante además de encontrarse en productos naturales. Estos al asociarse con una base orgánica forman un surfactante de par iónico (SPI) o contraión orgánico, cuyas moléculas presentan estructuras muy particulares (Vlasta & Tea, 2017; Freitas *et al.*, 2013; Jinglin, Depeng & Shengyu, 2012). Los SPI son compuestos anfífilos formados en su mayoría por un surfactante aniónico de tipo carboxilato que puede provenir de fuentes naturales, unido a una parte orgánica, que conjuntamente alteran la tensión interfacial de un sistema agua/hidrocarburo. Este tipo de contraión, una vez que ha modificado la tensión entre dos líquidos inmiscibles, promueve la solubilización de los mismos, formando así, estructuras micelares de diferentes geometrías. La aplicación de estos compuestos depende de su propiedad tensoactiva, la cual se estudia a través de medidas de tensión superficial determinando la concentración micelar crítica (CMC) (Moradi, Sohrabi & Najafi, 2013; S. Samy, Ismail & Abdallah, 2016; Asadov *et al.*, 2015; Xiu *et al.*, 2017; Hanno *et al.*, 2015; Santana, Fasolin & Cunha, 2012; Ningning, Robert & Rennie, 2012). Este parámetro es un factor importante en la caracterización de la auto-asociación de compuestos anfífilos y su posible uso en la industria (Khan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Domanska *et al.*, 2013; Danov, Kralchevsky & Ananthapadmanabhan, 2013; Caili *et al.*, 2014; Mrinmoy *et al.*, 2014; Douliez & Gaillard, 2014). El propósito de este estudio es evaluar el comportamiento de agregación en solución acuosa de nuevos surfactantes de tipo alquilcarboxilato de ciclohexilamonio a través de medidas de tensión superficial. Los surfactantes de par iónico obtenidos pueden ser de utilidad en la formulación de emulsiones

2. METODOLOGIA

2.1. Reactivos y Materiales

Ácido octanoico (C8), ácido decanoico (C10), ácido dodecanoico (C12), todos Merck, 99%; ciclohexilamina (Merck, 99%) y como solvente de reacción hexano (Fisher Scientific, 95%). Todos los reactivos se emplearon si purificación previa. El agua se purificó empleando un sistema de filtración de agua Mili-Q 18.3 MX.

2.2. Preparación de los surfactantes alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio

La preparación de los alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio se llevó a cabo mediante una reacción ácido-base en proporción equimolar. En un balón de 100 mL se agregó el ácido correspondiente y 15 mL de hexano, una vez disuelto el ácido se adicionó la ciclohexilamina y se mezclaron con agitación magnética constante durante 4 horas a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente se indujo a la precipitación a 4 °C, se filtró al vacío y se lavó con porciones de hexano frío hasta la formación de los cristales blancos, seguidamente se colocó en el desecador durante 12 h. Para la caracterización por espectrometría FTIR (Shimadzu, 8400S) se pesaron 2 mg de los alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio y se mezclaron con 148 mg de bromuro de potasio (Merck, 99%) para la preparación de las pastillas, luego se homogenizó en un mortero de ágata y se prensó durante 5 min a una presión de 10 toneladas. Se realizó un barrido espectral de 400 a 4000 cm^{-1} a un número de barridos igual a 25.

2.3. Medidas de tensión superficial

Para las medidas de tensión superficial, se prepararon soluciones acuosas a diferentes concentraciones de los alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio: 1-130 mM (cHAC8), 2,5-150 mM (cHAC10) y 0,1-20mM (cHAC12). Las soluciones se dejaron estabilizar por 24 horas y se midió la tensión superficial para cada uno empleando el método del anillo de Du Noüy (tensiómetro de Du Noüy, Marca Central Scientific). Una vez sumergido el anillo en el líquido se dejaron transcurrir 10 minutos (25 °C) que permitieron tanto el equilibrio del anillo como la estabilidad de la solución. Todas las mediciones se realizaron por quintuplicado y en cada caso se reportó el valor promedio. A partir de las curvas de tensión superficial se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos involucrados en la etapa de adsorción y asociación (Chávez *et al.*, 2009; Anouti *et al.*, 2009; Bordes, Tropsch & Holmbergm, 2009; Bravo *et al.*, 2015; Fameau & Zembb, 2014):

Concentración micelar crítica (CMC):

$$\ln CMC = \frac{\gamma_2 - \gamma_1}{a_2 - a_1} \quad (1)$$

Donde, γ_1 y γ_2 representan el intercepto con el eje de la ordenada (en mN/m) y a_1 y a_2 corresponden a las pendientes ($\Delta\gamma/\Delta\ln C$)

Concentración de exceso superficial máximo, Γ (mol cm⁻²): Cantidad adsorbida de surfactante por unidad de superficie

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial\gamma}{\partial\ln C} \right)_T \quad (2)$$

Donde R es la constante de los gases (8.31 J mol⁻¹ K⁻¹), T es la temperatura absoluta, γ es la tensión superficial, C la concentración del surfactante, $\left(\frac{\partial\gamma}{\partial\ln C} \right)_T$ la pendiente por debajo de la CMC en la curva de tensión superficial.

Área mínima, A_{\min} (cm² molécula⁻¹): grado de interacción entre moléculas de surfactante y la forma en la cual están adsorbidos en la interface agua/aire

$$A_{\min} = \frac{1}{\Gamma N} \quad (3)$$

Donde N es el número de Avogadro (6,02x10²³ moléculas mol⁻¹).

Energía libre de adsorción ($\Delta G^\circ_{\text{ads}}$):

$$\Delta G_{\text{ads}} = RT \ln CMC - N(\pi_{\text{CMC}})(A_{\min}) \quad (4)$$

El producto $N(\pi_{\text{CMC}})(A_{\min})$, en J mol⁻¹, expresa el trabajo que implica la transferencia de la molécula de surfactante desde una monocapa hacia la micela.

Energía libre de micelización ($\Delta G^\circ_{\text{mic}}$):

$$\Delta G_{\text{mic}} = RT \ln CMC \quad (5)$$

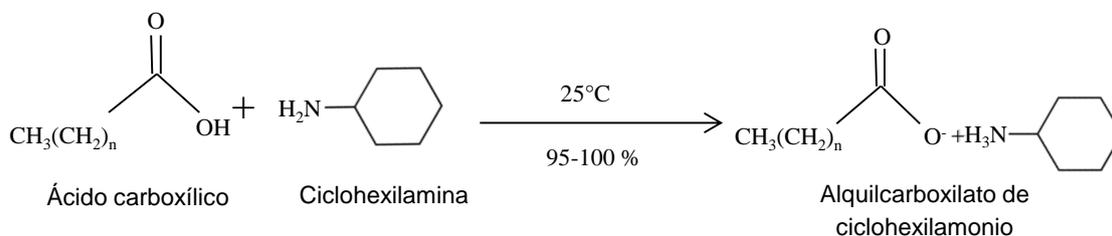
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de surfactantes de par iónico alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio

En el **esquema 1** se observa la reacción química del proceso de síntesis de obtención del alquilcarboxilato de ciclohexilamonio, en la cual se produce un intercambio de protón entre el ácido y la amina, mediante un equilibrio ácido-base.

Cabe destacar, que tanto el ácido graso como la amina estudiada son solubles en solventes apolares como el n-hexano utilizado, el cual posee un momento dipolar cero ($\mu=0,00\text{D}$) y baja

constante dieléctrica ($\epsilon = 1,88$) lo cual conduce rápidamente a la precipitación del compuesto de par iónico, en efecto, la precipitación de esta nueva familia de tensoactivo, es el resultado de un compromiso, entre la solubilidad del solvente apolar empleado en el medio de reacción, las cadenas alquílicas de las moléculas involucradas en dicha reacción y la baja solvatación de sus grupos polares.



Esquema 1. Preparación de surfactantes alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio

La caracterización por espectrometría FTIR dio evidencia de la formación de los surfactantes de par iónico. En la **figura 1** se aprecia la aparición de la banda intensa de alargamiento simétrica y asimétrica del grupo amonio a $2617\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$, y una banda de deformación a $1523\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$, lo que confirma la formación de la amina protonada. Igualmente, se observa la aparición de nuevas bandas de alargamiento asimétricas y simétricas a 1633 y 1399 cm^{-1} del grupo carboxilato, así como la aparición de una banda de deformación a 722 cm^{-1} .

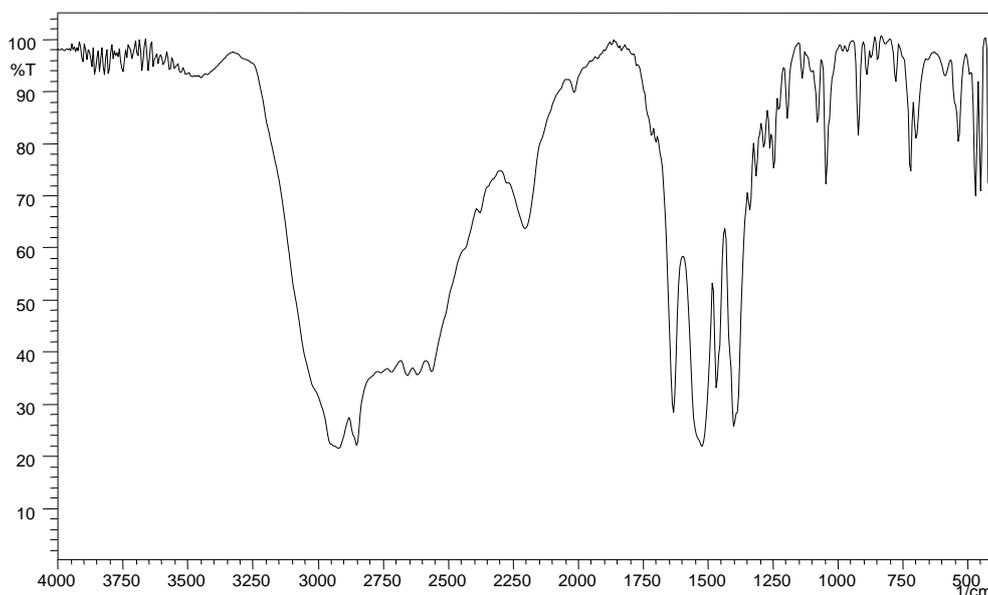


Figura 1. Espectro FTIR del dodecanoato de ciclohexilamonio.

3.2. Medidas de tensión superficial

Los procesos de adsorción y micelización de las moléculas de surfactantes se consideran como una transición de fase. Cuando la concentración de surfactante aumenta en la fase acuosa, se produce rápidamente la saturación del área interfacial y, como consecuencia, el número de moléculas disueltas tiende a aumentar. La **figura 2** muestra la curva de tensión superficial en función del logaritmo de la concentración del dodecanoato de ciclohexilamonio. En la gráfica se observa que la tensión superficial disminuye progresivamente con el incremento de la concentración molar de la especie anfífilica. El punto de corte en la curva corresponde al valor de la CMC. Vale la pena señalar que la ausencia de un mínimo alrededor del punto de intercepción confirma la alta pureza de estos SPI.

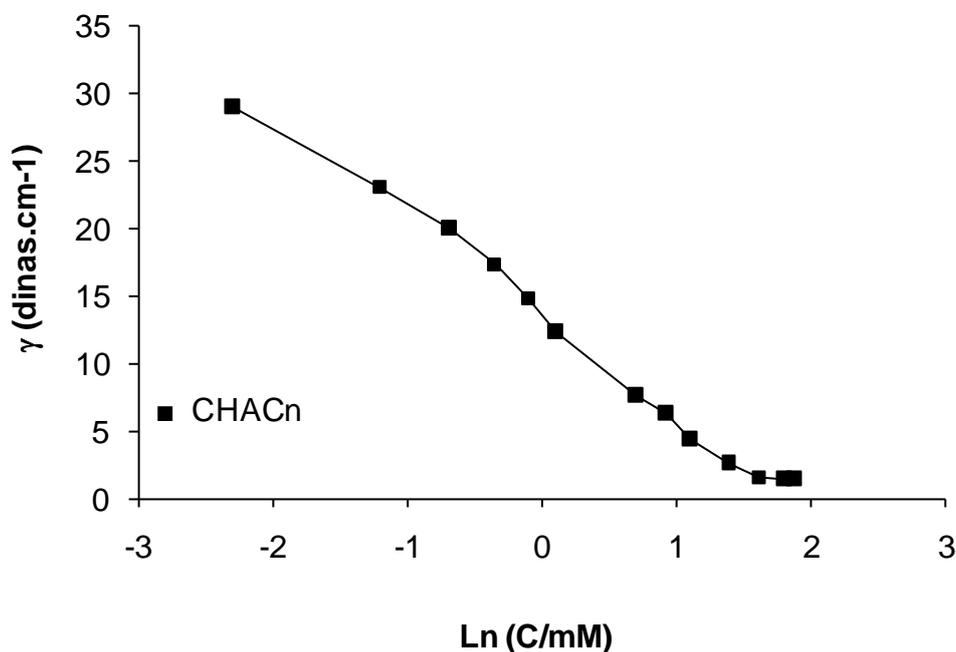


Figura 2. Tensión superficial en función de la concentración para el surfactante dodecanoato de ciclohexilamonio.

Los valores de la CMC disminuyen con la longitud de la cadena alquílica del carboxilato (tabla 1) debido al incremento de la hidrofobicidad, originando mayores migraciones y adsorciones de estas moléculas a la superficie agua/aire, y por tanto mayor reducción en la tensión superficial. Los alquilcarboxilatos de par iónico estudiados presentan menor CMC que los alquilcarboxilatos de sodio y los alquilcarboxilatos de etanolamonio (Bravo *et al.*, 2015). Esta diferencia es debida a la débil hidratación del contraión orgánico, lo cual hace más efectivo la disminución de las repulsiones electrostáticas entre los grupos y en consecuencia facilita la agregación micelar (Wang *et al.*, 2012; Bordes *et al.*, 2009; Fameau & Zembb, 2014). El contraión orgánico induce por tanto que predomine el efecto hidrófobo, lo que ocasiona que las moléculas de surfactante migren rápidamente a la superficie para satisfacer su afinidad

polar-apolar, permitiendo la formación de una fuerte asociación del par iónico (Wang & Wang, 2014).

Tabla 1. Parámetros obtenidos de las medidas de tensión superficial para los alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio.

SPI	^a CMC (mmol L ⁻¹)	^b $\gamma_{\text{CMC}} \pm 0.1\%$ (dinas cm ⁻¹)	^c $\Gamma_{\text{max}} \pm 0.1\%$ ($\mu\text{mol m}^{-2}$) ^c	^d A _{min} ± 0.01 (nm ²)	^e ΔG° ads (Kj mol ⁻¹)	^f ΔG° mic (Kj mol ⁻¹)
cHAC ₈	31,1	37,33	0,438	0,380	-21,56	-8,50
cHAC ₁₀	18,3	29,46	0,369	0,450	-28,80	-10,67
cHAC ₁₂	4,4	22,12	0,228	0,730	-49,09	-13,07

^aEl error estimado para el valor de CMC obtenido es menor al 5%; ^btensión superficial al valor de CMC; ^cExceso superficial máximo; ^dÁrea mínima; ^eEnergía libre de adsorción; ^fEnergía libre de micelización.

En la **tabla 1**, se puede observar como el contraión y la cadena hidrocarbonada influye en los parámetros fisicoquímicos. Evidentemente, siendo el A_{min} (**Figura 3**) inversamente proporcional al Γ_{max} , es de esperar una disminución de este último parámetro a medida que aumenta el A_{min}.

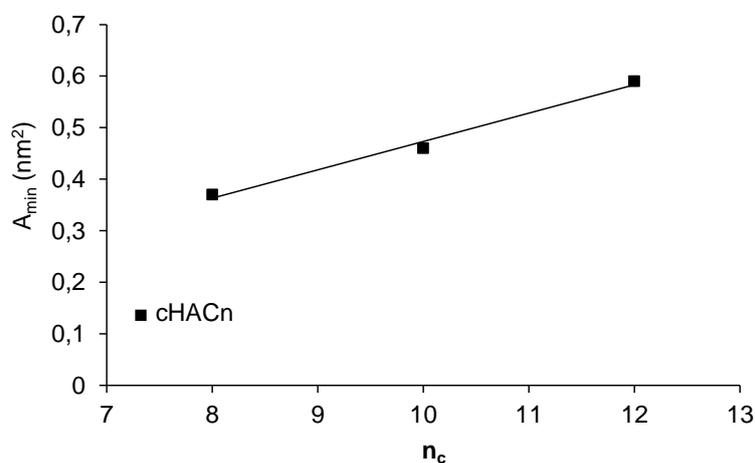


Figura 3. Variación del A_{min} con el número de átomos de carbono de la cadena alquílica n_c, para la familia alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio.

Esto probablemente se deba a que mientras más larga es la cadena alquílica como se indicó anteriormente menor es su solubilización, lo que significa que el alquilcarboxilato de ciclohexilamonio tiene preferencia por la interfase y no por el seno de la disolución, provocando una menor cantidad de moléculas adsorbidas en la interfase y por tanto mayor espacio ocupado por dichas moléculas.

A partir de la CMC, el surfactante produce estructuras organizadas llamadas micelas, en las cuales el surfactante alcanza una posición favorable. De acuerdo con la ley de Gibbs, aplicado a los sistemas de equilibrio, la adsorción de un tensoactivo en la interfase aire/agua conduce a una reducción de la tensión superficial de la solución (**Figura 4**).

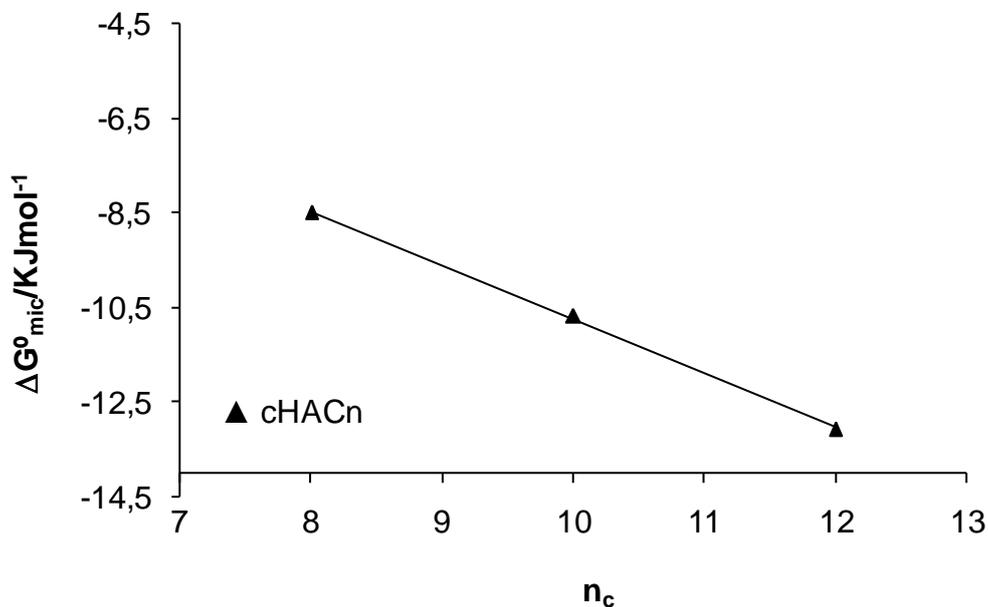


Figura 4. Variación del ΔG°_{mic} con el número de átomos de carbono de la cadena alquílica n_c , para la familia alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio.

Los resultados demuestran que la micelización en solución acuosa de los SPI estudiados es un proceso espontáneo, es decir, que el cambio en la energía libre de este proceso es negativo. En la **tabla 1** se listan los valores de ΔG_{mic} para todos los SPI estudiados. La espontaneidad del proceso se atribuye a la repulsión entre las diferentes partes hidrófobas y el solvente polar. Los resultados indican que los valores de la energía libre de Gibbs se deben primeramente a una contribución entrópica, un efecto común en los procesos de agregación impulsados por la hidrofobia. Sin embargo, la variación en el porcentaje de la energía libre de Gibbs es debido a que el término entálpico incrementa con la longitud de la cadena.

4. CONCLUSIONES

Se prepararon y estudiaron compuestos de tipo alquilcarboxilatos de ciclohexilamonio, con una cadena hidrocarbonada con un número de carbonos $n = 8 - 12$, como potenciales nuevos surfactantes en solución acuosa. La nueva familia de SPI estudiada mostró una alta capacidad de agregarse en solución acuosa, demostrando su potencial aplicabilidad como

surfactantes. La disminución en la Concentración Micelar Crítica (CMC) con el incremento de la longitud de la cadena alquílica aniónica (n) es atribuible a la naturaleza del contraión orgánico del SPI.

5. AGRADECIMIENTO

A la Universidad del Zulia a través del CONDES-LUZ por el financiamiento de los proyectos y programas de investigación.

6. REFERENCIAS

- Anouti M., Jones J., Boisset A., Jacquemin J., Caillon-Caravanier M., Lemordant D. (2009). Aggregation behavior in water of new imidazolium and pyrrolidinium alkylcarboxylates protic ionic liquids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 340 (1), 104-111
- Asadov Z., Rahimov R., Mammadova K., Ahmadova G., Ahmadbayova S. (2015). Effect of organic counterions on the properties of n-lauryl diisopropanolamine surfactants. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 36 (7), 1022-1028.
- Bordes R., Tropsch J., Holmberg K. (2009). Counterion specificity of surfactants based on dicarboxylic amino acids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338, 529-536,
- Bravo B., Chávez G., Gamarro C., Moreno A., Márquez N., Delgado N., Cáceres A., Luzardo M., Parra I. (2015). Physico-chemical characterization of new amphiphilic ion pairs based on alkylcarboxylic acids. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 5(1), 926-930
- Caili D., Mingyong D., Yifei L., Shilu W., Jianhui Z., Ang C., Dongxu P., Mingwei Z. (2014). Aggregation behavior of long-chain piperidinium ionic liquids in ethylammoniumnitrate. *Molecules*. 19 (2), 20157-20169.
- Chávez G., Arenas G., Parra I., Luzardo M., Bravo B., Ysambert F., Márquez N. (2009). Estudio de las variables fisicoquímicas en el proceso de micelización de mezclas de surfactantes no-iónicos polietoxilados en la interfase agua/aire. Parte I: efecto de la salinidad. *CIENCIA* 17(3), 235-244
- Danov K., Kralchevsky P., Ananthapadmanabhan K. (2013). Micelle-monomer equilibria in solutions of ionic surfactants and in ionic-nonionic mixtures: A generalized phase separation model. *Advances in Colloid Interface Sci.* 206, 17-45
- Doulliez J., Gaillard C. (2014). Self-assembly of fatty acids: from foams to protocell vesicles. *New Journal of Chemistry*, 38 (11), 5142-5148.
- Domanska U., Skiba K., Zawadzki M., Paduszynski K., Krolkowski M. (2013). Synthesis, physical, and thermodynamic properties of 1-alkyl-cyanopyridinium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide ionic liquids. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 56, 153-161
- Fameau A., Zemb T. (2014). Self-assembly of fatty acids in the presence of amines and cationic components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207 (1), 43-64.
- Freitas D., Franc I., Félix A., Martins J., Aparecida M., Melob V., Barros L. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 101, 34-43,
- Hanno I., Centini M., Anselmi C., Bibiani C. (2015). Green Cosmetic Surfactant from Rice: Characterization and Application. *Cosmetics*. 2 (4), 322-341.

- Jinglin T., Depeng M., shengyu F. (2012). Effect of headgroups on the aggregation behaviour of cationic silicone surfactants in aqueous solution. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect. A.* 417, 146-153,
- Khan F., Siddiqui U., Khan I., Kabir D. (2012). Physicochemical study of cationic gemini surfactant butanediyl-1,4-bis (dimethyldodecylammonium bromide) with various counterions in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 394, 46-56.
- Moradi T., Sohrabi B., Najafi M. (2013). Adsorption and micellar phase properties of anionic surfactant in the presence of electrolyte and oil at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria.* 337, 370-378.
- Mrinmoy B., Madhab D., Pabitra N., Sharmistha G., and Tarun K. (2014). Imidazolium-based ionic liquids with different fatty acid anions: phase behavior, electronic structure and ionic conductivity investigation. *The Journal of Physical Chemistry*, 16 (30), 16255-16263.
- Ningning Li., Robert K. T., Rennie A. (2012). Adsorption of non-ionic surfactants to the sapphire/solution interface – Effects of temperature and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369, 287-293.
- Samy S., Ismail A., Abdallah I. (2016). Surface parameters and biological activity of n-(3-(dimethyl benzyl ammonio) propyl) alkanamide chloride cationic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 19 (3), 501-510.
- Santana R., Fasolin L., Cunha R. (2012). Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. *Colloids and Surfaces A*, 398, 54-63.
- Vlasta T.; Tea M. (2017). The review on properties of solid cationic surfactants: Main applications and perspectives of new cationic surfactants and compounds with cationic assisted synthesis. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 38 (5), 15-44
- Wang J. and Wang H. (Eds.). (2014). Aggregation in systems of ionic liquids. In: Zhang S., Wang J., Lu X., Zhou Q. Structures and interactions of ionic liquids, structure and bonding. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 151 (1), 39-77.
- Wang X., Yu L., Jiao J., Zhang H., Wang R., Chen H. (2012). Aggregation behavior of COOH-functionalized imidazolium-based surface active ionic liquid in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids*, 173, 103-107
- Xiu Y., Xiaoyun F., Qintang L., Xiao C., Chuanyi W. (2017). Aggregation behaviors of alkyl ether carboxylate surfactants in water. *Journal of Molecular Liquids*, 227 (1), 161-167.

HIDROGELES DERIVADOS DE ACRILAMIDA Y ÁCIDO ITACÓNICO COMO SOPORTE EN MEDIOS DE CULTIVO DE PLÁNTULAS DE PAPA

Dr. Jesús Contreras^{1*}, Lic. Jessica Juárez¹, Lic. Juan Jaimez²

¹Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela.

²Laboratorio de Cultivo y Tejido Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Mérida 5101-A, Venezuela.

*Autor para la correspondencia. E-mail:

Recibido: 2-4-2018 / Aceptado: 1-7-2018

RESUMEN

Hidrogeles de poli(acrilamida) (PAAm) y de poli(acrilamida-co-ácido itacónico) (P(AAm-co-AI)) sintetizados en agua y en una solución acuosa de buffer de fosfato al 0,2 M, fueron usados como soporte en los medios de cultivo de tejido vegetal sistema autotrófico hidropónico (SAH) y cultivo in-vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog (MS) para la producción de plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L). En los bioensayos realizados fue evaluado el comportamiento de los hidrogeles mediante el análisis de las características morfológicas de las plántulas: longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, número de entrenudos y biomasa. Estos parámetros fueron analizados aplicando el análisis de varianza ANOVA de dos factores con múltiples muestras, en donde los factores evaluados fueron el tipo de hidrogel y el solvente usado para su síntesis. Los resultados obtenidos muestran que según el medio de cultivo estas variables se ven favorecidas por el uso de un determinado tipo de hidrogel, es decir, en el SAH los hidrogeles de PAAm son los que presentaron mejores resultados desde el punto de vista morfológico y estadístico. Para el cultivo in-vitro con solución nutritiva MS, las propiedades morfológicas de las plántulas, se vieron beneficiadas por el hidrogel de P(AAm-co-AI) sintetizado en la solución acuosa de buffer de fosfato.

Palabras clave: Hidrogeles, medios de cultivo, Poli(acrilamida), Poli (acrilamida-co-ácido itacónico).

HYDROGELS DERIVED FROM ACRYLAMIDE AND ITACONIC ACID AS A SUPPORT IN CULTURE MEDIA IN POTATO SEEDLINGS

ABSTRACT

Hydrogels from poly (acrylamide) (PAAm) and of poly (acrylamide-co-itaconic acid) (P (AAm-co-AI)) synthesized in water and in an aqueous solution of phosphate buffer 0.2 M, were used as a support in the vegetable tissue culture media hydroponic autotrophic system (HAS) and in-vitro culture with Murashige-Skoog (MS) nutrient solution for the production of potato seedlings (*Solanum Tuberosum*, L). In the bioassays carried out, the behavior of the hydrogels was evaluated by analyzing the morphological characteristics of the seedlings: length of the aerial part, length of the root, number of internodes and biomass. These parameters were analyzed by applying the ANOVA variance analysis of two factors with multiple samples, in which the factors evaluated were the type of hydrogel and the solvent used for its synthesis. The results obtained show



that, according to the culture medium, these variables are favored by the use of a certain type of hydrogel, which, in the SAH the PAAm hydrogels are the ones that presented the best results from the morphological and statistical point of view. For the in-vitro culture with MS nutrient solution, the morphological properties of the seedlings were advantageous due to the P(AAm-co-Al) hydrogel synthesized in the aqueous solution of phosphate buffer.

Key words: Hydrogels, medium culture, Polyacrylamide, Poly(acrylamide-co-itaconic acid).

HIDROGELES DERIVADOS DE ACRILAMIDA E ÁCIDO ITACONICO COMO SUPORTE EM MEIO À CULTURA DA PLANTA DE BATATA

RESUMO

Hidrogeis de poliacrilamida (PAAm) e poli (acrilamida-co-ácido itacônico) (P (AAm-co-Al)) sintetizados em água e em uma solução aquosa de tampão fosfato 0,2 M, foram usadas como suporte nos meios de cultivo de tecido vegetal do sistema hidropônico (HAS) com solução nutritiva de Murashige-Skoog (MS), para a produção de plântulas de batateira (*Solanum tuberosum* L). Nos bioensaios realizados, o comportamento dos hidrogéis foram avaliados pela análise das características morfológicas das plantas: comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de entrenós e biomassa. Esses parâmetros foram analisados aplicando-se a análise de variância ANOVA de dois fatores com múltiplas amostras, em que os fatores avaliados foram o tipo de hidrogel e o solvente utilizado para sua síntese. Os resultados mostram que a partir do meio de cultura dessas variáveis são favorecidos pela utilização de um tipo específico de hidrogel, isto é, na HAS hidrogéis PAAm são apresentados os melhores resultados obtidos morfológicamente e estatisticamente. Para a cultura in vitro com solução nutritiva MS, as propriedades morfológicas das plântulas foram beneficiadas pelo hidrogel P (AAm-co-Al) sintetizado na solução aquosa de tampão fosfato.

Palavras-chave: Hidrogéis, meios de cultura, Poliacrilamida, Poli (acrilamida-co-ácido itacônico).

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son polímeros hidrófilos tridimensionalmente reticulados cuya principal propiedad es que son capaces de hincharse en agua y retener enormes volúmenes de dicho solvente en estado hinchado (polímeros súperabsorbentes (PSA)). Esta propiedad ha conducido a muchas aplicaciones prácticas de estos nuevos materiales, en particular, en la agricultura (Akhter *et al.*, 2004; Azzam, 1985; Callaghan & Lindley, 1988; El-Hady & Wanas, 2006; Johnson, 1984; Koupai *et al.*, 2008; Mohana & Padmanabha, 2001; Specht & Harvey-Jones, 2000; Wang & Boogher, 1987). En este sentido, los PSA tienen un rol muy importante en el acondicionamiento de suelos (Akhter *et al.*, 2004; Azzam, 1985; El-Hady & Wanas, 2006), liberación controlada de agroquímicos (El-Hady & Wanas, 2006; Hussain *et al.*, 2012; Mikkelsen, 1994; Saradyn *et al.*, 1998; Zare *et al.*, 2013) y retención de humedad en los suelos, lo que maximiza la eficiencia de absorción de agua por las plantas (Akhter *et al.*, 2004; Callaghan & Lindley, 1988; Johnson, 1984; Koupai *et al.*, 2008, Lopez-Elías *et al.*, 2016).

Además, mejoran la aireación y la filtración a través del suelo y reducen el estrés hídrico de las plantas (Eikhof *et al.*, 1994). Se ha encontrado que los hidrogeles mejoran la tasa de supervivencia de las plántulas en condiciones áridas (Akhter *et al.*, 2004; Callaghan & Lindley, 1988; Dorraji *et al.*, 2010; Robiul *et al.*, 2011; Specht & Harvey-Jones, 2000). Este considerable aumento en el grado de aprovechamiento del agua por las plantas, trae como resultado una rápida y más frecuente germinación, una mejora en la actividad biológica y en la eficiencia de nutrición mineral con el consecuente aumento en la producción de biomasa (Akhter *et al.*, 2004; Azzam, 1985; Dorraji *et al.*, 2010; El-Hady & Wanas, 2006; Robiul *et al.*, 2011; Zare *et al.*, 2013).

Por tanto, estos materiales poliméricos se han aplicado para la solución de problemas como la erosión del suelo, las consecuencias de las sequías, suministro de alimentos, el establecimiento de cultivos forestales y agrícolas en ambientes áridos (facilitando la implantación de asentamientos humanos en las mismas) y en preparación de sustratos artificiales para las plantas (Callaghan & Lindley, 1988; Koupai *et al.*, 2008; Molesmi *et al.*, 2012; Narjary *et al.*, 2013; Ulla *et al.*, 2015). Por esto, las investigaciones de síntesis y usos de hidrogeles se deben enfocar en solucionar problemas en este campo; ya que si se aplican estos materiales como soporte de medios de cultivo se podrá aprovechar al máximo su capacidad para retener agua, con lo que se estaría disminuyendo la cantidad de agua que diariamente es utilizada para el riego de los cultivos. También estos materiales se pueden utilizar de forma sinérgica con fertilizantes y agroquímicos, para favorecer el suelo y a las plantas durante el proceso de crecimiento aportándole los nutrientes que necesita.

Algunos de estos materiales fueron usados como soporte para medios de cultivo in vitro en la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus L. var Madina*) (Romero, 2010) y de calabaza (*Cucurbita maxima Duch. ex Lam.*) (Kurtar *et al.*, 2010), pudiéndose observar que los mismos no presentaban fitotoxicidad y que en algunos casos el proceso de crecimiento y desarrollo de las plántulas se veía favorecido. Estos resultados sugieren que los hidrogeles se pueden utilizar directamente como soporte en medios de cultivo para generar y desarrollar plántulas en condiciones experimentales con la finalidad inmediata de sustituir el agar-agar, el cual es el material usado desde hace mucho tiempo como soporte para el desarrollo de diferentes variedades de plántulas de papa (*Solanum Tuberosum, L*) (Dodds & Roberts, 1985; López *et al.*, 2013; Mejía *et al.*, 2013; Rigato *et al.*, 2001; Roca & Mroginski, 1993; Salas, 1995). A diferencia de los hidrogeles, el agar-agar es un material relativamente costoso y no reusable, ya que una vez terminado su uso suele descartarse. Por lo tanto, al desarrollar la metodología adecuada y de esta forma poder optimizar las características fisicoquímicas

de los hidrogeles para que estos sirvan como soporte en el desarrollo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L), se conseguirá sustituir el agar-agar como soporte y con ello la disminución del costo económico que este material induce en el desarrollo de dichas plántulas. Por esta razón, en este trabajo se estudió el efecto de los hidrogeles de PAAm y de P(AAm-co-Al) al ser usados como soporte en los ambientes de cultivo: SAH y cultivo in vitro con solución MS para la producción de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L), variedad andinita.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Agar-Bacteriological (Alfa Biosciences), acrilamida (AAm, Sigma Aldrich 98 %), ácido itacónico (Al, Sigma Aldrich 99 %); persulfato de amonio (PSA, Riedel-de-Haën 98 %), N, N'-bismetilenacrilamida (BMA, Riedel-de-Haën 98 %). Los hidrogeles fueron sintetizados, en agua y en solución buffer de fosfato, según el método previamente reportado (Contreras *et al.*, 2017; El Halah *et al.*, 2015).

2.2. Ensayos para el desarrollo de tejido vegetal, plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L)

2.2.1. Cultivo de tejido vegetal Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH):

-Soportes: Los soportes usados en el cultivo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L) en el Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) fueron:

- a) *Turba canadiense* (Sunshine professional growing mix): Fue esterilizada durante 1 hora y media usando un autoclave a 121 ° C y 1,34 atm de presión, y luego en contenedores de polipropileno (14,4 cm x 13cm x 8 cm) con orificios en las tapas, para permitir el intercambio de gases, se depositaron 150 g del sustrato canadiense. Posteriormente, fueron añadidos 50 mL de la solución nutritiva del SAH (López *et al.*, 2013). La solución nutritiva se preparó de acuerdo con lo reportado por Rigato *et al* (2001).
- b) *Hidrogeles*: Los hidrogeles de PAAm y P(AAm-co-Al) en su estado deshidratado (xerogel), previamente fueron triturados y posteriormente fueron hidratados con solución nutritiva del SAH. Se depositaron 150 gramos de los diferentes tipos de hidrogel en los contenedores previamente rotulados.

-Corte de esquejes y siembra: Para el ensayo en el SAH de cada planta madre se cortaron los esquejes (cada uno con una yema apical o axilar) de los ápices, medios (entrenudos) y basales, los cuales fueron sembrados inmediatamente en los contenedores con la turba canadiense y los hidrogeles (López *et al.*, 2013).

-Siembra: En los contenedores con los respectivos soportes (turba canadiense e hidrogeles) se realizó un pequeño hoyo con una pinza, para plantar el esqueje y se aplicó una leve presión para su fijación (Mejía *et al.*, 2013). El esqueje se colocó en forma vertical procurando que este quedara igual en ambos soportes. En cada contenedor se sembraron 40 esquejes, realizándose este ensayo por duplicado ($n=2$). Posteriormente cada contenedor fue colocado en una cámara de crecimiento, mantenida a un 60 % de humedad relativa y a una temperatura de $22\pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

-Riego: Se aplicaron dos riegos por semana con agua destilada (lunes y viernes) a los contenedores con la turba canadiense conteniendo la solución nutritiva del SAH, mientras que a los contenedores con los hidrogeles se le realizaron riegos cada 5 días con agua destilada. Esta diferencia en los tiempos de riego es debido a que en este lapso de tiempo el hidrogel se mantiene hidratado, con lo cual se evitó el estrés hídrico tipo 2 en las plántulas. igual a 25.

2.2.2. Cultivo in-vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog (MS)

La solución nutritiva Murashige-Skoog se preparó utilizando las soluciones madres descritas en la bibliografía (Dodds & Roberts, 1985; Roca & Mroginski, 1993).

-Soportes: Los soportes usados para el cultivo in-vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog de tejidos meristemático de ápices y medios de papa (*Solanum tuberosum*, L) fueron agar-agar (grado bacteriológico), el cual se disolvió en caliente a la temperatura de 60°C dentro de la solución nutritiva MS. Posteriormente se agregaron 33 mL en frascos de vidrio (Dodds & Roberts, 1985). Los hidrogeles en su estado deshidratado (xerogel) fueron triturados e hidratados con la solución nutritiva Murashige-Skoog, y posteriormente en frascos de vidrio se introdujeron 33 gramos de cada tipo de hidrogel. Estos fueron esterilizados en un autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121°C a 15 psi.

-Corte de esquejes y siembra: Para la micro-propagación de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*, L) por cultivo in vitro con solución nutritiva MS se seccionaron asépticamente los explantes bajo una cámara de flujo laminar, los segmentos de los explantes estaban provistos con una yema apical y una yema del medio. Luego, fueron transferidos a recipientes de vidrio

(250 mL), con 33 mL de medio de cultivo (Salas, 1995). En cada recipiente se colocaron 8 explantes. Se realizaron un total de diez réplicas (n=10) por cada tratamiento.

Diseño experimental estadístico. Análisis de varianza de dos factores (ANOVA) (Miller & Miller, 2002)

Tal y como se representa en la **figura 1**, durante el desarrollo experimental se evaluó el efecto que tiene sobre las plántulas de papa el uso de diferentes tipos de hidrogeles que fueron sintetizados con dos tipos de solventes.

Variable dependiente: Crecimiento de plántulas de papa
 Factor 1) Hidrogel con dos niveles 1^{er} nivel PAAm y 2^{do} nivel P(AAm-co-AI).
 Factor 2) solvente de síntesis con dos niveles 1^{er} nivel agua y 2^{do} nivel solución acuosa de buffer de fosfato.

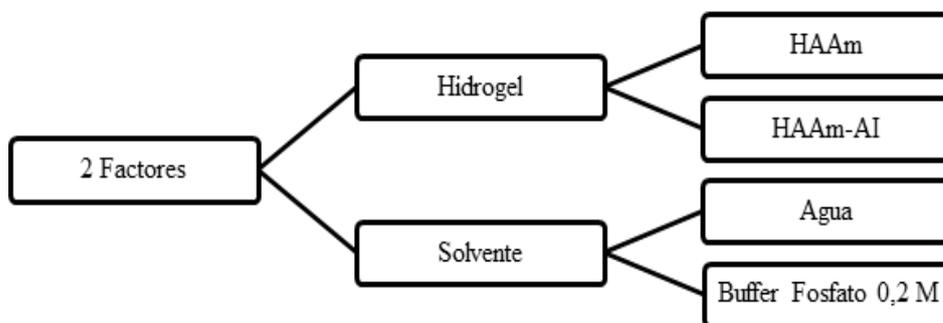


Figura 1. Esquema representativo del diseño experimental a aplicar.

Caracterización de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L) obtenidas en los ambientes de cultivo (SAH e *in-vitro*) y de los hidrogeles de PAAm y P(AAm-co-AI) usados como soporte:

Caracterización morfológica de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L):

-Longitud de la parte aérea: Luego de cumplido el tiempo de crecimiento, se retiraron, una a una, las plántulas del contenedor y usando un vernier se les determinó la longitud de su tallo desde la yema hasta el cuello de la plántula. El valor promedio de la longitud del tallo, fue obtenido a partir de los valores obtenidos de este parámetro para cada una de las plántulas que fueron sometidas al mismo tratamiento experimental (López *et al.*, 2013).

-Longitud de la raíz: Se tomó de cada contenedor la plántula de papa y se midió con un vernier la longitud de las raíces más largas, las cuales fueron consideradas como las raíces principales. Se determinó el valor promedio de la longitud de la raíz (López *et al.*, 2013).

- **Biomasa:** masa fresca y masa seca: Para la determinación de la masa fresca de las plántulas de papa, todas las plántulas de cada contenedor se pesaron en una balanza analítica OHAUS GA-200. Posteriormente se colocaron las plántulas en papel de aluminio y se llevaron a una estufa (OHAUS, GA360) a 50°C hasta alcanzar peso constante (masa seca) (López *et al.*, 2013). Con todas las medidas se determinaron los valores promedio de ambos tipos de biomasa.

-**Número de entrenudos:** Para la determinación del número de entrenudos de las plántulas, se contó el número de entrenudos por planta, el cual indica la cantidad de hojas nuevas que se formarán por plántula en función del tiempo de estudio. Con estos datos se determinó el valor promedio del número de entrenudos en función del tratamiento (López *et al.*, 2013).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambos ensayos (Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) y cultivo in vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog (MS)), fueron realizados durante treinta días (1 mes).

Cultivo de plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L), usando el SAH:

En los resultados mostrados en la **tabla 1**, se puede observar que el solvente usado como medio de síntesis de los hidrogeles usados como soportes, pareciera no afectar al crecimiento de las plántulas. Sin embargo, existen diferencias significativas en el desarrollo normal de la plántula según el tipo de hidrogel considerado, pudiéndose determinar que las plántulas muestran un mayor crecimiento en los hidrogeles de PAAm que los de P(Am-co-IA).

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA): aplicando como variable longitud parte aérea plántula de papa y tipo de hidrogel usado como soporte de crecimiento.

Tratamiento	F	Probabilidad	valor crítico F	Diagnostico
Solvente	7,35522	0,05342	7,70865	NS
Hidrogel	17,30406	0,01415	7,70865	PAAm>P(AAm-co-IA)
Interacción	5,04349	0,08806	7,70865	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS: no hay diferencia significativa. $n=80$.

En la **figura 2** se muestran los resultados obtenidos para el crecimiento de la parte aérea de la plántula, donde es posible observar que el soporte control (turba canadiense) es más eficiente que los hidrogeles. Es muy posible, que en los experimentos en los que fueron usados los hidrogeles como soportes del medio de cultivo, los nutrientes pudieran quedar

ocuidos dentro de la estructura de los mismos. Este hecho, pudiera provocar que los diferentes nutrientes migren más lentamente hacia las raíces y, por tanto, su posterior absorción se hace más lenta. En este aspecto los nutrientes que parecen ser más afectados son: el fósforo, el boro, y el potasio, puesto que estos están asociados al crecimiento de la plántula de papa (Navarro & Navarro, 2003).

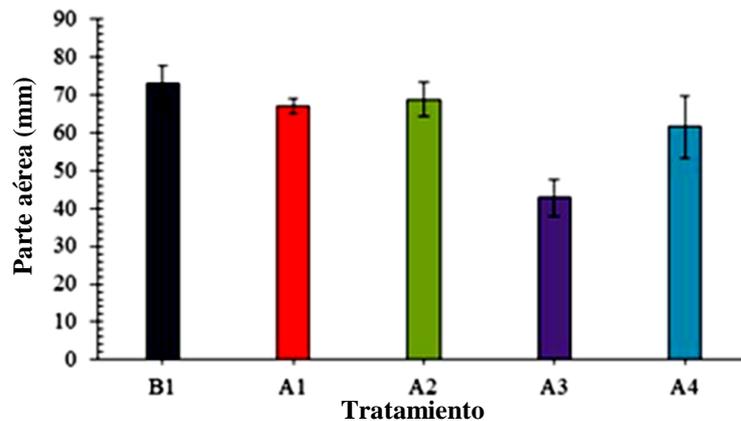


Figura 2. Comparación de la longitud de la parte aérea de las plántulas de papa (*Solanum Tuberosum, L*) según el sustrato empleado en el medio de crecimiento: **B1**(sustrato canadiense), **A1**(PAAm (agua)), **A2** (PAAm (Buffer fosfato)), **A3** (P(AAm-CO-Al)_(agua)), **A4** (P(AAm-CO-Al) (buffer fosfato)).

Por otro lado, en la **tabla 2**, se puede observar que el comportamiento del crecimiento de la raíz se ve afectado por el tipo de solvente de síntesis y del tipo de hidrogel, ya que al comparar los valores críticos de F, los soportes en los que fueron observados una mayor longitud de la raíz, fueron aquellos hidrogeles sintetizados con la solución acuosa de buffer de fosfato al 0,2 M.

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA): variable longitud raíz plántula según el tipo de solvente y soporte de crecimiento de la papa (*Solanum Tuberosum, L*).

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	11,6445	0,0270	7,7086	Buffer>Agua
Hidrogel	8,6744	0,0422	7,7086	HAAM>HAAM-AI
Interacción	2,5987	0,1822	7,7086	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS: no hay diferencia significativa. $n=80$.

Este resultado indica que estos materiales al tener adsorbida la solución buffer, en cierta medida regulan el pH del medio; evitando con ello una disminución brusca del mismo lo cual podría dificultar la movilidad de los nutrientes que favorecen el crecimiento radicular (calcio, fósforo, cinc y el potasio) (Navarro & Navarro, 2003). Tal como se puede apreciar en la **figura 3**, el crecimiento de las raíces es mayor en los hidrogeles que en el soporte control (turba canadiense).

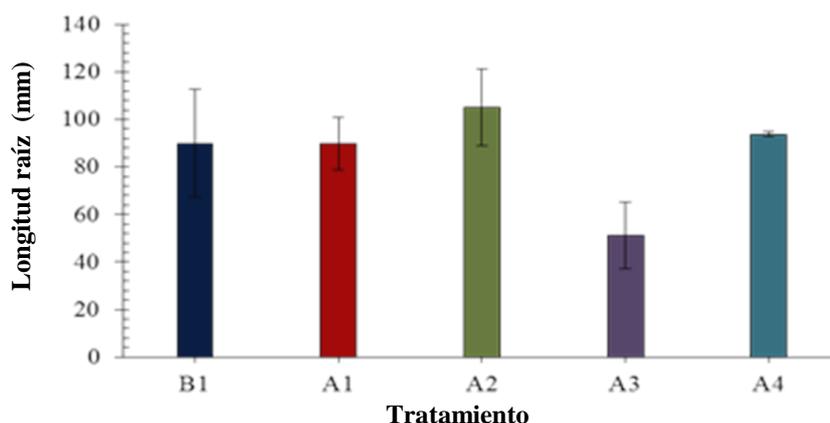


Figura 3. Comparación del desarrollo de la raíz de la plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L) según el sustrato empleado en el medio de crecimiento. **B1** (sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (PAAm-co-AI)_(agua), **A4** (P(AAm-co-AI))_(buffer fosfato).

Los resultados correspondientes al número de entrenudos (tabla 3 y figura 4) muestran el mismo comportamiento observado en lo que respecta al crecimiento de la longitud de la raíz de la plántula, siendo los hidrogeles sintetizados en la solución de buffer de fosfato en los que se presenta un mayor número de entrenudos, ya que en este caso los hidrogeles dosifican la movilidad de los macro y micro nutrientes, los cuales favorecen el crecimiento de los entrenudos de las plántulas (Navarro & Navarro, 2003).

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA): variable número de entrenudos plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L).

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	24,9391	0,0075	7,7086	Buffer>Agua
Hidrogel	25,6755	0,0071	7,7086	HAAm>HAAm-AI
Interacción	20,0839	0,0110	7,7086	HAAm-AI _(agua) < Los otros

Probabilidad ($p < 0,05$). $n=80$.

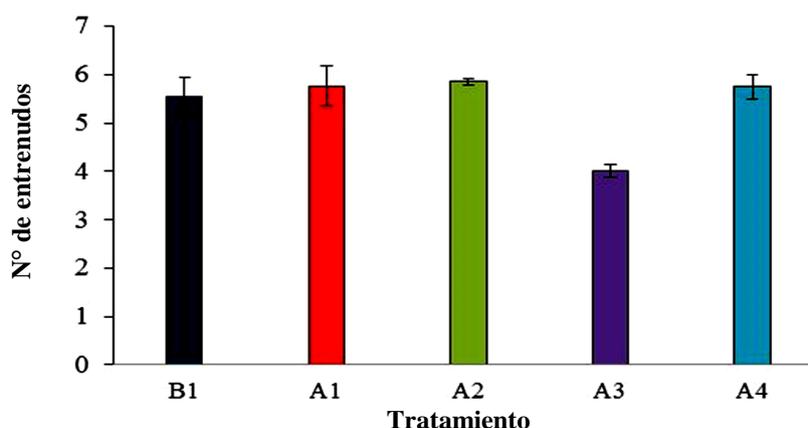


Figura 4. Comparación del número de entrenudos plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L): B1(sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (P(AAm-co-AI))_(agua), **A4** (P(AAm-co-AI))_(buffer fosfato).

En la **tabla 4** y en la **figura 5**, se muestra que el contenido de materia fresca se ve influenciado por el tipo de soporte, siendo en este caso los hidrogeles sintetizados en el buffer de fosfato, más efectivos.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA): para la variable masa fresca de plántula según el soporte de cultivo y solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	11,9425	0,0259	7,7086	Buffer > Agua
Hidrogel	8,8788	0,0407	7,7086	HAAm>HAAm-AI
Interacción	0,1189	0,7476	7,7086	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS: no hay diferencia significativa. $n=2$.

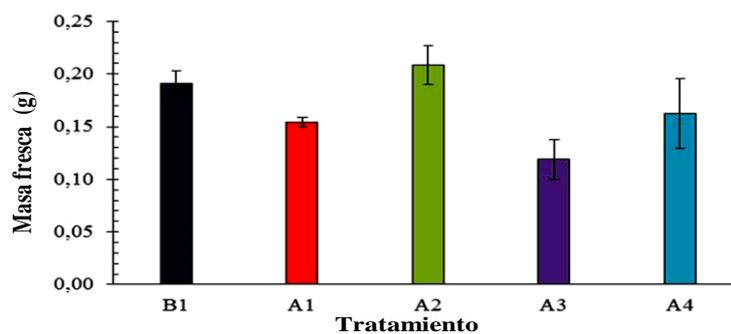


Figura 5. Comparación del contenido de masa fresca plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L) **B1** (sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (P(AAm-CO-AI))_(agua), **A4** (P(AAm-CO-AI))_(buffer fosfato).

Tal como se muestra en la **tabla 5** y en la **figura 6**, al analizar la masa seca para las plántulas de papa se tiene que el valor de esta variable no se ve afectado por el solvente usado para la síntesis de los hidrogeles. Sin embargo, el tipo de hidrogel si modifica este, siendo en este caso el hidrogel de PAAm_(agua) más eficiente en comparación con la turba canadiense.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA): variable masa seca plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L) según el tipo de soporte y de solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,9396	0,3873	7,7086	NS
Hidrogel	39,1307	0,0033	7,7086	HAAm>HAAm-AI
Interacción	51,8262	0,0020	7,7086	HAAm-AI < Los otros

Probabilidad ($p < 0,05$). ($n=2$). NS no hay diferencia significativa.

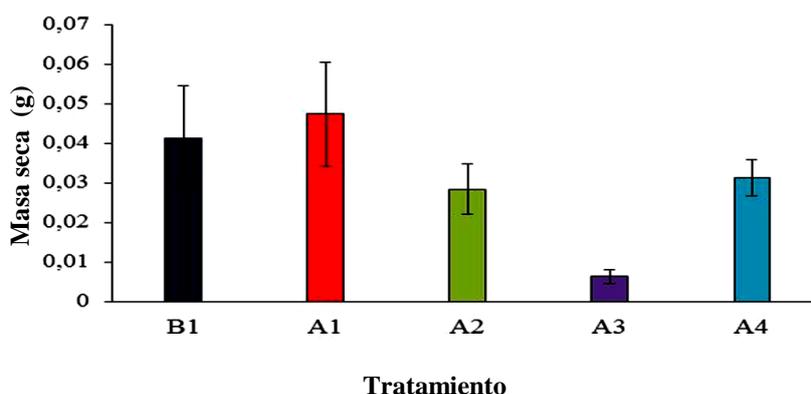


Figura 6. Comparación del contenido de masa seca plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L): **B1** (sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (P(AAm-co-AI))_(agua), **A4** (P(AAm-co-AI))_(buffer fosfato).

En general, se puede observar que en este medio de cultivo (SAH), el crecimiento de las plántulas de papa se vio afectado por el solvente usado en la síntesis de los hidrogeles sintetizados: crecimiento Hidrogel_{Buffer de fosfato} > hidrogel_{agua}. Igualmente, este parámetro fue influenciado por el tipo de hidrogel, dado que con los hidrogeles de PAAm se obtuvo un mejor crecimiento que con los hidrogeles de P(AAm-co-AI).

Cultivo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L), cultivo *in-vitro* con solución nutritiva Murashige-Skoog

En cuanto al crecimiento de la parte aérea se aprecia en la **tabla 6**, que el tipo de hidrogel que afecta este parámetro desde el punto de vista estadístico es el hidrogel de P(AAm-co-AI) sintetizado en buffer de fosfato. En la **figura 7** se muestra el comportamiento de los diferentes soportes, y en este caso se observa que el soporte control (agar-agar) es más efectivo que los hidrogeles.

Tabla 6. Análisis de variable (ANOVA): variable longitud parte aérea plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L).

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,4996	0,4842	4,1132	NS
Hidrogel	10,6180	0,0024	4,1132	HAAm-AI>HAAm
Interacción	1,1092	0,2993	4,1132	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS No hay diferencia significativa.

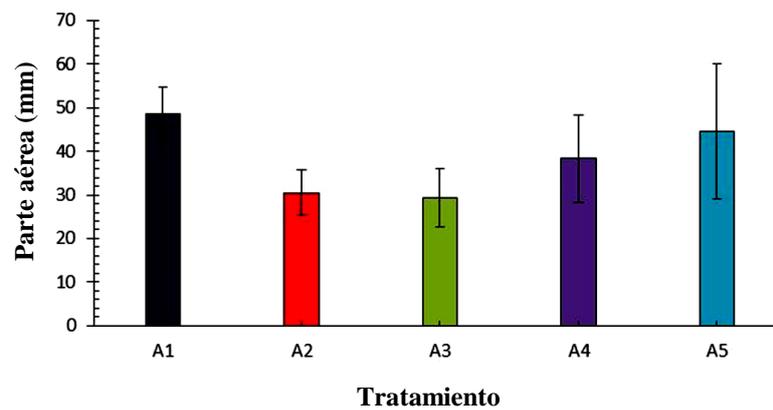


Figura 7. Comparación de la Longitud parte aérea de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (Agar-Agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

Para la longitud de la raíz, en la **tabla 7** se muestra el análisis realizado usando ANOVA, pudiéndose notar que los diferentes tipos de hidrogeles de PAAm y P(AAm-co-Al) sintetizados en ambos solventes de reacción, no presentan diferencia significativa entre los valores medios.

Tabla 7. Análisis de varianza para la longitud de la raíz plántula de papa.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,1594	0,6921	4,1132	NS
Hidrogel	0,0533	0,8187	4,1132	NS
Interacción	3,6402	0,0644	4,1132	NS

Probabilidad ($p > 0,05$). NS No hay diferencia significativa.

En la **figura 8** se observa que los hidrogeles PAAm_(buffer de fosfato) y P(AAm-co-Al)_(agua) son más efectivos que el soporte control (agar-agar).

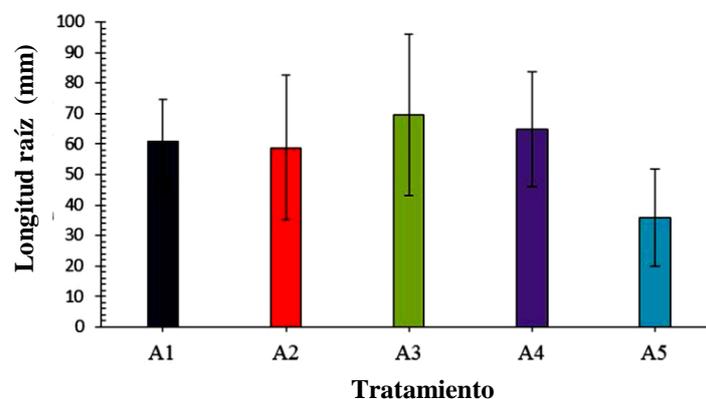


Figura 8. Comparación de la longitud de la raíz de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (agar-agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En general, el crecimiento de la longitud de la raíz de las plántulas aumenta en mayor medida cuando son usados los hidrogeles de PAAm como soportes de los medios de cultivo, que cuando se usan los hidrogeles de P(AAm-co-AI). Este comportamiento podría estar asociado, a la posible ionización de los grupos carboxilo (-COOH) de las unidades comonoméricas ácido itacónico (AI) presentes en el hidrogel, lo que da lugar a la formación de grupos carboxilato (-COO-) en las cadenas del hidrogel sintetizado ($R-COOH + H_2O \rightarrow RCOO^- + H_3O^+$; o en el caso de los hidrogeles sintetizados en la solución buffer: $R-COOH + H_2PO_4^- \rightarrow RCOO^- + H_3PO_4$). Tomando en cuenta que los nutrientes presentes en la solución nutritiva MS, están en la forma de iones positivos, es muy posible que entre los grupos carboxilato y estos iones se establezca una atracción electrostática; lo que implicaría que dichos nutrientes sean liberados al medio de cultivo de forma controlada, y por tanto, el crecimiento de las raíces sea más lento (Guo et al., 2005; Milani *et al.*, 2017).

El parámetro del número de entrenudos, tal como se muestra en la **tabla 8**, no se ve afectado por usar los hidrogeles como soporte, ya que entre cada uno de los tratamientos no hay diferencias significativas en la cantidad de entrenudos que presentaron las plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L).

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA): variable Número de entrenudos plántula según el tipo de soporte

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,3519	0,5568	4,1132	NS
Hidrogel	0,0049	0,9447	4,1132	NS
Interacción	0,0032	0,9555	4,1132	NS

Probabilidad ($p > 0,05$). NS no significativo.

En la **figura 9**, es posible notar que, en comparación con los hidrogeles, el agar-agar es el que presenta el mayor número de entrenudos.

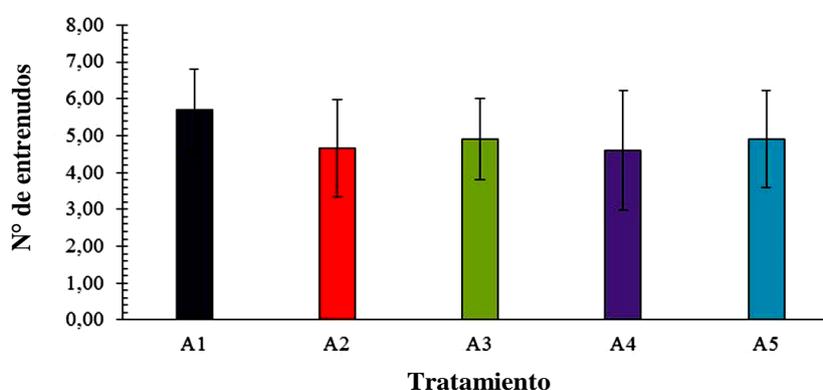


Figura 9. Comparación del número de entrenudos en las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (agar-agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-AI))_(agua), **A5** (P(AAm-co-AI))_(buffer fosfato).

Por otra parte, tal como se muestra en las **tablas 9 y 10** la masa fresca y masa seca de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L) no se vio afectada por el uso de los hidrogeles como soporte en el cultivo in vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog. Esto se deduce del hecho, de que, desde el punto de vista estadístico, la diferencia tanto en el contenido de masa fresca como de masa seca, varía poco cuando fueron usados los diferentes tipos de hidrogeles como soportes.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA): variable masa fresca plántula de papa según el soporte usado y el solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,0283	0,8674	4,1132	NS
Hidrogel	0,0698	0,7931	4,1132	NS
Interacción	2,8479	0,1001	4,1132	NS

Probabilidad ($p > 0,05$). NS No hay diferencia significativa.

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA): variable masa seca plántula de papa según el tipo de soporte y el solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,65081	0,42512	4,11317	NS
Hidrogel	0,05713	0,81245	4,11317	NS
Interacción	1,06269	0,30948	4,11317	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS no hay diferencia significativa.

No obstante, evaluando el comportamiento gráficamente se puede observar en la **figura 10**, que el contenido de peso fresco es mayor en el soporte control (agar-agar) en comparación con los hidrogeles.

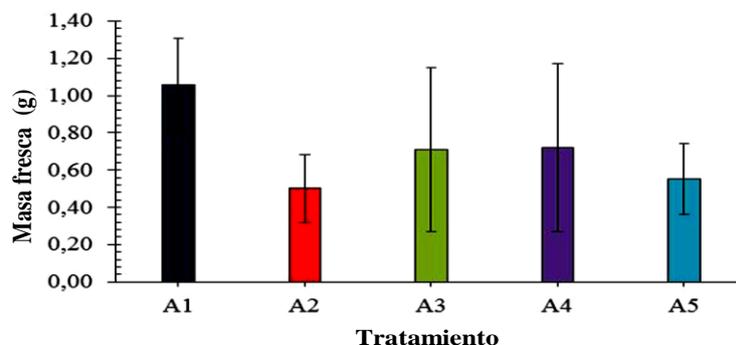


Figura 10. Comparación del contenido de masa fresca en las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (agar-agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-AI))_(agua), **A5** (P(AAm-co-AI))_(buffer fosfato).

En la **figura 11**, en comparación con los hidrogeles se nota que el contenido en peso seco, es mayor en el soporte control (agar-agar).

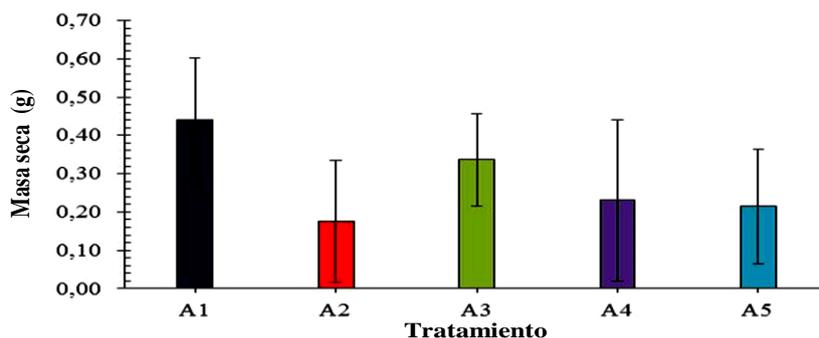


Figura 11. Comparación del contenido de masa seca en las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*,L): **A1** (agar-agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (PAAm-co-Al)_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En lo que respecta al contenido de biomasa (masa fresca y masa seca), se puede observar que el hidrogel de PAAm_(agua) presentó los valores más bajos. Indicando que, en comparación con los demás soportes utilizados, este material no favoreció la capacidad de retención de agua y por ende la asimilación de los macro y micro nutrientes que estaban presentes en el medio de cultivo.

Finalmente, en la **tabla 11** se muestra de manera comparativa el orden de eficiencia de los diferentes soportes (hidrogeles, turba canadiense y agar-agar) sobre el desarrollo de los parámetros morfológicos de las plántulas de papa.

Como es posible observar, la efectividad de los hidrogeles como soportes de los medios de cultivo depende de este. Así en el caso del medio de cultivo SAH, en general los hidrogeles permiten un mejor desarrollo de los diferentes parámetros morfológicos en comparación con el sustrato control (turba canadiense). Las variaciones en el comportamiento de los diferentes tipos de hidrogeles en cada uno de los parámetros analizados, pueden estar asociadas a la regulación del pH del medio, lo que controla la migración de algunos nutrientes que necesitan las plántulas para su crecimiento (Navarro & Navarro, 2003). Por otra parte, en el caso del medio de cultivo MS el soporte control (agar-agar) muestra un mejor desempeño que los hidrogeles. En este caso los componentes de la solución nutritiva MS, pueden interactuar con los grupos amida (CONH₂) y grupos carboxilato presentes en los hidrogeles, ya sea formando complejos o mediante interacciones electrostáticas, lo que provoca que la dosificación de dichos nutrientes hacia las plántulas de papa sea más lenta (Contreras *et al.*, 2017; Rudzinski *et al.*, 2002).

Tabla 11. Eficiencia de los soportes sobre la evolución de los parámetros morfológicos de las plántulas de papa, según el medio de cultivo.

Medio de cultivo	Parámetro morfológico	Eficiencia de los soportes
SAH	Parte aérea	turba canadiense>PAAm _(buffer fosfato) >PAAm _(agua) >P(AAm-co-Al) _(Buffer fosfato) >P(AAm-co-Al) _(agua)
	Longitud de la raíz	PAAm _(buffer de fosfato) >P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) > PAAm _(agua) > turba canadiense>P(AAm-co-Al) _(agua)
	N° de entrenudos	PAAm _(buffer de fosfato) >P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) > PAAm _(agua) > turba canadiense>P(AAm-co-Al) _(agua)
	Masa fresca	PAAm _(buffer de fosfato) > turba canadiense> P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) >PAAm _(agua) > P(AAm-co-Al) _(agua)
	Masa seca	PAAm _(agua) > turba canadiense>P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) >PAAm _(buffer de fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua)
MS	Parte aérea	Control _(agar-agar) >P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua) >PAAm _(agua) > PAAm _(buffer de fosfato)
	Longitud de la raíz	PAAm _(buffer de fosfato) >P(AAm-co-Al) _(agua) >Control _(agar) >PAAm _(agua) >P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato)
	N° de entrenudos	Control _(agar) >PAAm _(buffer fosfato) >P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua) >PAAm _(agua)
	Masa fresca	Control _(agar-agar) >PAAm _(buffer fosfato) >P(AAm-co-Al) _(agua) > P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) >PAAm _(agua)
	Masa seca	Control _(agar-agar) >PAAm _(buffer fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua) >P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) >PAAm _(agua)

4. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta que las diferentes variables evaluadas, resultaron ser comparables con ambos soportes control (turba canadiense y agar-agar), los resultados obtenidos permiten establecer que ambos hidrogeles ensayados: PAAm y P(AAm-co-Al), pueden ser usados como posibles soportes de medios de cultivo de plántulas de papa. Por tanto, Estos materiales pueden sustituir como soportes de los medios de cultivo, al agar-agar y a la turba canadiense; los cuales son relativamente más costosos, y a diferencia de los hidrogeles, no reusables.

La eficiencia de estos hidrogeles como soporte, depende del solvente de síntesis y del medio de cultivo (SAH o MS). En comparación con la turba canadiense, los hidrogeles resultaron ser más efectivos cuando se usan como soportes en el sistema SAH. Mientras que el agar-

Hidrogeles Derivados de Acrilamida y Ácido Itacónico, como Soporte en Medios de Cultivo de Plántulas de Papa agar fue más efectivo que los hidrogeles, como soportes en el cultivo in-vitro con solución nutritiva MS.

5. AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) a través del proyecto C-2001-18-08-A. Además, agradecemos al Dr. Daniel Machado, del Laboratorio de Investigación en Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos.

6. REFERENCIAS

- Akhter, J., Mahmood, K., Malik, K., Mardan, A.M., Ahmad, M. & Iqbal, M. (2004). Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. *Plant, soil and Environment*, 50(10), 463-469.
- Azzam, R. (1985). Tailoring polymeric gels for soil reclamation and hydroponics. *Communications in soil science and Plant Analysis*, 16(10), 1123-1138.
- Callaghan, T. & Lindley, D. (1988). The environmental crisis in the Sudan: the effect of water absorbing synthetic polymers on tree germination and early survival. *Journal of Arid Environments*, 14(3), 301–317.
- Contreras, J., Juárez, J. & Oliveros, A. (2017). Estudio de la fitotoxicidad de hidrogeles derivados de acrilamida y ácido itacónico hacia plántulas de papa (*solanum tuberosum*, l). *Revista Científica UNET*, 29(1), 56-67.
- Dodds, J. & Roberts, L. (1985). Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, New York, pp: 46-47.
- Dorraj, S., Golchin, A. & Ahmadi, S. (2010). The effects of hydrophilic polymer and soil salinity on corn growth in sandy and loamy soils. *Clean-Soil, Air, Water*, 38(7), 584–591.
- Eikhof, R., King, P. & Koven, G. (1994). Control of wilting in potted plants. *Ohio Florists' Association Bulletin*, 532, 6–7.
- El-Hady, O. & Wanas, S. (2006). Water and Fertilizer Use Efficiency by Cucumber Grown under Stress on Sandy Soil Treated whit Acrylamide Hydrogels. *Journal of Applied Sciences Research*, 2(12), 1293-1297.
- El Halah, A., Contreras, J., Rojas-Rojas, L., Rivas, M., Romero, M. & López-Carrasquero, F. (2015). New superabsorbent hydrogels synthesized by copolymerization of acrylamide and N-2-hydroxyethyl acrylamide with itaconic acid or itaconates containing ethylene oxide units in the side chain. *Journal of Polymer Research*, 22:233.
- Guo, M., Liu, M., Zhan, F. & Wu, L. (2005). Preparation and Properties of a Slow-Release Membrane-Encapsulated Urea Fertilizer with Superabsorbent and Moisture Preservation. *Industrial & engineering chemistry research*, 44(12), 4206-4211.
- Hussain, M., Devi, R. & Maji, T. (2012). Controlled release of urea from chitosan microsphere prepared by emulsification and cross-linking method. *Iranian Polymer Journal*, 21(8), 473–479.

- Johnson, M. (1984). The effects of gel-forming polyacrilamides on Moisture Storage in sandy Soils. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 35(1), 1196-1200.
- Koupai, J., Eslamian, S. & Kazemi, J. (2008). Enhancing the available water content in unsaturated soil zone using hydrogel, to improve plant growth indices. *Ecohydrology Hydrobiology*, 8(1), 67-75.
- Kurtar, E., Balkaya, A. & Özbek, N. (2010). Effects of Polymers and Growth Mediums on in vitro Plantlets of Winter Squash (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) and Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir.) in Acclimatization. *Annals of Biological Research*, 1(2), 148-154.
- López, D., Gómez, T., González, A., Franco, O., Rubí, A., Gutiérrez, F. & Serrato, R. (2013). Calidad de plántula en cinco cultivares de papa determinada por la intensidad de luz blanca y tipo de propagación. *Ciencia Ergo Sum*, 20(2), 138-147.
- López-Elías, J., Garza, S., Jiménez, J., Huez, M. & Garrido, O. (2016). Uso de un polímero hidrófilo a base de poliacrilamida para mejorar la eficiencia en el uso del agua. *European Scientific Journal*, 12(15), 160-175.
- Mejía, R., Méndez, J., Pineda, L. & Hernández, S. (2013) Manual de producción de semilla de papa mediante técnicas de reproducción asexual. Editorial PYMERURAL, Tegucigalpa.
- Milani, P., França, D., Balieiro, A. & Faez, R. (2017). Polymers and its applications in agriculture. *Polímeros*, 27(3), 256-266.
- Miller, JN. & Miller, JC. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson educación, Madrid.
- Mikkelsen, R. (1994). Using hydrophilic polymers to control nutrient release. *Fertilizer Research*, 38 (1), 53-59.
- Mohana, R. & Padmanabha, R. (2001). Synthesis of Novel Superabsorbing Copolymers for Agricultural and Horticultural Applications. *Polymer International*, 50(8), 946-951.
- Molesmi, Z., Habibi, D., Asgharzadeh, A., Ardakani, M., Mohammadi, A. & Sakari, A. (2012). Effects of super absorbent polymer and plant growth promoting Rhizobacteria on yield components of Maize under drought stress and normal conditions. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, 12(3), 358-364.
- Narjary, B., Aggarwal, P., Kumar, S. & Meena, M. (2013). Significance of hydrogels and its applications in agriculture. *Indian Farming*, 62(10), 15-17.
- Navarro, S. & Navarro, G. (2003). Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Mundi-prensa libros S.A., Madrid.
- Rigato, S., Gonzáles, A. & Huarte, M. (2001). Producción de Plántulas de Papa a partir de técnicas combinadas de Micropropagación e Hidroponía para la obtención de semillas Pre-básica. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 12(1), 110-120.
- Robiul, M., Hu, Y., Fei, Ch., Qian, X., Egrinya, A. & Xue, X. (2011). Application of superabsorbent polymer: A new approach for wheat (*Triticum aestivum* L.) production in drought-affected areas of northern China. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 304-309.
- Roca, W., Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Capítulo 1: establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. Editorial Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali.
- Romero, M. (2010). Síntesis y caracterización de hidrogeles de poli (acrilamida-co-diitaconato de metoxietilo). Trabajo de Grado de Licenciatura. Universidad de Los andes, Mérida-Venezuela.
- Rudzinski, W., Dave, A., Vaishnav, U., Kumbar, S., Kulkarni, A. & Aminabhavi, T. (2002). Hydrogels as controlled release devices in agricultura. *Designed Monomers and Polymers*, 5(1), 39-65.
- Salas, J. (1995). Producción de semilla pre-básica de papa. FONAIAP Divulga, 48, 1-4.
- Saradyn, D., Karadag, E. & Güven, O. (1998). The releases of agrochemicals from induced acrylamide/crotonic acid hydrogels. *Polymer Bulletin*, 41(5), 577-584.

Hidrogeles Derivados de Acrilamida y Ácido Itacónico, como Soporte en Medios de Cultivo de Plántulas de Papa

- Specht, A. & Harvey-Jones, J. (2000). Improving water delivery to the roots of recently planted seedling trees: the use of hydrogels to reduce leaf and hasten root establishment. *Forestal Research*, 1, 117–123.
- Ullah, F., Othman, M., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C*, 57, 414-433.
- Wang, Y. & Boogher, C. (1987). Effect of a Medium-Incorporated Hydrogel on plant growth and water use of two foliage species. *Journal of Environmental Horticulture*, 5(3), 127-130.
- Zare, A., Shahhosseini, R., Ali-Bahrami, H., Ghovahi, M. & Askary. A. (2013). Evaluation the effect of nitroxin and super absorbent on yield components of chickpea in dry farm. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(8), 2033-2038.

ESPECIACIÓN DE SELENIO EN MUESTRAS DE SANGRE Y PLASMA EN PACIENTES CON LEUCEMIA POR HPLC-ICP-MS

MSc. Jervis Nava¹, Dra. Marinela Colina^{1,2*}, MSc. Carolina Sthormes¹, Dra. Ana Cáceres¹, 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.

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

Recibido: 22-11-2017 / Aceptado: 21-2-2018

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método de análisis para la determinación de la concentración total de selenio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia mediante ICP-MS. Por otro lado, se desarrolló un método para la determinación de algunas especies de Se en muestras de sangre y plasma mediante HPLC-ICP-MS. Se emplearon diferentes fases móviles en modo isocrático. La separación más adecuada para las especies selenio DL cisteína y selenio DL metionina se obtuvieron con una fase móvil de: 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM de EDTA, a una velocidad de flujo de 1mL.min⁻¹. Para selenio total, los límites de detección y cuantificación fueron 0,03 µg.L⁻¹ y 0,04 µg.L⁻¹ respectivamente. Las desviaciones estándar relativas (DER) en la corrida y entre corridas fueron de 0,8 % 2,71 % respectivamente, indicando una adecuada precisión en el análisis, adicionalmente con los valores obtenidos en la recuperación (101,15% ± 1,4) cuya exactitud es aceptable. Las concentraciones medias de selenio en sangre completa y plasma fueron de 243,6 ± 112,3 y 141,7 ± 34,1 µg.L⁻¹ respectivamente para pacientes con leucemia y para la población control fueron de 198,0 ± 40,6 y 159,1 ± 30,1 µg.L⁻¹ respectivamente. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos para las especies fueron: 0,46 y 0,47 µg.L⁻¹ para la selenoDLcisteína y de 0,45 y 0,47 µg.L⁻¹ para la selenoDLmetionina respectivamente. La precisión como (DER) fue menor al 5% se encontraron valores adecuados en el proceso de extracción con recuperaciones entre 95 y 105%. Se encontraron concentraciones de selenoDLcisteína en sangre y plasma de pacientes con leucemia de 171,25 ± 56,5 y 106,74 ± 11,1 µg.L⁻¹ respectivamente y para la población control de 123,77 ± 16,2 y 84,96 ± 6,9 µg.L⁻¹.

Palabras clave: Selenio, sangre, plasma, leucemia, selenoproteínas, selenoaminoácidos, selenoDLcisteína, selenoDLmetionina.

SELENIUM SPECIATION IN BLOOD AND PLASMA SAMPLES IN PATIENTS WITH LEUKEMIA BY HPLC-ICP-MS"

ABSTRACT

The concentration of selenium in blood and plasma is the most appropriate magnitude for the valuation of the corporal content of selenium by means of analytic techniques for sin the for clinical practice. In this research, an analysis method to determine the total concentration of selenium in whole blood and plasma samples from patients with leukemia using ICP-MS was carried out. The limits of detection and quantification were 0.03 µg.L⁻¹ and 0.04 µg.L⁻¹ respectively. The relative standard deviations in and between runs were 0.8 % 2.71 %



respectively, indicating an appropriate accuracy in the analysis and also with the values obtained in the recovery ($101.15\% \pm 1.4$) whose accuracy is acceptable. The mean concentrations of selenium whole blood and plasma were 243.6 ± 112.3 and $141.7 \pm 34.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively for patients with leukemia and for the control population were 198.0 ± 40.6 and $159.1 \pm 30.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. Furthermore, it was developed a method for the determination of some species in the same samples, through HPLC-ICP-MS using different mobile phases with isocratic mode. The most appropriate separation was obtained with a mobile phase of: 0.1 % 2- mercaptoethanol, 3 % methanol, 0,06M ammonium acetate and 2mM of EDTA, with pump speed of 1mL.min^{-1} . The detection and quantification obtained were: 0.46 and $0.47 \mu\text{g.L}^{-1}$ for the seleno-DL-cysteine and 0.45 and $0.47 \mu\text{g.L}^{-1}$ for the seleno-DL-methionine respectively. The accuracy was 5% or even smaller than that. In the extraction process, recoveries between 95 and 105% were found. There were concentrations of seleno-DL-cysteine in whole blood and plasma from leukemia patients of 171.25 ± 56.5 and $106.74 \pm 11.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively and for the control population of 123.77 ± 16.2 and $84.96 \pm 6.9 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Key words: Selenium, blood, plasma, leukemia, selenoproteins, selenoaminoacids, selenoDLcysteine, selenoDLmetionine.

ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM AMOSTRAS DE SANGUE E PLASMA EM PACIENTES COM LEUCEMIA POR HPLC-ICP-MS

RESUMO

A concentração de selênio no sangue e no plasma é a magnitude mais apropriada para a avaliação do conteúdo corporal do selênio por meio de técnicas analíticas para a prática clínica. Nesta pesquisa, um método de análise para a determinação da concentração total de selênio no sangue total e nas amostras de plasma de pacientes com leucemia foram realizadas por meio de ICP-MS. Os limites de detecção e quantificação foram de $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,04 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Os desvios-padrão relativos e entre as replicas foram de 0,8% a 2,71%, respectivamente, indicando uma precisão adequada na análise e também com os valores obtidos na recuperação ($101,15\% \pm 1,4$) com uma acurácia aceitável. As concentrações médias de selênio no sangue total e no plasma foram de $243,6 \pm 112,3$ e $141,7 \pm 34,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, para pacientes com leucemia e para a população controle foram de $198,0 \pm 40,6$ e $159,1 \pm 30,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Além disso, foi desenvolvido um método para a determinação de algumas espécies nas mesmas amostras por meio de HPLC-ICP-MS usando diferentes fases móveis como o modo isocrático. A separação mais apropriada foi obtida com uma fase de: 0,1% de 2- mercaptoetanol, 3% de metanol, 0,06 M de acetato de e 2 mM de EDTA, com velocidade da bomba de 1 mL.min^{-1} . Os limites de detecção e quantificação obtidos foram: 0,46 e $0,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a seleno-DL-cisteína e de 0,45 e $0,47 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a seleno-DL-metionina, respectivamente. A precisão como foi de 5% ou menor. No processo de extração foram encontradas recuperações entre 95 e 105%. Foram concentrações de seleno-DL-cisteína no sangue total e plasma de pacientes com leucemia de $171,25 \pm 56,5$ e $106,74 \pm 11,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente e para a população controle de $123,77 \pm 16,2$ e $84,96 \pm 6,9 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavra chaves: Selênio, sangue, plasma, leucemia, selenoproteínas, selenoaminoácidos, selenoDLcysteine, selenoDLmetionine.

1. INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un elemento traza esencial en el cuerpo humano, forma parte importante de las enzimas antioxidantes que protegen las células contra los efectos de los radicales libres que se producen durante el metabolismo normal del oxígeno (Casals *et al.*, 2005). En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en el equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación

que conservan el estado normal fisiológico de los organismos (Avello & Suwalsky, 2006). Su papel protector en la prevención del cáncer es objeto de intensos debates y estudios epidemiológicos, existiendo indicios de que esa acción puede ser más farmacológica que esencial (Vadgama *et al.*, 2000). En el humano, el selenio ha sido reconocido como elemento esencial en el mantenimiento de las funciones fisiológicas en el organismo que, a su vez, debe ser ingerido en la dieta humana en concentraciones del orden de $70 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ en el caso de déficit de selenio. Su disminución o aumento de concentración puede provocar deficiencias o efectos tóxicos. Es por ello que, los efectos beneficiosos del selenio siempre están relacionados con el contenido de selenoproteínas o enzimas dependientes de selenio en el organismo (Hernández & Ríos, 2009).

Las fuentes principales del selenio es la ingesta de alimentos que proceden de la dieta diaria y los suplementos nutricionales enriquecidos con selenio, (Hernández & Ríos, 2009; Hurtado & Gardea, 2007; Werner, 1992) la forma en que se aportan el selenio en este tipo de alimento es unido a proteínas (selenoproteínas de baja masa molecular, $<10 \text{ KDa}$). En la estructura de la selenoproteína, tiene uno o varios átomos de selenio que reemplaza el azufre de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina, dando lugar a especies orgánicas de selenio como selenocistina (SeCys_2), selenocisteína (SeCys), selenometionina (SeMet), metil-selenocisteína (CH_3SeCys) y seleno-metil-selenocisteína (SCM) (Avisar, 1989). En la actualidad, tanto el selenio como sus especies son el objetivo de numerosas investigaciones en el campo de la salud humana, ya que presentan propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Hernández & Ríos, 2009). El selenio es un agente químico preventivo efectivo contra el cáncer en muchos animales de experimentación. Además, estudios epidemiológicos realizados en algunas ciudades han demostrado que el selenio posee posibles efectos en la prevención del cáncer (Rangel, 2005; Micke *et al.*, 2009). El selenio presenta varios estados de oxidación, formando gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos, siendo su química compleja en el medioambiente y en los sistemas vivos (Gómez *et al.*, 1999).

Las propiedades tóxicas y esenciales del selenio dependen no sólo del nivel de concentración sino también de la forma química en que esté presente. Por lo tanto, la biodisponibilidad, actividad biológica, transporte, distribución y efectos tóxicos de este elemento traza en los organismos vivos dependerá en gran parte de su especie química (Gómez *et al.*, 1999). Actualmente está claramente establecida la necesidad de la determinación, no solo de la cantidad total de un elemento en una muestra, sino de las distintas especies químicas en que se encuentra distribuido ese elemento en dicha muestra (especiación). La especiación química permite establecer la distribución geoquímica del

elemento en el medioambiente, su biodisponibilidad y/o toxicidad en los distintos organismos vivos y seres humanos. El análisis de especies inorgánicas y orgánicas en suplementos alimenticios, así como de muestras biológicas, es de gran interés para definir rutas metabólicas y prevenir enfermedades muy extendidas. Estos procedimientos analíticos requieren la aplicación de técnicas analíticas de última generación para la identificación y cuantificación de especies elementales (Gómez *et al.*, 1999; Hernández, 2010; Kelly, Paramee, Patrick, & Zoltán, 2018).

Selenio en la leucemia

La disminución en la concentración sérica de selenio se considera un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, cirrosis hepática y distrofia muscular. La importancia de este mineral como micronutriente, radica en que se asocia con el sitio activo de la Glutación Peroxidasa (GSH-PX) y esta enzima protege al cuerpo de los peróxidos nocivos que son producto del metabolismo. La acumulación de peróxidos puede conducir a la generación de radicales libres, que a su vez destruyen membranas y son causa de cáncer y aterosclerosis.

En el presente trabajo se persigue la determinación de selenio total, así como algunas especies químicas presentes en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia mediante la técnica cromatografía líquida de alta resolución acoplado en línea con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos

Los reactivos químicos empleados fueron de grado certificado o analítico. La solución concentrada de selenio (ca. 1000 mg Se.L⁻¹) se preparó gravimétricamente a partir de selenito de sodio (Na₂SeO₃) (Merck). Las soluciones patrones de plomo se prepararon diariamente por dilución serial de la solución concentrada del analito. El rango de concentraciones empleado para la técnica de espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para la determinación analítica del selenio fue: 5, 10, 20 y 40 µg Se.L⁻¹. Estos patrones se prepararon a partir de soluciones intermedias (ca. 100, 10 y 1 mg Se.L⁻¹), cuyas concentraciones se evaluaron por ICP-MS. Todas las soluciones fueron preparadas con agua bidestilada y desionizada en ácido nítrico (HNO₃ al 2% v/v). Se emplearon matraces volumétricos de vidrio tipo A de 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mL (Pyrex o Kimax) para preparar las soluciones, y envases de polietileno lineal

(Nalgene) de 125, 250 y 500 mL para almacenar las soluciones concentradas, intermedias, patrones acuosos de las especies de selenio estudiadas y para las diluciones de las muestras requeridas para el análisis espectrométrico.

Para el tratamiento de muestras de sangre completa y plasma se emplearon: Hidróxido de amonio (NH_4OH) (Alba Aesor), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 30% v/v) (Riedel de Haën), 1-octanol (Riedel de Haën) y agua bidestilada y desionizada.

Para extraer el selenio para determinarlo por HPLC-ICP-MS se usaron, como agentes complejantes del selenio en forma de aminoácidos o proteínas: L-cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SNO}_2$ al 0,05% m/v) marca (Merck, 99%), en una solución de ácido clorhídrico (HCl al 0,1% v/v) (Riedel de Haën, 37% M), 2-mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ al 0,1% v/v). (Merck, 99%). La solución extractante fue preparada con agua grado HPLC (Ricca Chemical Company, ACS).

Para las separaciones cromatográficas de las especies de selenio se utilizaron como reactivos patrones: Seleno-DL-cisteína (Sigma, 79%) y seleno-DL-metionina (Fluka Biochemika, 99%). El rango de concentraciones empleado para la técnica de HPLC-ICP-MS para la especiación de selenio fue: 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g Se.L}^{-1}$. Estos patrones se prepararon a partir de soluciones intermedias (i.e. 100 y 1 mg Se.L^{-1}) en agua grado HPLC. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2 mmol.L^{-1}) (Riedel de Haën, 99%), 2-mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ al 0,1 % v/v), Acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 0,06 M) (Merck, 98%) y metanol (CH_3OH al 3% v/v), Grado HPLC (Merck) como fase móvil. se Como fase móvil 0.1% de Ácido Fórmico (Merck, 99%), metanol al 1% y agua grado HPLC.

2.2. Equipos

Se utilizó un equipo ICP-MS Agilent Technologies Serie 7500. Las condiciones del equipo ICP-MS se representan en la **tabla 1**. La separación de las especies de selenio se realizó mediante un cromatógrafo HPLC marca Agilent Technologies serie 1200 equipado con una bomba de automuestreo de volumen variable modelo ASX-500 Series, una columna analítica Zorbax eclipse XDB-C18 de 150 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro interno.

2.3. Muestreo

La recolección de las muestras de sangre completa se realizó a través de un muestreo al azar de pacientes con leucemia (PL, n=35) y suministradas por el Instituto Hematológico de Occidente (IHO), Maracaibo, Venezuela. También se recolectaron muestras de individuos sanos (población control, PC, n=5), con jeringas desechables, las muestras se colocaron

en tubos de propileno tapados a presión que contenían 0,1 mL de sal disódica de EDTA al 10% como anticoagulante por cada 4,5 mL de sangre.

Tabla 1. Condiciones de trabajo optimizadas en HPLC-ICP-MS para la separación y cuantificación de algunas especies de selenio 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	⁸² Se
Método de adquisición de la data	Spectrum
Parámetros de HPLC	
Columna	C ₁₈
Fase móvil	Ácido fórmico, metanol, agua
Composición de la fase móvil	0,1%, 1%, 98,9%
Caudal de flujo	1,3 mL.min ⁻¹
Modo de elución	Isocrático
Volumen de inyección	50 µL
Método de adquisición de la data	Análisis de tiempo de resolución
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

2.4. Metodología analítica

La metodología desarrollada para la determinación de las concentraciones de algunas especies de Se utilizando HPLC-ICP-MS se optimizó evaluando los parámetros de mérito analítico. Los límites de detección (LD) fueron calculados a partir de las curvas de calibración correspondientes a cada especie en estudio (Miller & Miller, 2002). La precisión del método, expresada como la desviación estándar relativa (%DER) en la corrida y entre corrida, se obtuvo a partir de cinco determinaciones de una muestra real. Por su parte, la exactitud se evaluó preparando disoluciones de concentración conocida y adicionadas a una muestra de sangre completa y se inyectaron en el sistema cromatográfico para así obtener el porcentaje de recuperación.

La sensibilidad se estudió por medio de las curvas de calibración y de esta manera poder determinar qué tan sensible resultó el método para cada una de las especies consideradas

en estudio; para ello se utilizó la siguiente ecuación:
$$S = \frac{dy}{dC} \quad (1)$$

Donde de S es la sensibilidad; dy es el diferencial de las señales y dC el diferencial de las concentraciones (Cámara *et al.*, 2004).

2.5. Procedimientos

2.5.1. Tratamiento de las muestras de sangre completa y plasma para la determinación de selenio total

Las muestras de sangre completa se centrifugaron a aproximadamente 5500 rpm durante 15 min para obtener el plasma y las células sanguíneas por separado, luego se empleó digestión en medio básico para la mineralización de las muestras para sangre completa y plasma. Para esto se utilizó un volumen de 0,5 mL de sangre y plasma con volúmenes variables de (NH₄OH 1 M y 2 M), H₂O₂ al 30% v/v y 20 µL de 1-octanol (aprox. 2 gotas) como antiespumante. Esto se realizó en matraces abiertos en un ambiente de baja temperatura para evitar pérdidas del analito por volatilización. Las muestras se dejaron estabilizar por aproximadamente 24h hasta la mineralización total de las mismas, finalmente se transfirieron a matraces volumétricos que se aforaron a 10 mL con agua desionizada. Los blancos se prepararon con los mismos reactivos, pero en ausencia de la muestra bajo las mismas condiciones de mineralización.

2.5.2. Determinación de la concentración total de selenio en las muestras de sangre y plasma

La determinación de la concentración total de Se en las muestras de sangre y plasma una vez digeridas se llevó a cabo mediante la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), utilizando curvas de calibración elaboradas con patrones acuosos en ácido nítrico al 2% v/v. Estos patrones se prepararon cada vez que se realizaron las determinaciones analíticas y fueron preparados a partir de soluciones intermedias partiendo de una solución de 1000 mg Se.L⁻¹ del isótopo de ⁸²Se (Peacheya *et al.*, 2009).

2.5.3. Especiación química de selenio en muestras de sangre completa por HPLC-ICP-MS

Para la metodología de extracción de las especies de selenio por HPLC-ICP-MS, se tomaron 250µL de sangre completa y se colocaron en tubos de polipropileno con 4,75 mL de una solución que contenía: HCl al 0,1% v/v; L-cisteína al 0,05% m/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v. La mezcla fue colocada en un baño de ultrasonidos (1400 A Maraca LR) por 15min. Las soluciones resultantes fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min y posteriormente filtradas antes de la inyección en el cromatógrafo HPLC. (Colina, 2001; Rodriguez *et al.*, 2009).

La separación y cuantificación de las especies de selenio se realizó mediante HPLC-ICP-MS en las cuales se evaluaron dos fases móviles diferentes:

Método 1: Bajo la modalidad de fase reversa para especies orgánicas (SelenoDLcisteína y SelenoDLmetionina) utilizando como fase móvil: 0.1% de Ácido Fórmico, metanol al 1% y agua grado HPLC, utilizando un flujo de elución de 1.3 mL.min⁻¹ en modo isocrático y una columna C18 en fase reversa (Hernández, 2010).

Método 2: Se utilizó EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1%, acetato de amonio 0,06 M y metanol al 3% en agua, y una columna C18 en fase reversa. La separación cromatográfica de Se-DL-Cys y Se-DL-Met se realizó en modo isocrático empleando un volumen de inyección de muestra de 50 µL y un flujo de elución de 1.00 mL.min⁻¹ (Colina, 2001).

El acoplamiento HPLC-ICP-MS se realizó por conexión entre la salida de la columna analítica y el nebulizador a través de un tubo capilar de PTFE (politetrafluoretileno) de 30 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro interno.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de los parámetros analíticos para selenio total

La técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) goza de un amplio reconocimiento como técnica principal para el análisis de metales traza. Proporciona una sensibilidad muy por encima de la que proporciona la técnica ICP-OES y una velocidad de análisis de muestras muy superior a la de los instrumentos de absorción atómica con cámara de grafito. El ICP-MS cumple ambos requisitos en un rango de trabajo analítico más amplio, además de añadir capacidades de análisis isotópico, sin interferencias y en un único modo de adquisición. El procedimiento ICP-MS combina la eficiencia en la descomposición de las muestras para formar iones con la potencia de la espectrometría de masas para distinguir iones de masas diferentes, ofreciendo una gran detectabilidad en la determinación de selenio y otros elementos, pudiendo incluso realizar estudios de especiación. Otro avance importante es la posibilidad de cuantificar individualmente cada uno de los isótopos del selenio, por lo que se considera un método ideal para el estudio del metabolismo utilizando isótopos estables de este metaloide en el plasma, eritrocitos, y orina (Wilbur, 2007; Amy, Rosen & Hieftje, 2005; Umesh *et al.*, 2017).

3.1.1. Curva de calibración

La curva de calibración obtenida a partir de las soluciones patrones de Se cuyo intervalo de concentraciones estuvo entre 5,0 – 20,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. obteniéndose una buena linealidad y cumplimiento de la Ley de Beer, por lo tanto, la calidad de la determinación de la concentración de Se aceptable debido a la excelente capacidad de respuesta del ICP-MS para establecer la señal medida proporcional a la concentración de Se en términos de sensibilidad.

En la **tabla 2** se muestran los parámetros estadísticos asociados a la curva de calibración empleada en la determinación de la concentración total de Se. Estos valores evidencian la solidez de esta herramienta analítica basado en el manejo estadístico de la data, lo cual permite su uso en la cuantificación del analito en estudio.

También se muestran los límites de detección (L_D , calculado como la concentración correspondiente a tres veces la desviación estándar del blanco) y de cuantificación (L_Q , calculado como la concentración correspondiente a diez veces la desviación estándar del blanco) (Miller & Miller, 2002) y la sensibilidad instrumental (S , calculado como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio) la cual fue de 661,47. Estos resultados indican la alta sensibilidad de la técnica de ICP-MS y los bajos límites de detección para el análisis de muestras de sangre completa y plasma sanguíneo en pacientes diagnosticados con leucemia.

Tabla 2. Parámetros estadísticos asociados a la curva de calibración de Se.

<i>Metal</i>	<i>Ecuación de regresión</i>	r^2	<i>I.L.^b</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	L_D ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	L_Q ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	<i>DE de la pendiente</i>	<i>DE del intercepto</i>
Se	$y = 661,47x - 4,177$	0,999	5,0-20,0	0,03	0,04	0,39	0,051

$n=3$, ^a Coeficiente de correlación, ^b Intervalo lineal, DE = Desviación estándar.

3.2. Estudio de interferencias no espectrales

El estudio de interferencias no espectrales fue realizado comparando las pendientes de la curva de calibración, en matriz de ácido nítrico al 2% v/v, con aquellas obtenidas por el método de adición estándar para las diferentes matrices evaluadas.

La **figura 1** muestra las curvas de adición estándar obtenidas para la determinación de selenio en muestras de sangre completa de pacientes con leucemia por ICP-MS con respecto a la curva de calibración, observándose el excelente paralelismo entre las gráficas allí expresadas y por consiguiente la inexistencia de interferencias no espectrales en este tipo de matriz, además se obtuvieron porcentajes de error entre pendientes menores a (5,0%) los cuales se expresan en la **tabla 3** cuya media de los porcentajes fue de 3.03%, en tal sentido, se encontraron ecuaciones para las curvas de adición estándar estadísticamente similares ($p \leq 0,05$) a las de las curvas de calibración. Este hecho refuerza

el uso de las curvas de calibración para la determinación de selenio en sangre completa de pacientes con leucemia.

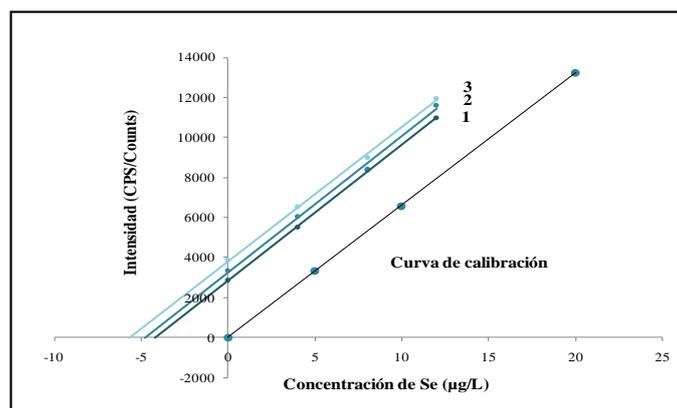


Figura 1. Curvas de adición estándar y calibración para la determinación de Se total en sangre completa.

Tabla 3. Parámetros de regresión obtenidos de las adiciones estándar para la determinación de Se total en muestras de sangre completa.

Adición estándar	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación (r)	% Error entre pendientes
1	$y = 630,64 x + 2845,4$	0,998	4,66
2	$y = 681,57 x + 3271,3$	0,998	3,04
3	$y = 670,59 x + 3818,7$	0,997	1,38

$n=3$

Estos resultados indican que no existen efectos de matriz, siendo el método libre de interferencias del tipo no espectral y puede ser aplicado para la determinación de la concentración total de selenio por ICP-MS en este tipo de muestra.

3.3. Precisión

El estudio de precisión del método desarrollado para la determinación de Se en sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia, se realizó en muestras reales diluidas (**Tabla 4**). Estos resultados de precisión en la corrida y entre corridas son expresados como media (\bar{X} , en $\mu\text{g Se.L}^{-1}$), desviación estándar (DE, en $\mu\text{g Se.L}^{-1}$) y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (DER o CV, en %), obtenidos para la determinación de Se por ICP-MS.

Los experimentos se realizaron en tres alícuotas de cada una de las muestras reales y las determinaciones de Se total en estas porciones de prueba se hicieron por pentaplicado. Los resultados obtenidos señalan que la DER promedio fue de 0,8 % y 2,71 %, para la precisión en la corrida y entre corridas respectivamente, y fueron menores al 5,0 % lo cual internacionalmente se considera adecuado para este tipo de análisis (Sierra *et al.*, 2009).

3.4. Exactitud

Los resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud para la determinación de Se total, se expresan en la **tabla 6**. La exactitud se evaluó mediante un estudio de recuperación (método de adición estándar), adicionando concentraciones conocidas de Se a muestras de sangre completa de pacientes con leucemia (mineralizadas). En la **tabla 5** se muestran los valores esperados y los valores encontrados en la evaluación de la exactitud mediante estudios de recuperación (método de adición estándar) expresados como la media de los porcentajes (%) de recuperación para una muestra mineralizada y determinada por ICP-MS. Se obtuvieron valores analíticamente aceptables a nivel internacional (Sierra *et al.*, 2009) encontrándose en un intervalo entre el 95 y 105%, que indican que el método desarrollado estuvo libre de interferencias fue confiable y reproducible, por lo tanto, es adecuado para la determinación de Se total en muestras de sangre.

Tabla 4. Estudios de precisión en la corrida y entre corridas para la determinación de Se total en muestras de sangre completa por ICP-MS.

Muestra	Media X ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	En la corrida		Entre corridas	
		DE ($\mu\text{g Se.L}^{-1}$)	DER (%)	DE ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	DER (%)
1	4,51	0,007	0,15	0,009	0,22
2	4,81	0,062	1,29	0,296	6,16
3	5,69	0,055	0,96	0,099	1,75

Tabla 5. Estudio de exactitud para la determinación de Se total en muestras de sangre completa mineralizadas por ICP-MS usando el método de adición estándar.

Adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g Se.L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g Se.L}^{-1}$)	Recuperado (%)
4	9,70	9,86	101,64
8	13,70	13,64	99,56
12	17,70	18,10	102,26
			101,15 \pm 1.4

3.5. Optimización del tratamiento de las muestras de sangre completa y plasma

Para la determinación de las concentraciones totales de Se en sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia por IPC-MS, es necesario tener el analito libre en solución, por lo que se debe tratar la muestra con métodos factibles que permitan obtener

al analito libre, es por ello, que se llevó a cabo una digestión en medio básico con hidróxido de amonio y peróxido de hidrógeno con un volumen constante de muestra (0,5 mL) y variando el volumen de agente oxidante (H₂O₂ conc.), volumen y concentración de base (NH₄OH, 1 M y 2M). Dado que dicho tratamiento genera un exceso de espuma debido a la degradación de la materia orgánica presente en las muestras de sangre que imposibilita la adecuada dilución de la misma, se utilizó 20 µL de 1-octanol como agente antiespumante. En la **tabla 6** se resumen los volúmenes de dichos reactivos (H₂O₂/NH₄OH), utilizados para la determinación de Se total en sangre completa. Se buscaba maximizar la concentración de Se total en sangre completa, para ello, se utilizaron diferentes combinaciones de volúmenes de (H₂O₂/NH₄OH) y modificando la concentración de base para el tratamiento. Se observó que los diferentes volúmenes utilizados no afectaba significativamente en la determinación de la concentración de Se total en la muestra de sangre ($p > 0,05$) para una misma concentración de base, pero si entre diferentes concentraciones de base (NH₄OH, 1M y 2M). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), para un límite de confianza del 95%. Se establecieron como volúmenes óptimos, 4 mL para H₂O₂ conc. y 2 mL para NH₄OH 1 M, los cuales mejoraron la detección de Se total, buscando un menor consumo de reactivo, minimizar costos y toxicidad. Las mismas condiciones se adaptaron para el tratamiento de plasma.

Tabla 6. Volúmenes de NH₄OH y H₂O₂ en la digestión de las muestras de sangre completa ($n=3$) ($*p < 0,05$).

Concentración NH ₄ OH (mol.L ⁻¹)	Volumen (mL) de (H ₂ O ₂ /NH ₄ OH)	Concentración de Se
		(µg.L ⁻¹) X ± DE
1	4/2	270,6 ± 3,6
	4/4	204,6 ± 1,7*
	6/2	260,4 ± 6,0
	6/4	207,8 ± 8,3
2	4/2	239,6 ± 3,3
	4/4	143,9 ± 3,1*
	6/2	203,1 ± 1,6
	6/4	193,5 ± 2,6

3.6. Concentraciones totales de Se en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia

La metodología validada se empleó para establecer las concentraciones totales de Se para 35 pacientes con leucemia clasificados por edad y sexo, expresados en la **tabla 7**.

Tabla 7. Concentraciones totales de Se en sangre completa de pacientes con leucemia.

Grupo (años)	Sexo	n	Concentración de Se ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
			$\bar{X} \pm \text{DE}$	Intervalo
1–19	M	10	284,7 \pm 151,0	59,2 - 588,5
	F	8	276,3 \pm 104,6	78,6 - 356,7
20–40	M	3	261,9 \pm 95,4	165,3 - 356,1
	F	3	164,4 \pm 57,5	103,6 - 217,8
41–60	M	4	294,0 \pm 117,7	208,3 - 458,9
	F	2	237,9 \pm 45,6	205,7 - 270,1
61–80	M	3	226,1 \pm 68,5	147,2 - 270,6
	F	2	155,1 \pm 36,4	129,4 - 180,8

Las concentraciones de Se en sangre completa de los pacientes en estudio variaron de acuerdo a la edad, encontrándose mayor contenido de Se total en pacientes con edades comprendidas de (1–19) y de (41–60) que para el resto de la población, sin embargo, no existieron diferencias significativas para estos grupos de edades ($p \leq 0,05$) ni para el resto de la población. De forma general, se encontraron mayores concentraciones de Se total en la población masculina que en la femenina tanto para sangre como para plasma y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de que la concentración de Se total varíe con el sexo de la población en estudio, debido a la forma en la que el Se ingresa al organismo a través de los alimentos, por lo que va depender en gran parte de una adecuada alimentación, ya que los niveles de Se en el organismo varían con la alimentación (Navarro & Cabrera, 2008).

La concentración de selenio en el plasma (o suero) está relacionada con la ingesta y responde de forma relativamente rápida. Dentro de una misma población, los niños tienen concentraciones más bajas que los adultos. Al nacer, el selenio plasmático es de un 40 a un 70% del valor materno decreciendo su concentración durante los 4 primeros meses de vida, y elevándose gradualmente, hasta alcanzar los valores de un adulto en los últimos años de la adolescencia. La concentración en sangre y en eritrocitos es aproximadamente un 15% y un 37%, respectivamente, más elevada que en el plasma (Casals *et al.*, 2005).

Cabe destacar que los productos derivados de cereales, carne, huevos y pescado son las fuentes de selenio principales de la dieta. Los niveles dependen de la clase de alimento y de la concentración y accesibilidad del selenio del suelo en el que se cultivan las plantas, por lo que los valores de selenio varían considerablemente (Navarro & Cabrera, 2008).

3.7. Concentraciones totales de selenio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia (PL) e individuos controles (PC)

En la **tabla 8** se muestran las concentraciones de Se de pacientes con leucemia para sangre completa (PL, $n = 35$) y plasma (PL, $n = 5$) y de 5 individuos sanos que conformaron la población control (PC, $n = 5$). Para las concentraciones de Se en sangre completa y plasma de pacientes con leucemia y la población control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las concentraciones de Se total. Se encontraron concentraciones de Se mayores en sangre completa y plasma de los pacientes que en la población control. Estadísticamente hasta ahora tanto las concentraciones de Se en sangre y plasma de PL y PC resultaron ser idénticas y este elemento no guarda relación con la enfermedad de la leucemia.

Sin embargo, un análisis total del elemento es insuficiente para conocer su papel biológico en esta patología por lo que se necesitarán llevar a cabo estudios de especiación y evaluar algunas de las especies de Se presentes en las muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y conocer la biodisponibilidad de las mismas y su relación con la patología.

Tabla 8. Concentraciones de Se total encontradas en pacientes con leucemia (PL, $n = 35$) para sangre completa, (PL, $n = 5$) para plasma y población control (PC, $n = 5$). ($P > 0,05$).

Población	Muestra	Concentración de Se ($\mu\text{g.L}^{-1}$) $X \pm DE$
PL	SC	$243,6 \pm 112,3$
	P	$141,7 \pm 34,1$
PC	SC	$198,0 \pm 40,6$
	P	$159,1 \pm 30,1$

SC = Sangre completa, P = Plasma.

Granadillo (2009) encontró valores de concentración media de Se total ($\mu\text{g.L}^{-1}$) en muestras de sangre completa de pacientes con leucemia del Instituto Hematológico de Occidente ($n = 32$): $218,4 \pm 45,6$ los cuales se compararon con las concentraciones encontradas en la población en estudio, resultando ser más bajas, para una media ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de la población en estudio ($n = 35$): $243,6 \pm 112,3$. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), tomando en cuenta que la población estudiada por Granadillo fueron pacientes con leucemia de la ciudad Maracaibo Edo. Zulia y los pacientes bajo estudio pertenecen a la ciudad de Barquisimeto Edo. Lara, los cuales pueden estar sometidos a una dieta especial a base de Se para cubrir las funciones metabólicas normales de este elemento traza en el organismo, a través de la dieta diaria y/o como posible suplemento para tratar la enfermedad.

Van *et al.*, 2007 establecieron los niveles de Se en plasma de donadores sanos del banco de sangre de la parte central-este de Bélgica ($79,7 \pm 4,4 \text{ ng.L}^{-1}$) y otros países de Europa

tales como: Francia ($75,8 \pm 2,4 \text{ ng.L}^{-1}$), Alemania ($106,5 \pm 16,5 \text{ ng.L}^{-1}$), Portugal ($98 \pm 16 \text{ ng.L}^{-1}$), España ($74,7 \pm 25,2 \text{ ng.L}^{-1}$) y Eslovenia ($66 \pm 15 \text{ ng.L}^{-1}$).

Las medidas más habituales de la exposición humana a selenio son el contenido de selenio de la sangre completa, suero o plasma. La fracción de sangre que se elige para el análisis depende de las circunstancias. El plasma y el suero reflejan los cambios en la ingesta de selenio de manera más rápida que los eritrocitos. Puede ser posible utilizar los niveles de selenio en plasma para valorar la concentración a corto plazo y el selenio de los eritrocitos y la sangre completa para reflejar la concentración a largo plazo. Esta atribución puede explicarse por el hecho de que el selenio está enlazado en los eritrocitos de manera estable y la vida media de los eritrocitos es de unos 120 días. Las concentraciones en los eritrocitos se mantienen proporcionales a la ingesta diaria de selenio. A concentraciones más altas, la capacidad de transporte del plasma llega a saturarse y los eritrocitos soportan todo el incremento de este elemento (Schaller & Schiele, 2006).

La variación de la concentración de Se total en sangre y plasma se debe a la alimentación. El contenido de Se en el alimento depende de la zona geográfica y de la relación suelo planta, por lo tanto, en zonas donde la dieta sea baja en Se los niveles en sangre y plasma disminuirán y viceversa. Entre otras fuentes de variación de Se, se encuentra la edad, la raza y la época del año. Actualmente en la práctica clínica, es importante el seguimiento de las concentraciones de selenio en el plasma en pacientes a los que se les considera proclives padecer una deficiencia de este elemento como consecuencia de una enfermedad, una terapia, o una ingesta deficiente y/o crónica, por lo que la concentración de selenio en el plasma valora de una forma adecuada el contenido corporal de selenio en el organismo (Schaller & Schiele, 2006)

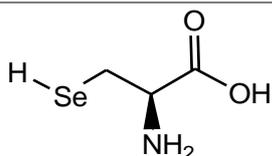
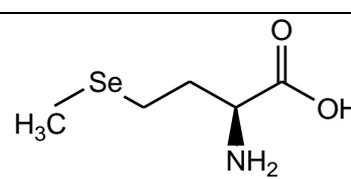
3.8. Especiación química de selenio por HPLC-ICP-MS

En relación a los sistemas de detección utilizados para realizar estudio de especiación se encuentran: las técnicas de espectrometría atómica (AAS, ICP-OES) y la de masa ICP-MS. La técnica ICP-MS se utiliza para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas, además ofrece mejores límites de detección (Cáceres, 2002; Cabañero *et al.*, 2005).

El selenio forma parte de enzimas que cumplen funciones importantes en el organismo, y es por ello que hoy en día es de interés determinar además del selenio total, también son importantes algunas especies orgánicas de este elemento como los selenoaminoácidos que constituyen parte de las selenoproteínas. En tal sentido, en el presente trabajo se enfocó en las dos especies orgánicas de selenio (SeDLCys y SeDLMet) más importantes,

las cuales participan en procesos biológicos esenciales y las de mayor biodisponibilidad en el organismo (**Tabla 9**). Para este fin, se requiere de una técnica de separación como la cromatografía líquida en combinación con una técnica de espectrometría de masas. En esta investigación se realizó el acoplamiento HPLC con detección por ICP-MS

Tabla 9. Estructuras de las especies orgánicas de selenio en estudio (Rayman, 2009).

NOMBRE	ESTRUCTURA
SELENODLCISTEÍNA	
SELENODLMETIONINA	

3.8.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

Una vez realizado el acoplamiento HPLC-ICP-MS y establecidas las condiciones para la detección de los selenocompuestos en estudio, se inició la optimización de la separación de los selenoaminoácidos, para ello se emplearon diferentes fases móviles. Con la finalidad de identificar las especies en estudio, estándares en un intervalo de 5-100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se inyectaron individualmente para conocer el tiempo de retención de cada especie. Posteriormente se preparó una mezcla compuesta por selenoDLcisteína y selenoDLmetionina a una concentración de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada especie y se inyectaron en el sistema cromatográfico para observar la separación de estos compuestos. En este caso, se lograron obtener señales de poca intensidad, por esta razón, se incrementó la concentración a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, sin embargo, la señal observada resultó ser poco intensa. En la **figura 2** se muestra el cromatograma para una mezcla de patrones de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ por especie, utilizando inicialmente como fase móvil: 0,1% ácido fórmico, 1% de metanol y 98,9% de agua grado HPLC, con una velocidad de flujo de 1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y con un volumen de inyección de 50 μL , la cual fue seleccionada de la literatura (Hernández, 2010). En el cromatograma se puede observar que existe una buena resolución en el sistema cromatográfico, por lo tanto, una buena separación de las especies de selenio. Así se tiene, que para la especie de SelenoDLcisteína (SeDLCys) se obtuvo un tiempo de retención de 1,96 min y para la selenoDLmetionina (SeDLMet) un tiempo de 3,08 min.

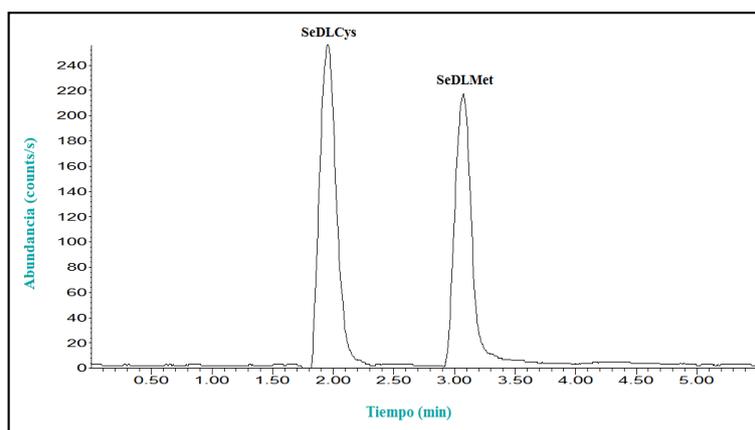


Figura 2. Cromatograma de la SeDLCys y SeDLMet a una concentración de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, condiciones: Volumen de inyección: $50 \mu\text{L}$. Velocidad de flujo: $1,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Columna C_{18} . Fase móvil: 0,1% de ácido fórmico, 1% metanol.

El pH de la fase móvil influye en esta modalidad cromatográfica sobre el grado de ionización del analito. Un aumento o disminución del mismo favorece o desfavorece la ionización del analito y por lo tanto su retención en la fase estacionaria.

Con la finalidad de reducir los tiempos de retención y aumentar la intensidad de las señales cromatográficas para las especies de selenio en estudio, se procedió a preparar una mezcla compuesta por SeDLCys y SeDLMet a una concentración de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ para cada especie en agua grado HPLC y se inyectaron en el sistema cromatográfico, empleando una segunda fase móvil, la cual estuvo compuesta por 0,06 mM de acetato de amonio, 3% de metanol, 0,1% de 2-mercaptoetanol y 2 mM de EDTA, utilizando un volumen de inyección de $50 \mu\text{L}$, con una velocidad de flujo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y una columna C18. La cual fue seleccionada de la literatura (Colina, 2001).

En la **figura 3** se representa el cromatograma de una mezcla de SeDLCys y SeDLMet con una concentración de $20 \mu\text{g/L}$ por especie. Se puede observar que en este caso también existe una buena resolución en el sistema cromatográfico. Con el empleo de esta fase (Fase móvil: 0,1% 2-mercaptoetanol, 0,06M de acetato de amonio, 2mM de EDTA y 3% de metanol), se obtiene una mayor intensidad de las señales cromatográficas para las especies de selenio en estudio, así como una disminución en los tiempos de retención de las especies en comparación con la fase móvil empleada inicialmente, obteniéndose tiempos de retención para la SeDLCys y SeDLMet de 1,52 y 2,11 min respectivamente.

Entre los modificadores más comunes utilizados se encuentran el metanol (MeOH), etanol (EtOH) y el acetonitrilo (ACN). De igual forma se reporta el uso de agentes que pueden controlar la ionización del analito tales como ácidos orgánicos, entre los cuales se encuentran el ácido acético (HAc), el ácido fórmico (HCO_2H) y el ácido

etilendiaminotetracético (EDTA). En general, estos últimos se emplean a bajas concentraciones para disminuir el poder ionizante del analito y reducir la retención en la fase estacionaria, además, actúan como fuente de protones y mejoran la forma de la señal cromatográfica (Quattrocchi, Abelaira, Laba, 1992). El aumento del porcentaje de metanol por encima de 3%, no afecta a los tiempos de retención de las especies estudiadas; sin embargo, provoca un leve ensanchamiento de los picos correspondientes a las especies orgánicas, empeorando la resolución cromatográfica. Por otro lado, el aumento en la cantidad de disolvente orgánico ejerce un efecto reductor en la señal de selenio por ICP-MS. En vista de los resultados, se decidió seguir trabajando con un porcentaje de un 3% de metanol para el resto de los experimentos como lo reporta la literatura. Por su parte, el pH de la fase móvil se encontraba entre 6–7,5 a temperatura ambiente.

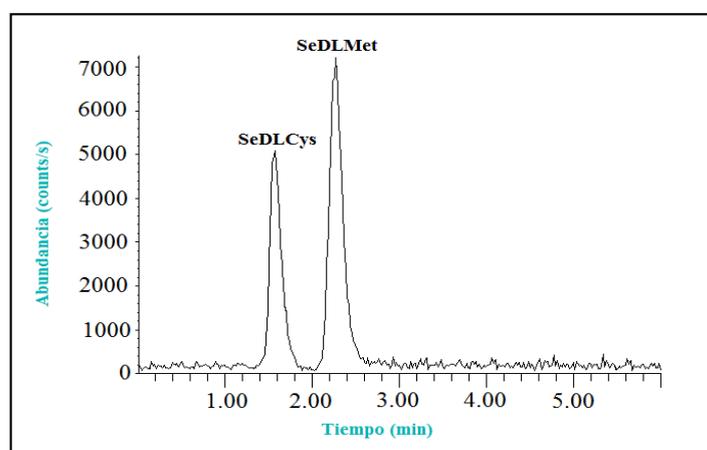


Figura 3. Cromatograma de la SeDLCys y SeDLMet a una concentración de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, condiciones: Volumen de inyección: $50 \mu\text{L}$. Velocidad de flujo: $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Columna C₁₈.

Al aumentar el pH de la fase móvil se produce una reducción en los tiempos de retención de las especies de selenio, hecho que es mucho más marcado para la especie SelenoDLmetionina. A pH ácidos próximos a 2, los grupos carboxílicos de los aminoácidos se encuentran protonados, confiriendo a las moléculas una carga neta positiva (debido al grupo $-\text{NH}_3^+$), mientras que a pH superiores adquieren la forma de zwitterión. Esto podría explicar la reducción de la retención de las especies a pHs superiores, donde la carga negativa del grupo carboxilato interactúa con la fase estacionaria por repulsiones electrostáticas, y de esta manera acortando los tiempos de retención de las especies de selenio en estudio, junto con una reducción en la anchura de sus picos.

En las **tablas 10 y 11** se observan los valores de los parámetros cromatográficos tales como: tiempo de retención, factor de retención, número de platos teóricos, factor de selectividad y resolución de la columna para cada fase móvil empleada.

Los resultados de la resolución (R_s) muestran también un grado de separación correcta de las especies ya que presentan valores por encima de 1,5, del mismo modo los resultados en cuanto al factor de selectividad (α) demuestran que esta resultó efectiva para la separación de los selenocompuestos corroborando la eficiencia de la separación cromatográfica.

Tabla 10. Parámetros cromatográficos para la separación de selenoaminoácidos estudiados a una concentración de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ utilizando una columna C_{18} , fase móvil: 0,1% ácido fórmico, 1% metanol y 98,9% agua a un flujo de $1,3 \text{ mL.min}^{-1}$ ($n=3$)

Especie	Tiempo de retención (min)	Factor de retención (k')	Número de platos teóricos (N)	Factor de selectividad (α)	Resolución (R_s)
SeDLCys	1,96	2,32	784	1,82	3,85
SeDLMet	3,08	4,22	1936		

En la **tabla 11**, empleando una fase móvil de 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM EDTA a un flujo de 1,0 mL/min, se observan que los valores del factor de retención (k') y los cortos tiempos de retención demuestran una elución eficiente en términos de tiempo de análisis, indicando un menor tiempo de permanencia de los analitos en la fase estacionaria y en la fase móvil, los cuales son adecuados para la separación ya que se encuentran entre un intervalo ideal entre 2 y 10. El valor de la resolución (R_s) muestra también un grado de separación correcta de las especies ya que presentan valores por encima de 1,5 lo cual indica los cortos tiempos de elución de las especies en el análisis, de igual forma los resultados en cuanto al factor de selectividad (α) demuestran que también resultó ser efectiva para la separación de los selenocompuestos, indicando la buena eficiencia de la separación cromatográfica.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el empleo de ambas fases móviles resultaron por lo general ser adecuadas para la separación de las especies de selenio exhibiendo factores de retención adecuados, cortos tiempos de análisis, y buena resolución en las separaciones. No se encontraron diferencias significativas en términos de selectividad cromatográfica para las fases empleadas. En tal sentido, la mezcla de 0,1% de 2-mercaptoetanol, 3% de metanol, 0,06M de acetato de amonio y 2mM de EDTA utilizada como fase móvil, permitió la separación adecuada de las dos especies de selenio, con una buena resolución en la separación, tiempos de retención más cortos, picos más definidos y señales cromatográficas más intensas, por lo que se tomo como las condiciones óptima de trabajo para el análisis de especiación de selenio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia.

Tabla 11. Parámetros cromatográficos para la separación de selenoaminoácidos estudiados a una concentración de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ utilizando una columna C₁₈, fase móvil: 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM EDTA a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹ (n=3)

Especie	Tiempo de retención (min)	Factor de retención (k')	Número de platos teóricos (N)	Factor de selectividad (α)	Resolución (Rs)
SeDLCys	1,52	2,04	591	1,57	2,11
SeDLMet	2,11	3,22	741		

3.9. Evaluación de los parámetros analíticos

3.9.1. Curvas de calibración

Una vez optimizadas las condiciones para la separación de los selenocompuestos estudiados se prepararon las respectivas curvas de calibración. En la **tabla 12** se muestran las ecuaciones de regresión, los intervalos lineales, coeficientes de correlación lineal, límites de detección y cuantificación para cada especie.

Cabe mencionar que los límites de detección (L_D) y cuantificación (L_Q) fueron calculados a partir de cinco determinaciones de una disolución patrón de menor concentración, ya que la señal procedente del blanco no era discernible de la línea base del cromatograma. La concentración de esta disolución fue de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Se por especie. Para ambas especies la linealidad fue buena obteniéndose bajos límites de detección, sin embargo, la especie selenoDLcisteína resultó ser menos sensible que la especie selenoDLmetionina reflejada en una menor pendiente de curva

Tabla 12. Parámetros estadísticos asociados a la curva de calibración de los selenocompuestos.

Especie	Ecuación de regresión	r^a	I.L. ^b ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	L_D ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	L_Q ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DE de la pendiente	DE del intercepto
SeDLCys	$y = 213,47x + 19,496$	0,995	5,0-20,0	0,46	0,47	3,15	0,53
SeDLMet	$y = 312,77x + 35,048$	0,991	5,0-20,0	0,45	0,47	2,57	0,46

$n=3$, ^a Coeficiente de correlación, ^b Intervalo lineal, DE = Desviación estándar.

La sensibilidad instrumental (S , calculado como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio para la selenoDLcisteína fue de 213,47 mientras que para la selenoDLmetionina fue de 312,77. Estos resultados indican la buena sensibilidad de la técnica de HPLC-ICP-MS, siendo más sensible en la detección la especie selenoDLmetionina.

3.9.2. Precisión

Para el estudio de precisión del método desarrollado para la determinación de las especies de Se en muestras de sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia, se evaluó mediante una muestra de sangre preparada por triplicado la cual se inyectó en el sistema cromatográfico y leída por pentuplicado.

En la **tabla 13** se representan los resultados de precisión en la corrida y entre corridas los cuales son expresados como (desviación estándar, DE) y (desviación estándar relativa, DER) para una muestra cuya especie contenía selenoDLcisteína. Los resultados obtenidos señalan que la DER promedio fue de 1,58 % y 2,46 %, para la precisión en la corrida y entre corridas respectivamente, las cuales fueron menores al 5,0% indicando que el método por HPLC-ICP-MS es reproducible, lo que internacionalmente se considera adecuado para este tipo de análisis. Cabe señalar que las inyecciones de muestras en el cromatógrafo HPLC se hacen de forma automatizada, evitando así errores aleatorios o sistemáticos por parte del analista.

Tabla 13. Estudios de precisión en la corrida y entre corridas para la determinación de selenoDLcisteína en una muestra de sangre completa por HPLC-ICP-MS.

Muestra	Concentración de selenoDLcisteína ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	En la corrida		Entre corridas	
		DE	DER (%)	DE	DER (%)
1	4,09	0,058	1,42	0,073	1,78
2	4,13	0,045	1,09	0,121	2,92
3	4,40	0,098	2,23	0,118	2,68

$n=3$

3.9.3. Exactitud

La exactitud se evaluó mediante un estudio de recuperación, adicionando 3 niveles de concentraciones conocidas de la especie selenoDLcisteína a una muestra de sangre completa mineralizada. Los resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud para la determinación de la especie de selenio por HPLC-ICP-MS, se expresan en la **tabla14**.

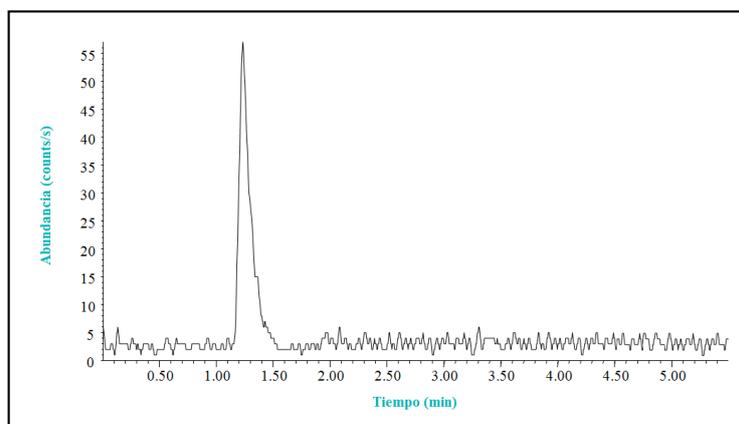
En la **tabla 14** se muestran los valores esperados y los valores encontrados en la evaluación de la exactitud mediante estudios de recuperación expresados como la media de los porcentajes (%) de recuperación para una muestra de sangre conteniendo la especie selenoDLcisteína. Se obtuvieron valores aceptables a nivel internacional, encontrándose en un intervalo entre el 95 y 105%, que indican que el método desarrollado fue confiable, reproducible y adecuado para la determinación de selenocompuestos en muestras de sangre y plasma utilizando HPLC-ICP-MS.

Tabla 14. Estudio de exactitud para la determinación de SelenoDLcisteína en una sangre completa mineralizada determinado por HPLC-ICP-MS.

Muestra	Concentración de selenoDLcisteína ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	(%) Recuperación
Sangre	4,09	10	14,09	13,91	98,72
		20	24,09	23,69	98,34
		40	44,09	43,84	99,43
					98,83 \pm 0,6

3.9.4. Evaluación del Proceso de Extracción

Como inicialmente se hicieron inyecciones directas de muestras de sangre mineralizadas las cuales presentaron poca intensidad en las señales cromatográfica como se muestra en la **figura 4**, lo que demuestra la bajas concentraciones en las que se encuentran los selenocompuestos en la muestra, que este caso solo se evidenció la presencia de la especie selenoDLcisteína, por lo que se procedió a realizar una extracción de las muestras de sangre completa con una solución que contenía L-cisteína al 0,05% m/v, ácido clorhídrico al 0,1% v/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v. La solución extractante fue preparada con agua grado HPLC, como así lo reporta la literatura (Colina, 2001).

**Figura 4.** Cromatograma de una muestra de sangre completa mineralizada.

Es importante resaltar que la extracción empleada para la especiación de selenio en muestras de sangre completa y plasma en una técnica de pretratamiento de la muestra, lo cual resulta muy importante para la obtención de las especies en estudio, a partir de una matriz compleja como lo es la sangre. Las especies deben formar una molécula neutra y estable con un agente acomplejante específico para que pueda lograrse la extracción cuantitativa de los analitos bajo estudio (Granadillo, 2009). En consecuencia, solo la especie química selenoDLcisteína pudo ser evaluada y detectada mediante el uso de esta extracción en fase líquida, por lo que luego de la extracción de las muestras de sangre

completa en forma de la especie selenoDLcisteína, la solución resultante fue inyectada en el sistema cromatográfico y de este modo evaluar la eficiencia de la extracción.

En la **tabla 15** se muestran los resultados de la recuperación de la especie selenoDLcisteína utilizando una solución de L-cisteína al 0,05% m/v, ácido clorhídrico al 0,1% v/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v a pH= 6–7, para evaluar el proceso de extracción en la determinación de selenocompuestos por HPLC-ICP-MS. Para ello, se adicionaron concentraciones conocidas del estándar de selenoDLcisteína a la muestra de sangre antes del proceso de extracción con la solución antes mencionada hasta un volumen final de 5 mL, obteniéndose recuperaciones analíticamente aceptables dentro del intervalo permitido de 95–105 %, resultando el proceso de extracción confiable, reproducible y adecuado para la determinación de selenoDLcisteína en muestras de sangre completa.

Tabla 15. Estudio de recuperación del proceso de extracción de la especie SelenoDLcisteína en una sangre completa.

Muestra	Concentración de selenoDLcisteína ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Esperado ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	(%) Recuperación
Sangre	6,22	20	26,22	26,06	99,39
		40	46,22	47,31	102,35
		50	56,22	58,49	104,03
					101,92 \pm 2,3

En general, el proceso de extracción como pretratamiento de las muestras de sangre completa para el análisis de especiación de selenio, resulta satisfactorio en comparación con muestras de sangre mineralizadas previamente, sin embargo, en ambos casos la muestra necesita un tratamiento previo que permita sacarle el mayor provecho en el análisis cuantitativo de las especies de selenio bajo estudio. Cabe mencionar que el proceso de extracción utilizando la solución de L-cisteína al 0,05% m/v, ácido clorhídrico al 0,1% v/v y 2-mercaptoetanol al 0,1% v/v resulta ser selectivo para la especie selenoDLcisteína debido a que químicamente intervienen una serie de reacciones que permitió analíticamente cuantificarla exitosamente, en dicho proceso de extracción ocurre lo siguiente:

La cisteína [$\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$] es un α -aminoácido no esencial, lo que significa que puede ser sintetizado por los humanos. La parte de la cadena donde se encuentra la cisteína es el tiol que es no polar y por esto la cisteína es un aminoácido hidrofóbico, de allí su disolución en medio ácido. La parte tiol de la cadena suele participar en reacciones enzimáticas, actuando como nucleófilo. El tiol es susceptible a la oxidación para dar lugar a puentes disulfuros derivados de la cisteína que tienen un importante papel estructural en muchas proteínas. La cisteína también llamada cistina, se trata de un dímero de dos

cisteínas a través de un puente disulfuro (S-S) (Johannson, Gafvelin & Arnér, 2005; Rodriguez *et al.*, 2009).

Ahora bien, al entrar en contacto la solución que contiene L-cisteína de alguna manera interactúa con el selenio presente en la sangre completa desplazando los átomos de azufre para convertirse en selenocisteína, y todas aquellas proteínas presentes en la sangre que no interactúan con la cisteína, ahora reaccionan con el 2-mercaptoetanol presente en la solución, por medio de la ruptura de los puentes disulfuro (S-S), la estructura terciaria así como la estructura cuaternaria de algunas proteínas presentes en la sangre (como la cisteína o cistina). Si una proteína consta de varias cadenas polipeptídicas distintas o iguales unidas mediante puentes disulfuro (S-S), como es el caso de la cistina, la acción del 2-mercaptoetanol separa las cadenas polipeptídicas en un proceso de desnaturalización de las proteínas, convirtiéndolas en moléculas de cisteína que pueden seguir interactuando con el selenio presente en la sangre hasta agotarse las reservas del mismo, y finalmente se extrae como la especie de selenocisteína o selenoDLcisteína para su análisis cuantitativo (Rodriguez *et al.*, 2009; Knight, Wiley & Sons, 2004).

3.9.5. Análisis de muestras reales

El método se aplicó a muestras de sangre completa (n= 5) y plasma (n= 5) de de pacientes con leucemia (PL) y de igual número de muestras de sangre y plasma a personas voluntarias consideradas como la población control (PC). En todos los casos o matrices analizadas, solo se evidenció la presencia de una especie con un tiempo de retención ($1,44 \pm 0,02$ min), que según los datos obtenidos para los selenocompuestos corresponde a la especie selenoDLcisteína. En la (**Figura 5, a y b**) se presentan los cromatogramas correspondientes a una muestra de sangre completa y de plasma de pacientes con leucemia respectivamente.

La presencia de selenoDLcisteína está influenciada por la ingesta o el consumo de alimentos ricos en selenio como el pescado, granos, mariscos, entre otros. Esta especie es muy importante para el humano, ya que este aminoácido forma parte de algunas proteínas esenciales como la glutatión peroxidasa. Además, la identificación y cuantificación de la SelenoDLcisteína proporciona información sobre la concentración de esta especie en el organismo, que se puede utilizar como herramienta útil en la prevención y diagnóstico de enfermedades (Johannson *et al.*, 2005).

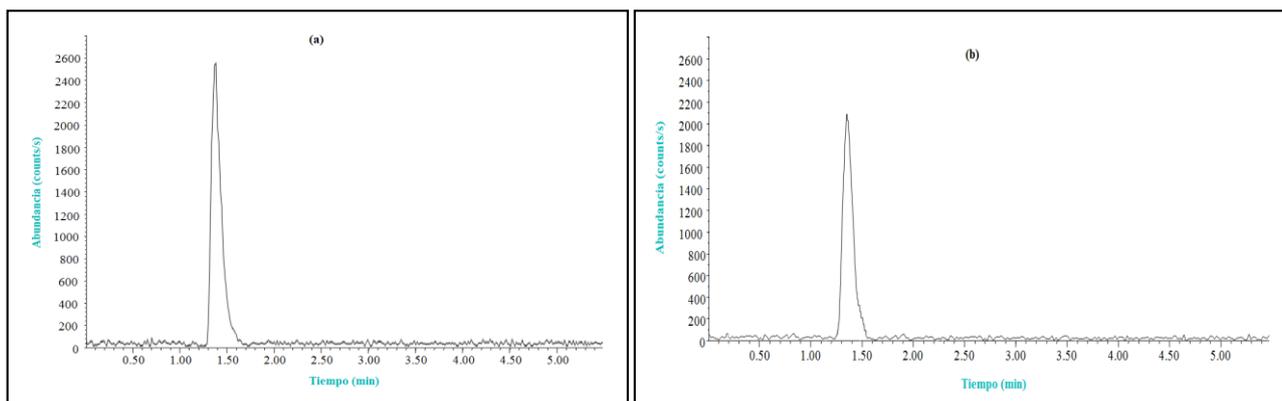


Figura 5. Cromatogramas de muestras de sangre completa (a) y plasma (b) de pacientes con leucemia para la especie SelenoDLcisteína, obtenidos por HPLC-ICP-MS. Columna C₁₈. Fase móvil: 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% metanol, 0,06M acetato de amonio y 2mM EDTA a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹.

3.9.6. Relación entre las concentraciones de selenio total y las concentraciones de la especie selenodlcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y población control obtenidas mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

En la **tabla 16** se expresan las concentraciones individuales de selenio total y las encontradas para la especie selenoDLcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y los individuos control.

Tabla 16. Concentraciones individuales de selenio total y concentraciones de selenoDLcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y población control.

Población	Muestra	Concentración de Se total (µg.L ⁻¹)	Concentración de SeDLcys (µg.L ⁻¹)
PL	Sangre	320,3	242,6
		286,5	175,4
		210,1	106,7
		264,6	207,3
		217,8	124,3
PL	Plasma	171,6	123,1
		168,4	112,7
		116,7	103,6
		124,4	97,6
		102,1	96,8
PC	Sangre	222,1	123,1
		242,4	140,9
		134,7	127,0
		199,5	130,5
		191,5	97,4
PC	Plasma	155,2	91,8
		202,2	91,9
		125,1	80,1
		173,5	84,7
		139,6	76,2

Se observa que las concentraciones de selenio total tanto para los pacientes con leucemia como para los individuos controles resultaron ser mayores a las concentraciones de la especie selenoDLcisteína tanto en sangre como en plasma. Estos resultados tienen lógica si consideramos que en sangre completa y el plasma la especie selenoDLcisteína no es la única especie presente sino que existen otras especies que cumplen papeles esenciales y enzimáticos en el organismos, sin embargo, la especie selenoDLcisteína es una de las especies de selenio con mayor biodisponibilidad en el organismo proporcionada por la ingesta de alimentos con alto grado de proteínas como lo son los alimentos de origen animal (e.g., pollo, reses, huevos) (Casals *et al.*, 2005).

3.9.7. Concentraciones de la especie selenoDLcisteína en muestras de sangre y plasma de pacientes con leucemia y población control obtenidas mediante HPLC-ICP-MS.

En la **tabla 17** se muestran las concentraciones de la especie selenoDLcisteína (media \pm 1DE) de pacientes con leucemia para sangre completa (PL, $n = 5$) y plasma (PL, $n = 5$) y de 5 individuos sanos que conformaron la población control (PC, $n = 5$). Para las concentraciones de de la especie selenoDLcisteína en sangre completa de pacientes con leucemia y la población control, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones de esta especie. La media en sangre completa de (PL) resultó superior a la media en sangre de la (PC). Por lado se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de selenoDLcisteína para plasma de (PL) y (PC). En general, se encontraron concentraciones de selenoDLcisteína mayores en sangre completa y plasma de los pacientes con leucemia que en la población control.

Es importante resaltar que la concentración de la especie selenoDLcisteína tanto en plasma de pacientes como en la población control son diferentes, esto justifica el hecho de que los pacientes en estudio se encuentran bajo una dieta específica o tratamiento con selenio para tratar la enfermedad de la leucemia, por otra parte la presencia de esta especie en plasma de los pacientes resulta favorable en el tratamiento de la patología, ya que la especie selenoDLcisteína cumple importantes papeles enzimáticos y antioxidantes junto a la selenoproteína glutatión peroxidasa (GPx) para reducir los peróxidos, protegiendo así las membranas y otras estructuras celulares de la acción de los mismos y evitar así la oxidación de las células que puedan conllevar a la aparición de este tipo de cáncer, ya que se ha comprobado que a una concentración mayor de selenio (ca. $40 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$) en sangre y plasma aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa en el plasma, aumentando la eficacia de

esta selenoproteína para combatir este tipo de cáncer en la sangre. Además, el selenio contribuye a la respuesta inmune, garantiza una función correcta del sistema endocrinológico e inmunológico (Casals *et al.*, 2005; Hernández, 2007).

Tabla 17. Concentraciones de la especie selenoDLcisteína encontradas en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia, (PL) y población control (PC).

Población	Muestra	Concentración de selenoDLcisteína (µg/L)		P valor
		X ± DE	Intervalo	
PL	SC	171,25 ± 56,5	106,7 – 242,5	< 0,05
	P	106,74 ± 11,1	96,8 – 123,1	< 0,05
PC	SC	123,77 ± 16,2	97,4 – 140,9	< 0,05
	P	84,96 ± 6,9	76,2 – 91,9	< 0,05

n=5, SC= Sangre completa, P= Plasma.

Como se ha dicho, las formas de selenio más biodisponibles en la dieta son los selenoaminoácidos: la selenometionina y la selenocisteína. La selenometionina procede de fuentes vegetales y animales, mientras que la selenocisteína proviene principalmente de fuentes animales. Las formas inorgánicas (selenatos y selenitos) los cuales no se determinaron en este trabajo, contribuyen poco al aporte diario de este elemento en condiciones normales y sólo adquieren importancia cuando son utilizadas como suplementos en dietas experimentales o en determinadas situaciones como en los pacientes sometidos a nutrición parenteral durante un periodo largo de tiempo (Casals *et al.*, 2005).

Aunque la selenometionina no puede ser sintetizada en el organismo, es posible obtenerla de la dieta. Sin embargo, es considerada como un reservorio poco regulado de selenio. El organismo hace uso de este almacén cuando se interrumpe la ingesta de selenio. Aunque se han sugerido otras funciones de este complejo, actualmente no se conoce que la selenometionina tenga una función fisiológica importante en el organismo. Por otra parte, el selenio se absorbe bien por el tracto gastrointestinal, se sabe que más del 90% de la selenometionina, forma principal de la dieta, se absorbe por el mismo mecanismo. La selenometionina puede almacenarse en un almacén proteico (se incorpora en las proteínas aleatoriamente en lugar de metionina) es por ello que en el presente estudio no se obtuvo indicios de que esta especie esté presente en sangre o plasma de las poblaciones bajo estudio (Casals *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2005).

En contraste, la selenocisteína constituye la forma biológicamente más activa y está estrechamente regulada. Es la forma en la que se encuentra el selenio formando parte de las selenoproteínas y, al contrario que la selenometionina, no hay evidencia que la selenocisteína sustituya a la cisteína. De hecho, el 80% del selenio se incorpora a las selenoproteínas en forma de selenocisteína. Sin embargo, se conoce poco sobre el

mecanismo de absorción de la selenocisteína. Tras la absorción, el selenio circula en el plasma unido principalmente a la selenoproteína P (contiene una tercera parte del selenio plasmático) y la selenoproteína W (contiene una sexta parte del selenio plasmático), hallándose el resto unido principalmente a la albúmina de forma no específica, como otros muchos micronutrientes. La biodisponibilidad de selenio depende de la absorción intestinal y de su conversión en una forma biológicamente activa. Las evaluaciones de la biodisponibilidad de selenio se basan en que, tras la absorción, la conversión a formas biológicamente activas difiere en las distintas formas químicas de selenio. Las diferentes formas de selenio siguen rutas metabólicas distintas (Casals *et al.*, 2005).

La selenometionina puede almacenarse en un almacén proteico. El catabolismo de este almacén liberará selenio en forma de selenuro. La selenocisteína no se almacena, sino que es catabolizada directamente a partir de la cisteína y el selenio resultante forma otra reserva de selenio. Las formas inorgánicas (selenito y selenato) se almacenan directamente en forma de selenuro, el cual, independientemente de su origen, se utiliza para la formación de selenofosfato, precursor de la selenocisteína, que formará parte de las selenoproteínas. El exceso de selenio es excretado. Si las células precisaran de los depósitos de selenometionina, ésta sería liberada por proteólisis, aunque, según algunos autores, la cantidad de selenio disponible en el organismo desde el almacén de selenometionina está en función del metabolismo de la metionina independientemente de la necesidad de selenio del organismo (Casals *et al.*, 2005; Rayman, 2009).

4. CONCLUSIONES

La metodología empleada basada en la técnica de ICP-MS, para la determinación de las concentraciones totales de Se en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia presentaron valores adecuados de precisión, exactitud y detectabilidad, constituyéndose una herramienta analítica poderosa para la interpretación clínica de los valores de Se exhibidos por la población experimental estudiada.

La concentración de selenio total en sangre completa o plasma proporciona la indicación más completa de ingesta alta o baja de selenio.

Las concentraciones de selenio en plasma o suero varían según la localización geográfica de la población.

Los estudios de recuperación demostraron una alta eficiencia en la extracción de la especie SelenoDLcisteína con un porcentaje de recuperación dentro del intervalo permisible analíticamente.

Los métodos desarrollados basados en la cromatografía líquida de alta resolución acoplado en línea con la espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS) para la determinación cualitativa y cuantitativamente en la especiación química de selenio (i.e., selenoDLcisteína y selenoDLmetionina) en matrices acuosas sencillas y muestras reales fueron precisos y exactos, libres de interferencias y permitieron la determinación rápida de las especies estudiadas.

5. REFERENCIAS

- Amy, L., Rosen, G. & Hieftje, M. (2005). "Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation". *Spectrochimica, Acta Part B*, 59, 135–146.
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección", *Atenea*, 494, 161–172.
- Avissar, N., Whitin, J., Allen, P., Palmer, I. & Cohen, H. (1989). "Antihuman plasma glutathione peroxidase antibodies: Immunologic investigations to determinane plasma glutathione peroxidase protein and selenium content in plasma". *Blood*, 73, 1, 318–323.
- Cabañero, A., Madrid, Y. & Cámara, C. (2005). "Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: A new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis". *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 38, 373–379.
- Cáceres, A. (2002). "The Development of Methods for determination selenium using spectrofluorimetric and ICP-MS techniques". PhD Thesis, Sheffield Hallam University, Sheffield, UK, 200.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín, A., Pérez, C. & Vidal, M. (2004). "Toma y Tratamiento de Muestras". Editorial Síntesis. S. A., Madrid, España, 49, 273 – 283.
- Casals, G., Torra, M., Deulofeu, R. & Ballesta, A. (2005). "Importancia del selenio en la práctica clínica". *Química Clínica*, 24, 3, 141–148.
- Colina, M. (2001). "Determination of nutrients and heavy metal species in samples from Lake Maracaibo, Venezuela". PhD Thesis, Sheffield Hallam University, Sheffield, UK, 167–164.
- Gómez, J., Pozas, J., Giráldez, I. & Morales, E. (1999). "Use of solid phase extraction for speciation of selenium compounds in aqueous environmental samples". *Analyst*, 124, 75–78.
- Granadillo, V. (2009). "Desarrollo metodológico para la especiación de metales en muestras de sangre de pacientes con Leucemia o Linfoma", Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumentación Analítica y Química Ambiental, Maracaibo, Venezuela. Tesis Doctoral. pp 149–181.
- Hernández, H. & Ríos, M. (2009). "Rol biológico del selenio en el humano". *Química Viva*, 2, 64–80.
- Hernández, M. (2010). "Desarrollos de nuevos métodos analíticos basados en el acople de las técnicas de análisis de inyección en flujo, espectrometría atómica y cromatografía para determinar algunas

especies de selenio en muestras de sangre, cabello y suplementos vitamínicos”, Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, División de Estudios de Graduados, Maracaibo, Venezuela, Tesis de Doctorado en Química. pp 85–101.

- Hurtado, R. & Gardea, J. (2007). “Evaluación de la exposición de selenio en Los Altos de Jalisco, México”, *Salud Pública de México*, 49, 312–315.
- Johannson, L., Gafvelin, G. & Arnér, E. (2005). “Selenocysteine in proteins properties and biotechnological use”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1726, 1–13.
- Kelly, L., Paramee, K., Patrick, H., Zoltán, M. (2018). Review. Selenium analysis in waters. Part 2: Speciation methods. *Science of The Total Environment*, 640-641, 1635-1651.
- Knight, J., Wiley & Sons. (2004). "2-Mercaptoethanol", *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Ed. L. Paquette, New York. pp 1002.
- Micke, O., Schomburg, L., Buentzel, J. & Kisters, K. (2009). “Selenium in oncology: From chemistry to clinics”. *Molecules*, 14, 3975–3988.
- Miller, N. & Miller, J. (2002). “Estadísticas y Estequiometría Para Química Analítica”, 4a Edición, Editorial Prentice Hall, 125-127.
- Navarro, M. & Cabrera, C. (2008). “Selenium in food and the human body: A review”. *Science of the total environment*, 400, 115–141.
- Peacheya, E., Cook, K., Castles, A., Hopleya, C. & Goenaga-Infantea, H. (2009). “Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium”. *Journal of Chromatography A.*, 1216, 7001–7006.
- Quattrocchi, O. Abelaira, As. & Laba, R. (1992). “Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica Artes Gráficas Farro”. Argentina. pp 66–79.
- Rangel, P. (2005). “Dieta y cáncer”. *Radiología*, 5, 114–119.
- Rayman, M. (2009). “Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 45–50.
- Rodriguez, J., De Souza, S., De Oliveira, V. & 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.
- Sierra, I., Pérez, D., Gómez, S. & Morante, S. (2009). “Análisis Instrumental: Algunas Herramientas de Enseñanza-Aprendizaje Adaptadas al Espacio Europeo de Educación Superior”. Editorial Netbiblo, La Coruña, España, 9.
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T. (2001). “Principios de Análisis Instrumental”. 5ta edición, Madrid, España, McGraw-Hill, pp 736, 785–795.
- Silencio, J. (2009). “Investigación clínica con respecto a nutrición y cáncer”. *Revista Mexicana de Pediatría*, 76, 4, 181–186.
- Schaller, K. & Schiele, R. (2006). “Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial Chemicals”. ECSC-EEC-EAEC, Bruselas-Luxemburgo. 49–76 pp.
- Vadgama, J., Wu, Y., Shen, D., Hsia, S. & Block J. (2000). “ Effect of selenium in combination with adriamycin or taxol on several different cancer cells”. *Anticancer Research*, 20, 1391–1414.
- Umesh, B., Abdul, B., Tukaram, N., Mansing, A., Ganesh, S., Vashishtha, M., Shashikant, H. (2017). Acid switched efficient, cost effective, selective separation and determination of selenium(IV). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5 (5), 4828-4840.
- Werner, J. (1992). “Selenio, un elemento esencial y tóxico. Datos de Latinoamérica”. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 42, (2), 90–93.

ASISTENCIA DE SOFTWARES MATEMÁTICOS EN CÁLCULO DIFERENCIAL EN ESTUDIANTES DE INGENIERÍA

MSc. Ulbio Colón Durán Pico^{1*}, Dra. Leonor Alexandra Rodríguez Alava²

¹Instituto de Ciencias Básicas - Universidad Técnica de Manabí

²Facultad de Ciencias Humanísticas y Sociales -Universidad Técnica de Manabí

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

Recibido: 10-12-2017 / Aceptado: 15-4-2018

RESUMEN

El análisis, comprensión y corroboración de resultados en matemáticas ha sido de mucha dificultad para los alumnos de todos los niveles educativos. Para disminuir esta problemática, actualmente se cuenta con herramientas tecnológicas que permiten mejorar los niveles de abstracción de esta ciencia. La presente investigación tiene como objetivo valorar la percepción que tienen los estudiantes de las carreras de ingeniería, sobre la utilidad de los softwares MatLab, GeoGebra y Maple en el estudio de Cálculo Diferencial. Otra técnica a mencionar en este estudio es, la metodología cuali - cuantitativa, mediante la técnica de estudio de caso. Los participantes estuvieron representados por: el profesor investigador, 30 estudiantes de primer nivel de Ingeniería de la Universidad Técnica de Manabí. La recolección de datos se llevó a cabo mediante la observación participante del profesor en el análisis de casos y el desarrollo de ejercicios y contenidos de la asignatura Análisis Matemático I, y una encuesta estructurada con una escala valorativa basada en cinco indicadores. Se destacan como principales resultados que la diferencia entre los programas Matemáticos utilizados radica por el tipo y la facilidad de acceso, así como por su nivel de confiabilidad y facilidad de utilización. Lo encontrado lleva a concluir (en el contexto estudiado) que estas herramientas promueven la comprensión concreta de las Matemáticas y el desarrollo de competencias tecnológicas aplicadas a la Ingeniería.

Palabras clave: Programas Matemáticos, cálculo diferencial, asistencia tecnológica, comprensión Matemática.

ASSISTANCE OF MATHEMATICAL SOFTWARE IN THE STUDY OF DIFFERENTIAL CALCULATION IN ENGINEERING STUDENTS

ABSTRACT

The analysis, understanding and corroboration of results in mathematics have been very difficult for students of all educational levels. In order to lessen this problem, there are currently technological tools that allow improving the levels of abstraction of this science. The objective of this research is to assess the perception that students have of engineering careers, about the usefulness of MatLab, GeoGebra and Maple software's in the Differential Calculus study. Another technique to be mentioned in this study is the Qualitative-Quantitative Methodology, through the study case technique. The participants were represented by: the



research professor, 30 first level engineering students from the Technical University of Manabí. The data collection was carried out through the participant observation of the professor in the analysis of cases, and the development of exercises and contents from the subject Mathematical Analysis I, as well as, and a structured survey with a rating scale based on five indicators. The main results stand out that the difference between the mathematical programs used is based on the type and the easy access, as well as their level of reliability and easy use. The findings lead to conclude (in the context studied) that these tools promote the concrete understanding of Mathematics and the development of technological competences applied to Engineering.

Keywords: Mathematical programs, differential calculus, technological assistance, Mathematical understanding.

ASSISTÊNCIA DE SOFTWARES MATEMÁTICOS NO CÁLCULO DIFERENCIAL EM ESTUDANTES DE ENGENHARIA

RESUMO

A análise, compreensão e colaboração dose resultados em matemáticas apresentam dificuldades para os estudantes de todos os níveis educativos. Para diminuir este problema, atualmente se conta com ferramentas tecnológicas que permitem melhorar os níveis de abstração desta ciência. A presente investigação tem como objetivo avaliar a percepção que tem os estudantes das carreiras de engenharia, sobre a utilidade dos softwares MatLab, GeoGebra e Maple no estudo do Cálculo Diferencial. A metodologia qualitativa - quantitativa, como uma técnica de estudo de caso. Os participantes foram: o professor investigador, 30 estudantes de engenharia de primeiro nível da Universidad Técnica de Manabí. A toma de datos foi realizada com a observação participativa do professor durante as análises dos casos e o desenvolvimento de exercícios e conteúdos das matérias. Análise Matemático I, uma enquete estruturada com uma escala de avaliação baseada em cinco indicadores foi realizada. Se destacam como principais resultados que a diferença entre os programas matemáticos utilizados radica pelo tipo e a facilidade de acesso, assim como o seu nível de confiabilidade e facilidade de utilização. Os resultados levam a concluir (no contexto estudado) que essas ferramentas promovem a compreensão concreta das matemáticas e o desenvolvimento das competências tecnológicas aplicadas á engenharia.

Palavras-chave: Programas matemáticos, cálculo diferencial, assistência tecnológica, compreensão matemática.

1. INTRODUCCIÓN

Para un estudiante de ingeniería, la matemática constituye un recurso básico para el diseño y desarrollo de soluciones que los aplicará en situaciones propias de la profesión; esta proporciona medios de cálculo, desarrolla el pensamiento sistémico, lógico, sistemático y heurístico; por lo que el docente debe propiciar un aprendizaje significativo, está obligado a convertirse en un facilitador y diseñador de situaciones de aprendizaje, a buscar herramientas que permitan la utilización de tecnologías para crear y proporcionar un ambiente de trabajo dinámico e interactivo, cambiar las metodologías de trabajo para la enseñanza y el aprendizaje, desarrollar habilidades del pensamiento propias del área de matemática y mejorar el aprendizaje (Cuicas, Debel, Casadei, & Alvarez, 2007).

En el área de las matemáticas y de manera concreta en el Cálculo Diferencial, la incorporación de las TIC como recurso didáctico en el aula, permite demostrar que muchos

procedimientos mecánicos que el alumno desarrollaba en papel pueden ser llevados a cabo de manera automatizada, a través de diversos tipos de dispositivos, de tal forma que pueda enfocarse en los algoritmos procedimentales, así como en el análisis, control y evaluación de los resultados obtenidos, que en operaciones y procesos matemáticos elementales.

Debe destacarse que existe una gran variedad de software que ofrecen no solo la posibilidad de desarrollar problemas matemáticos, sino también útiles como recursos del docente para la comprobación y evaluación de procedimientos y demostraciones en clases; para efectos de esta investigación se consideran los utilizados en el Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Técnica de Manabí - Ecuador: Matlab, Geogebra y Maple; por ejemplo, a través de varios experimentos en GeoGebra, se demuestra que brinda posibilidades a los estudiantes en el desarrollo de la intuición a través de la visualización de los procesos matemáticos, permitiéndoles explorar una variedad de tipos de funciones mediante conexiones entre las representaciones simbólicas y visuales (Zakaria & Lo, 2012).

Si bien Matlab, Geogebra y Maple obtienen rápidamente la resolución de problemas matemáticos, esto no significa que el estudiante deba excluir el conocimiento del algoritmo procedimental llevado a cabo para realizar el cálculo. Este aspecto tiene una mayor importancia cuando la aplicación de las derivadas en problemas de optimización recoge la modelización de un fenómeno donde las variables tienen un significado científico determinado y el comportamiento de la función en los puntos críticos y de inflexión.

La aplicación de estos softwares permite obtener salidas de cálculos complejos de manera rápida y exacta. La finalidad de este trabajo consiste en valorar la percepción que tienen los estudiantes de niveles iniciales de las carreras de ingeniería, sobre la facilidad de acceso, confiabilidad, comprensión, apoyo en el procedimiento y preferencia de los software: MatLab, GeoGebra y Maple en el estudio de Cálculo Diferencial, el análisis de las posibilidades que ofrece la derivada como herramienta para el estudio del comportamiento de funciones y sistemas dinámicos en el campo de la ingeniería, constatando las ventajas e inconvenientes que ello supone, producto de las experiencias obtenidas con su aplicación.

2. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de la investigación cuanti-cualitativa, se procedió a escoger como método de indagación el estudio de caso para describir y analizar a profundidad la situación a la que se enfrentan los estudiantes. Para dar respuesta a la pregunta de investigación se seleccionó como población al grupo de 30 estudiantes del primer nivel de las carreras de ingeniería del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Técnica de Manabí. La

innovación educativa consistió en la utilización de los tres softwares: Maple, MatLab y GeoGebra en el desarrollo de los mismos ejercicios de Cálculo Diferencial. Para reforzar el desarrollo de competencias, el docente investigador apoyó permanentemente el uso de los mismos. Para lograr el objetivo se consideraron cinco indicadores: a) acceso al software, b) apoyo en el procedimiento del ejercicio, c) confiabilidad en los resultados, d) comprensión y e) preferencia en la utilización.

Para la presente investigación se utilizó como técnica para recolección de datos la encuesta, la cual buscó indagar en los estudiantes la manera como se desarrollaron los ejercicios de cálculo diferencial con el uso de cada uno de los softwares, la bitácora para el registro de observación y de actividades académicas del docente y el análisis de documentos significativos como trabajos realizados por el estudiantado en clase, tareas y resolución de talleres individuales y grupales que sirvieron de soporte para evidenciar los efectos de las herramientas en el aprendizaje y el desarrollo de la competencia matemática.

2.1. Desarrollo

2.1.1. Los softwares educativos

Un factor importante a considerar en la formación de los estudiantes es el aprendizaje, aspecto que en los actuales momentos se considera en relación a la utilización de la tecnología aplicada a la educación.

Los educadores han encontrado un mundo de posibilidades para el desarrollo de su práctica docente a través de la integración de las nuevas tecnologías como un recurso más en el proceso educativo, que les ha permitido promover y facilitar la actitud participativa y creadora de los alumnos, la enseñanza individualizada, el aprendizaje interactivo, la inserción de nuevas metodologías apoyadas por computadora, lo que ocasiona una verdadera transformación en el proceso al ceder el papel protagónico al alumno (Laz & Laz, 2015). De aquí la importancia de una formación permanente del docente, con actitud de apertura y de aprendizaje. El docente de hoy debe educar de manera diferente a la que aprendió en su época, que entienda y trabaje con y para las nuevas generaciones con la finalidad de incrementar la calidad de la educación.

Las expresiones software educativo, programas educativos y programas didácticos como sinónimos para designar genéricamente los programas para ordenador creados con la finalidad específica de ser utilizados como medio didáctico, es decir, para facilitar los procesos de enseñanza–aprendizaje; pueden realizar las siguientes funciones: informativa,

instructiva, motivadora, evaluadora, investigadora, expresiva, metalingüística, lúdica e innovadora (Marqués, s/f).

Los catálogos de software educativo suelen agrupar los programas bajo áreas curriculares: matemática, idiomas, ciencias sociales, ciencias naturales, música, etc. adicionales se encuentran los juegos de ordenador, de las enciclopedias, los multimedios sobre cine, arte, música programas de simulación, programas de realidad virtual, entre otros; por eso cada vez se hace más amplio el propio concepto (Gros, s/f).

(Squires & Mcdougall, 2001) proponen un nuevo paradigma para reflexionar sobre el software educativo que lleva un enfoque de la selección de los mismos íntimamente relacionado con su empleo, haciendo hincapié en consideraciones educativas como las interacciones en el aula, las teorías de los procesos de aprendizaje y las cuestiones curriculares; de la misma manera, se debe aprovechar la rapidez y exactitud de los cálculos del software, tanto para ahorrar tiempo en verificar los resultados, como para programar secuencias que permitan observar el proceso de construcción de un concepto (Cuicas, Debel, Casadei, & Alvarez, 2007).

2.1.2. Matlab, Geogebra y Maple: recursos para el aprendizaje de cálculo diferencial.

Las ciencias exactas y las de computación se asocian por la utilización de procedimientos y algoritmos que permiten su aplicación en las diversas áreas científicas y de gestión del mundo contemporáneo, para la creación de soluciones óptimas que cumplan con requerimientos específicos de un problema, de manera concreta en ingeniería, generando la implementación de software orientados a la automatización de procesos matemáticos, así como en campos específicos como el cálculo diferencial, área fundamental en las carreras de Ingeniería y Economía, por lo que la incursión de las TIC en los procesos educativos requiere metodologías que permitan relacionar adecuadamente los aspectos pedagógico y didáctico con el tecnológico (Pazos, Tenorio, & Ramírez, 2015).

Por lo anteriormente descrito, un docente de matemática debe incorporar en su gestión de aula el uso de herramientas didácticas – científicas, entre ellos los softwares matemáticos: MatLab, GeoGebra, Maple, entre otros. Toro (2007) manifiesta que, los docentes de esta área deben adquirir sólidos y extensos conocimientos acerca de las nuevas tecnologías de información-integración de las diferentes morfologías de la información: imagen, sonido, texto, computación gráfica, simbólica y numérica; debemos ser expertos en enseñar la lectura de la imagen y no sólo de textos.

Adicional a la selección correcta del recurso, es necesario relacionarlo con los contenidos asumidos en el programa curricular de la asignatura; a efectos del presente estudio, de Análisis Matemático I, donde se destacan: Análisis de funciones, que comprende el estudio del comportamiento (dominio, rango y gráfica) de las funciones reales de una sola variable. Aproximación a la idea de límites en el estudio del comportamiento de los valores de una función. Cálculo diferencial: pendiente de una recta tangente, la razón de cambio y crecimiento o decrecimiento, y Aplicaciones de las derivadas en las variaciones de cambio, extremos locales y problemas de optimización. De tal manera que el software contribuya significativamente en el proceso educativo.

2.1.2.1. Software MATLAB

MATLAB, acrónimo de la expresión MATrix LABoratory, considerado un lenguaje técnico de computación (**Figura 1**), programa interactivo que cuenta con instrucciones, comandos, funciones, algoritmos (scripts), objetos básicos con los cuales opera, denominados matrices.

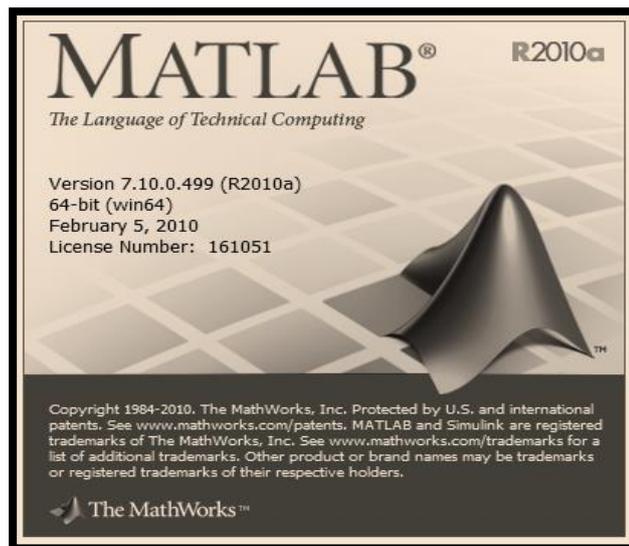


Figura 1. Cuadro de diálogo de información inicial de MATLAB. Fuente: software MatLab.

Entre las principales características, destaca el cálculo numérico con precisión, exactitud y rapidez; permite el uso de lenguaje simbólico matemático, diseño y visualización de gráficas avanzada, maneja un lenguaje de alto nivel que aplica programación estructurada y orientada a objetos, posee un soporte básico para diseño de interfaz gráfica (gráficos de funciones) y una considerable cantidad de librería de funciones para automatizar procedimientos y algoritmos aplicados desde el pre cálculo: análisis de funciones reales de una variable de cualquier tipo, evaluación de límites hasta el cálculo de derivadas explícitas

e implícitas (**Figura 2**) así como de orden superior, además del cálculo de integrales no definidas y definidas.

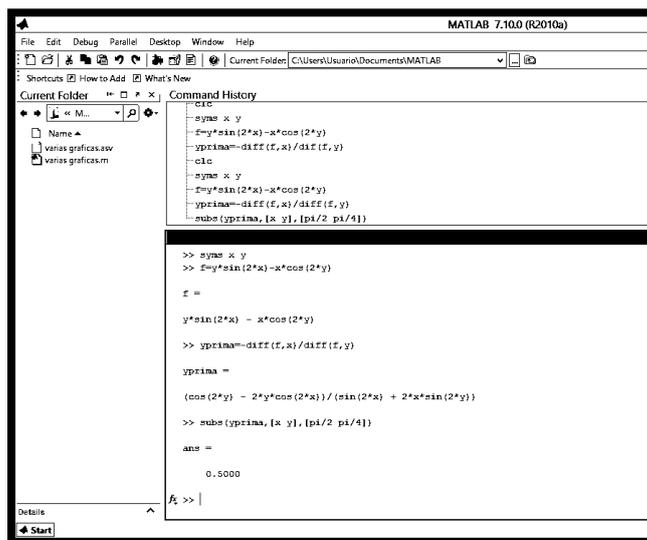


Figura 2. Ventana de ventana de MatLab.

2.1.2.2. Software GEOGEBRA

Geogebra, acrónimo de Geometría y Álgebra, ofrece la vista gráfica (geométrica) y algebraica de cada objeto matemático que se introduzca; es decir, se establece un vínculo bidireccional constante, (**Figura 3**). Además, cuenta con otras formas de representación: vista de hoja de cálculo y la vista CAS en donde se puede introducir.

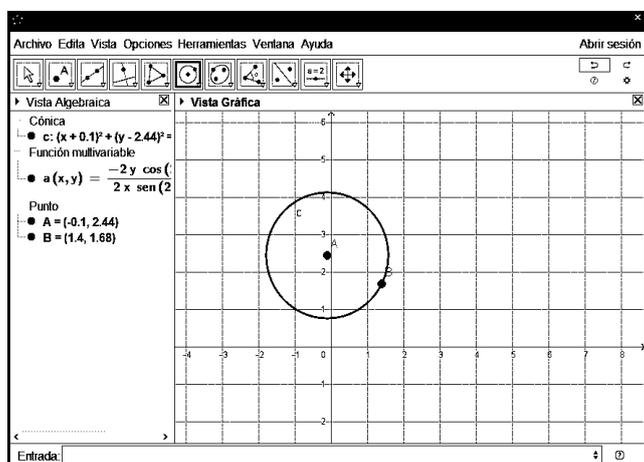


Figura 3. Ventana principal de trabajo de GeoGebra. Fuente: software GeoGebra

Una característica sobresaliente de este programa matemático, está dada en lo expuesto por (Hohenwarter & Hohenwarter, 2009) esta multiplicidad permite apreciar los objetos matemáticos en tres representaciones diferentes: gráfica (como en el caso de puntos, gráficos de funciones), algebraica (como coordenadas de puntos, ecuaciones), y en celdas de una hoja de cálculo. Cada representación del mismo objeto se vincula dinámicamente a

las demás en una adaptación automática y recíproca que asimila los cambios producidos en cualquiera de ellas, más allá de cuál fuera la que lo creara originalmente.

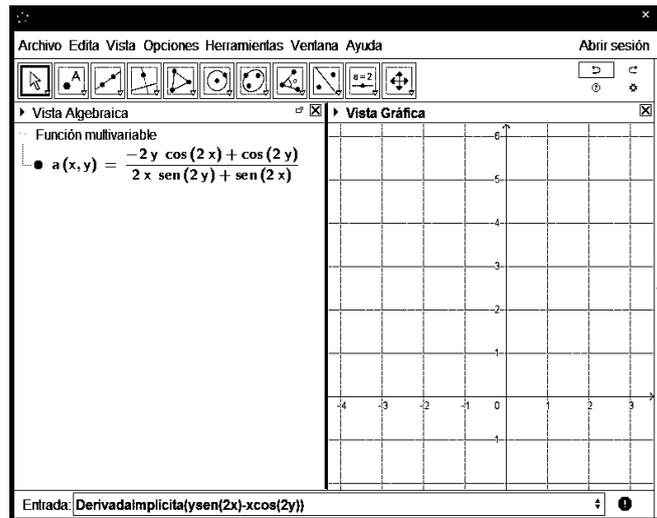


Figura 4. Ventana algebraica de GeoGebra Fuente: software GeoGebra.

Geogebra contiene múltiples herramientas pedagógicas que permite al docente y estudiante realizar demostraciones aplicando construcciones de geometría dinámica, cuyos objetos se reconfiguran al realizar algún evento o modificación de manera manual o automática además de la automatización de procedimientos en álgebra y cálculo diferencial e integral (**Figura 4**).

2.1.2.3. Software MAPLE

Maple es un acrónimo en inglés de *M*athematical *P*LEasure, considerado como un lenguaje de cálculo simbólico potente. Su principal característica radica en la capacidad de realizar cálculos simbólicos; es decir, operaciones similares a las que se llevan a cabo, por ejemplo cuando, intentando realizar una demostración matemática se despeja una variable de una expresión, se sustituye en otra expresión matemática, se agrupan términos, se simplifica, se deriva y/o se integra, etc. (Cujó, 2003).

Maple está constituido por un conjunto de opciones y barras de herramientas que permiten implementar acciones en una interfaz amigable y de fácil manejo, para ello utiliza librerías, funciones e instrucciones de la programación simbólica obteniendo soluciones analíticas efectivas en problemas matemáticos al calcular límites, derivadas (**Figura 5**) e integrales de funciones reales de una variable, e inclusive en la solución de ecuaciones.

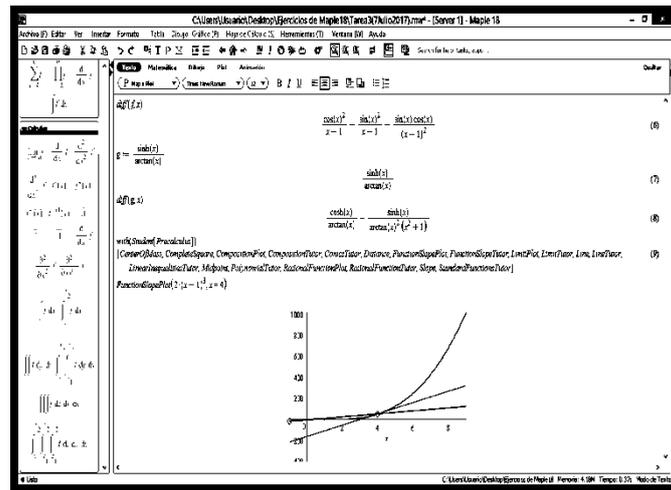


Figura 5. Ventana principal de trabajo de Maple. Fuente: software Maple.

También se lo considera como un paquete de Álgebra Computacional que permite usar sofisticados métodos matemáticos (simbólicos, numéricos, gráficos, etc.) para resolver problemas triviales y no triviales, los procedimientos de cálculo simbólico o científico” (Cujó, 2003), es decir, que permite al usuario desarrollar expresiones matemáticas que utilizan funciones, variables y operadores sencillos pero de precisión y exactitud en la obtención de resultados.

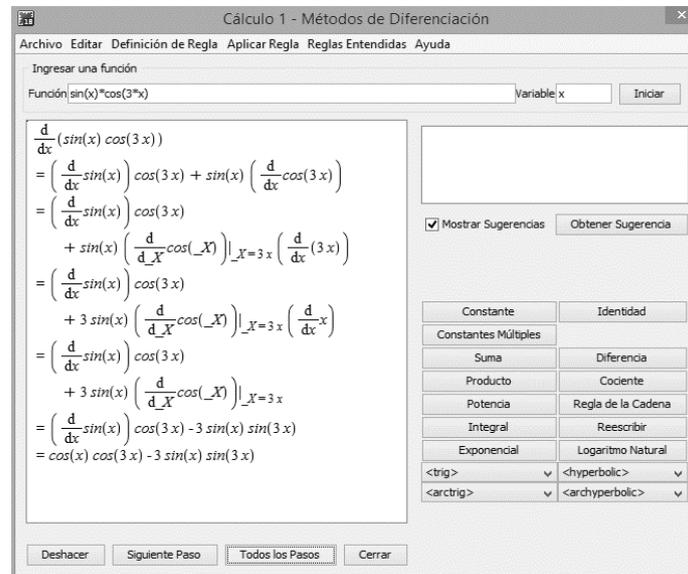


Figura 6. Ventana Tutor de Maple. Fuente: software Maple.

Cuenta con herramientas llamadas tutores que dan soporte al usuario en el procedimiento algebraico al calcular un límite, una derivada o una integral, siendo esta una característica sobresaliente para comparar algoritmos y resultados en la solución de ejercicios concretos, concordando con lo expuesto por (Addlink Software Científicos, 2014) “Maple incluye tutores paso a paso que permiten a los estudiantes practicar la integración, diferenciación,

encontrar límites y otros” de esta manera la (**Figura 6**), muestra el tutor de diferenciación para calcular una derivada, seleccionando la regla de diferenciación a emplear, visualizar paso a paso con la regla aplicada o todos los pasos a la vez con el resultado obtenido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las encuestas aplicadas a los estudiantes del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Técnica de Manabí son analizadas y agrupadas por los indicadores que se muestran:

3.1. Acceso al software matemático

La **tabla 1** demuestra que el 56 % de los estudiantes prefiere GeoGebra y lo denomina como el software de mayor facilidad de acceso, ya que es un utilitario libre, que se puede descargar desde la página web sin costo alguno y en diferentes dispositivos como laptop y smartphone; en los actuales momentos de fácil acceso para estudiantes y docentes de diferentes condiciones socio económicas.

De acuerdo con lo observado por el docente en relación a este aspecto, los estudiantes, a pesar de la dificultad para obtener acceso al uso de los programas MatLab y Maple, ya que se requiere licencia o el uso de un demo que caduca en un tiempo limitado, pudieron instalarlos en sus dispositivos, lo que generó cambios en el cronograma de actividades programadas; así como cierta desmotivación en los estudiantes al utilizar mecanismos poco apropiados para conseguirlos.

Tabla 1. Acceso al Software matemático.

ALTERNATIVAS DE RESPUESTAS		MATLAB 2010	GEOGEBRA	MAPLE18
		%	%	%
a)	Muy fácil	8	56	12
b)	Fácil	20	20	16
c)	Ni fácil ni difícil	36	16	48
d)	Difícil	24	4	20
e)	Muy difícil	12	4	4
Total		100	100	100

Elaborado por: Investigadores.

Aspecto que concuerda con lo indicado por (Zakaria & Lo, 2012), cuyos resultados de su investigación determinaron que no solo los estudiantes encontraron aspectos motivacionales de aprendizaje a través de GeoGebra, los docentes también tienen percepciones positivas del uso de la herramienta sugiriendo que debe usarse como una alternativa válida en los procesos de enseñanza y aprendizaje de las matemáticas.

Estos resultados, basados en la experiencia de los estudiantes; después de haber utilizado las tres herramientas, afirman que GeoGebra no sólo es una herramienta de fácil acceso sino amigable por su interfaz, por su capacidad de almacenamiento y exactitud de resultados.

3.2. Apoyo del software en el procedimiento de ejercicios

La **tabla 2** evidencia que en relación al apoyo que brinda el software al estudiante con el procedimiento algebraico del ejercicio, el de mayor aceptación corresponde a Maple con la calificación de excelente (32%) a muy bueno (44%); mientras que MatLab, va de muy bueno (20%) a bueno (36%), y GeoGebra va de bueno (40%) a regular (44%), confirmando que visualizar los procesos, permitir la posibilidad de comparar, deducir, verificar, rectificar, se constituye en un elemento importante de apoyo y motivación para el aprendizaje; así Maple, para fines didácticos, permite observar los pasos de derivación, lo que se logra cargando el paquete *Student [Calculus1]* seguido de la orden *DiffTutor*, acción que permite ver, en una ventana secundaria, los pasos de derivación de uno a la vez, o todos juntos hasta obtener el resultado final. También se puede indicar qué forma de derivación utilizar, de no hacerlo el programa derivará por defecto. (A.Co & Panella, 2014)

Este aspecto concuerda con la apreciación del docente observador, cuando al indicar una tarea, estos lo podían desarrollar con mayor eficiencia utilizando Maple, ya que este programa cuenta con el apoyo paso a paso en la resolución de ejercicios matemáticos, como el cálculo de un límite o derivada de una función.

Tabla 2. Apoyo del software matemático en el procedimiento del ejercicio.

ALTERNATIVAS DE RESPUESTAS		MATLAB 2010	GEOGEBRA	MAPLE18
		%	%	%
a)	Excelente	28	00	32
b)	Muy Bueno	20	12	44
c)	Bueno	36	40	20
d)	Regular	16	44	4
e)	Insuficiente	0	4	0
Total		100	100	100

Elaborado por: Investigadores.

3.3. Confiabilidad en los resultados

Según la **tabla 3**, el 56 % de los estudiantes de ingeniería manifiesta que MAPLE 18 es el software de mayor confiabilidad en los resultados de los ejercicios matemáticos. Es necesario recalcar que los encuestados han utilizado los tres software en el desarrollo de los mismos ejercicios que involucran procesamiento de funciones reales de una sola variable, límites y derivadas, aspectos que les ha permitido comparar procesos y resultados en los mismos; ya que Maple 18, cuenta con una interfaz gráfica que apoya introducir expresiones matemáticas (análisis y notificación de errores), mostrar las expresiones, gráficas de funciones, y la ayuda de otros usuarios que están conectados con el sistema. (Shingareva, Lizárraga, & Ochoa, 2014)

Estos resultados ratifican que a pesar que las herramientas analizadas son muy potentes y al alcance de los estudiantes; al momento de discriminar resultados precisos Maple 18 se ubica como el mejor por realizar el procesamiento de la información de manera similar a lo realizado manualmente, cuando se ejecutan cálculos matemáticos analíticos, mientras que los programas matemáticos tradicionales requieren valores numéricos para todas las variables, Maple mantiene y manipula los símbolos y las expresiones que permiten obtener soluciones analíticas exactas de los problemas matemáticos, por ejemplo: se puede calcular límites, derivadas e integrales de funciones, entre otros.

Tabla 3. Confiabilidad en los resultados.

ALTERNATIVAS DE RESPUESTAS		MATLAB 2010	GEOGEBRA	MAPLE18
		%	%	%
a)	Muy confiable	48	52	56
b)	Confiable	44	44	36
c)	Poco confiable	8	4	8
d)	Nada confiable	0	0	0
Total		100	100	100

Elaborado por: Investigadores.

3.4. Comprensión del ejercicio matemático

La **tabla 4** demuestra la comprensión que logran los estudiantes al momento de utilizar una herramienta tecnológica en el desarrollo de un ejercicio de cálculo matemático, como es la derivada, ubicándose con el 56% el software GeoGebra y con el 52 % Maple. Se asume que los factores que intervienen en el desarrollo de la comprensión está dada según

(Cuicas, Debel, Casadei, & Alvarez, 2007) por el empleo de una metodología que incorpora situaciones de aprendizaje creadas de manera intencional, donde se usa el software Maple como herramienta cognitiva; las asignaciones deben contener como objetivo comprometer al alumno en el aprendizaje de procedimientos (habilidades, cognoscitivas y metacognitivas) mientras construyen el conocimiento.

Lo descrito corrobora la importancia de contar con una herramienta de apoyo que lleve al aprendiz a analizar paso a paso e inferir el porqué de los resultados, constatar, comprobar y corregir de ser necesario mediante un proceso permanente de retroalimentación; es decir que le permite contar con un tutor adicional al docente; indicador confirmado en diversas trabajos individuales y grupales realizados tanto asistidos por el docente observador como en trabajos autónomos.

Tabla 4. Comprensión del ejercicio matemático.

ALTERNATIVAS DE RESPUESTAS		MATLAB 2010	GEOGEBRA	MAPLE18
		%	%	%
a)	Excelente	32	56	52
b)	Muy Bueno	36	20	36
c)	Bueno	12	20	4
d)	Regular	20	4	8
e)	Insuficiente	0	0	0
	Total	100	100	100

Elaborado por: Investigadores.

3.5. Preferencia en la utilización

La **tabla 5** evidencia que en relación a la preferencia que poseen los estudiantes para utilizar un determinado software al momento de resolver un ejercicio de derivadas está el GeoGebra con la alternativa de mucho con el 52%; seguido de Maple con el 44%, y por último MatLab con el 40%. De estos resultados, es necesario destacar que un considerable número de estudiantes manifiestan nada de preferencia tanto por Matlab como por Maple.

De acuerdo con la experiencia de los autores, los estudiantes prefieren lo que les resulte un verdadero apoyo didáctico para despejar dudas al momento de resolver los ejercicios matemáticos; aspecto que es confirmado por estudiosos sobre el tema cuando indican que entre las posibilidades que debe ofrecer un software están: favorecer los procesos

inductivos y visualización de conceptos, permitir comparar, verificar, conjeturar y refutar hipótesis; tener un laboratorio de cálculo; individualizar el proceso de enseñanza-aprendizaje; servir como elemento de motivación y como instrumento generador de problemas matemáticos y facilitar la comprensión y aprendizaje de los contenidos programáticos (Balderas, 2005), (Queralt, 2000), (Galdo & Cociña, 1998), (Orellana, 1999)

Tabla 5. Preferencia en la utilización.

ALTERNATIVAS DE RESPUESTAS		MATLAB 2010	GEOGEBRA	MAPLE18
		%	%	%
a)	Mucho	40	52	44
b)	Poco	48	48	40
c)	Nada	12	0	16
	Total	100	100	100

Elaborado por: Investigadores.

4. CONCLUSIONES

Una vez realizada la investigación, tomando como referencia la experiencia de los estudiantes al utilizar los tres softwares matemáticos aplicados en actividades de Cálculo Diferencial; se puede arribar a las siguientes conclusiones:

Cada una de las herramientas tiene sus características que permiten a los estudiantes mostrar sus preferencias; así: GeoGebra es el de mayor facilidad de acceso que permite establecer relaciones geométricas con modelos algebraicos. De la misma manera, se ubica en primer lugar cuando se requiere obtener mayor comprensión de lo que se está haciendo, dado a la metodología intencional para el aprendizaje con la que cuenta.

Maple se ubica como el software de mayor aceptación cuando el estudiante requiere de apoyo para el procedimiento del ejercicio, así como en la confiabilidad de los resultados obtenidos.

De manera general GeoGebra se ubica por encima de Maple y MatLab al momento de determinar la preferencia general de los estudiantes, lo que permite inferir que ellos optan por lo que les resulte un verdadero apoyo didáctico para despejar dudas al momento de resolver los ejercicios de Cálculo Diferencial.

Para el logro de las metas educativas, los docentes deben considerar las apreciaciones de los estudiantes, aspecto que evidencia sus estilos de aprendizaje y que se convierte, desde el punto de vista de los autores, en apoyo fundamental, al momento de escoger los recursos didácticos para desarrollar las clases; sin embargo, se abre la posibilidad de investigar la opinión de los docentes, para entre ambas preferencias, encontrar un punto de relación y con seguridad mejores resultados en la formación integral de los estudiantes.

5. REFERENCIAS

- A.Co, P., & Panella, E. (02 de 02 de 2014). <http://web.fceia.unr.edu.ar/es/>. Obtenido de Unniversidad Nacional Rosario Argentina: http://www.fceia.unr.edu.ar/~semitiel/AyG2-2-2014/Manual de Maple _ Có-Panella_2013.pdf
- Addlink Software Científicos. (17 de Marzo de 2014). Obtenido de <https://www.addlink.es/noticias-maple/2167-como-se-compara-maple-con-mathematica>
- Balderas, A. (21 de enero de 2005). *Informática Educativa*. Obtenido de <http://informaticaeducativa.com/coloquios/mesas/tres/angel/didactica.html>
- Cuicas, M., Debel, E., Casadei, L., & Alvarez, Z. (2007). El Software matemático como herramienta para el desarrollo de habilidades del pensamiento y mejoramiento del aprendizaje de las Matemáticas. *Revista Electrónica "Actualidades Investigativas en Educación"*, 7(2), 1-34.
- Cuicas, M., Debel, E., Casadei, L., & Alvarez, Z. (2007). El software matemático como herramienta para el desarrollo de habilidades del pensamiento y mejoramiento del aprendizaje de las matemáticas. *Actualidades Investigativas en Educación*, 7(2), 1-34.
- Cujó, J. (2003). *Un modelo de enseñanza-aprendizaje de los conceptos de límites de sucesiones, límites de funciones y derivadas*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/edu/ucm-t26872.pdf>
- Galdo, C., & Cociña, A. (1998). *Matemática III con Matemática en la UCA. III Congreso Iberoamericano de Educación Matemática* (págs. 667-669). Caracas _Venezuela: FAPUVA-UCV.
- Gros, B. (s/f). *Del software educativo a educar con software*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Hohenwarter, M., & Hohenwarter, J. (18 de 09 de 2009). *www.geogebra.org*. Obtenido de Manual Oficial de la Versión 3.2 : <https://app.geogebra.org/help/docues.pdf>
- Laz, R., & Laz, G. (2015). El aula virtual como herramienta de enseñanza - aprendizaje en bachillerato. *Sinapsis*, 6(1).
- Marqués, P. (s/f). *El software educativa*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Orellana, M. (1999). *La enseñanza del cálculo*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Pazos, A., Tenorio, G., & Ramírez, M. (2015). Atributos de la innovación en el marco del movimiento educativo abierto para desarrollar competencias Matemáticas,. *Actualidades investigativas en educación*, 15(3), 1-24.
- Queralt, T. (12 de enero de 2000). *Un enfoque constructivista en el aprendizaje de las matemáticas con calculadoras gráficas*. Obtenido de <http://www.ti.com/calc/latinoamerica/pdf/Enfoque.pdf>
- Queralt, T. (12 de enero de 2000). *Un enfoque constructivista en el aprendizaje de las matemáticas con calculadoras gráficas*. Obtenido de <http://www.ti.com/calc/latinoamerica/pdf/Enfoque.pdf>

- Shingareva, I., Lizárraga, C., & Ochoa, A. (2014). *Maple y ondas estacionarias. Problemas y soluciones*. México: Universidad de Sonora.
- Squires, D., & Mcdougall, A. (2001). *Cómo elegir y utilizar un software educativo*. Madrid: Ediciones Morta, S.L.
- Toro, L. (2007). Matemáticas, Ingeniería y computadora. *Educación en ingeniería*, 55-65.
- Zakaria, E., & Lo, S. (2012). Teachers' Perceptions toward the use of GeoGebra in the Teaching and Learning of Mathematics. *Journal of Mathematics and Statistics*, 253-257.

NÚMEROS PRIMOS; MÉTODO GRÁFICO DE LA CONJETURA DE GOLDBACH

Ing. Yandry Intriago Delgado^{1*}

¹Docente a tiempo completo: de la Unidad Educativa Fiscal Rocafuerte.

*Autor para la correspondencia. E-mail: yanmar83@hotmail.com

Recibido: 7-3-2018 / Aceptado: 2-7-2018

RESUMEN

Mediante el uso de Microsoft Excel el siguiente trabajo examina las tablas de multiplicar desde una perspectiva distinta, con un método sencillo para encontrar la secuencia de los números primos en la línea continua de los números naturales (\mathbb{N}), y así luego se identifican gráficamente los números que cumplen con la Conjetura de Goldbach, al realizar una triangulación con líneas que unen la serie de los \mathbb{N} y \mathbb{N}^2 ; siendo la notación: \mathbb{N}^2 el cuadrado de los números naturales. A continuación, se trazan diagonales paralelas a las sucesiones \mathbb{N}^2 y $-\mathbb{N}^2$ únicamente en cada elemento primo (\mathbb{N}') de la línea de los \mathbb{N} y así se obtienen intersecciones que cumplen con la conjetura fuerte de Goldbach. Se aplican fórmulas para calcular el número mínimo de intersecciones que se generan en un conjunto de los \mathbb{N}' consecutivos. Así mismo, para obtener la conjetura débil de Goldbach, se puede usar el gráfico ya antes mencionado, y se emplean fórmulas combinatorias. Este método permite identificar el intervalo de afectación que tiene un elemento primo en la secuencia de los naturales y modelar una línea continua, que revela un gráfico similar al que se conoce como cometa de Goldbach.

Palabras clave: Gráfico, números primos, conjetura de Goldbach.

PRIME NUMBERS; GRAPHIC METHOD OF THE GOLDBACH CONJECTURE

ABSTRACT

By the use of Microsoft Excel the following work examines the multiplication tables from a different perspective, with a simple method to find the sequence of the prime numbers in the continuous line of the natural numbers (\mathbb{N}), and then we can graphically identify the numbers that comply with the Goldbach Conjecture, when making a triangulation with lines that join the series of the \mathbb{N} and \mathbb{N}^2 , in this article the notation: \mathbb{N}^2 is the square of the natural numbers. Next, diagonals are drawn parallel to the sequence \mathbb{N}^2 and $-\mathbb{N}^2$ only in each prime element (\mathbb{N}') of the line of the \mathbb{N} and thus intersections are obtained that meet the strong conjecture of Goldbach. Formulas are applied to calculate the minimum number of intersections that are generated in a set of consecutive \mathbb{N}' . Likewise, to obtain the weak Goldbach conjecture, the aforementioned graph can be used, and combinatorial formulas are used. This method serves to identify the range of affectation that a prime element has in the sequence of the natural numbers, and to model a continuous line, which reveals a graph similar to what is known as Goldbach's comet.

Key words: Graph, prime numbers, Goldbach conjecture.

NÚMEROS PRIMOS; MÉTODO GRÁFICO DA CONJECÇÃO DE GOLDBACH

RESUMO

Utilizando Microsoft Excel o seguinte trabalho examina as tabuadas de multiplicação desde uma perspectiva diferente, com um método simples para encontrar a sequência dos números primos na linha contínua dos números naturais (\mathbb{N}), e então, se identificam graficamente os números que cumprem com a Conjetura de Goldbach, quando se realiza uma triangulação com linhas para unir as séries dos \mathbb{N} e \mathbb{N}^2 , sendo a notação: \mathbb{N}^2 o quadrado dos números naturais. Em seguida, as diagonais são desenhadas paralelamente às seqüências \mathbb{N}^2 e $-\mathbb{N}^2$ somente em cada elemento primo (\mathbb{N}') da linha do \mathbb{N} e, assim, são obtidas interseções que cumprem a Conjetura forte de Goldbach. As fórmulas são aplicadas para calcular o número mínimo de interseções que são geradas em um conjunto de \mathbb{N}' consecutivos. Da mesma forma, para obter a Conjetura fraca de Goldbach, o grafo acima mencionado pode ser usado, com fórmulas combinatórias. Este método permite identificar o alcance de envolvimento que um elemento primo tem na sequência dos naturais e modelar uma linha contínua, o que revela um gráfico similar ao que é conhecido como cometa de Goldbach.

Palavras-chave: Gráfico, números primos, conjetura de Goldbach.

1. INTRODUCCIÓN

Mediante el uso de números primos (\mathbb{N}') acomodados en un esquema gráfico, se demuestra la forma que posee la Conjetura de Goldbach para los 94 primeros \mathbb{N}' . Debido a la complejidad de abordar este tema con el uso de matemáticas avanzadas, se creó este sencillo método visual que permite tener una perspectiva distinta de la hipótesis que formuló Christian Goldbach, quien aseveró que: “Todo número par se puede representar como la suma de 2 números primos”.

Para este procedimiento, se toma como referencia la secuencia infinita de los números naturales (\mathbb{N}), que se relacionan con la sucesión de los (\mathbb{N}^2) dentro de una especie de tabla de multiplicar. Al tomar únicamente los elementos primos, resultan intersecciones que son proyectadas en la línea de los números pares (\mathbb{N}_p). Mediante un cálculo analítico se obtiene como resultado la cantidad de intersecciones existentes para un determinado elemento primo evaluado. De acuerdo a la distribución resultante, el crecimiento de \mathbb{N} al infinito, refleja que mientras mayor valor numérico posea el \mathbb{N}_p evaluado, existirán más combinaciones de \mathbb{N}' que formen dicho elemento par.

Incontables mentes brillantes han abordado esta temática, algunos de ellos le dan un enfoque distinto; como se lo hace en: *The Number Mysteries* (du Sautoy, 2010) y “La Soledad de los Números Primos” (Giordano, 2010). Otros autores, apegados al rigor matemático; analizan la distribución para números pares extremadamente grandes, utilizando algoritmos complejos, que demuestran que la conjetura es válida. En mayo de 2013, se publicó un

artículo en el cual se demostraba la llamada conjetura débil de Goldbach, la cual asevera que: “Todo número impar se puede expresar como la sumatoria de 3 números primos”, (Helfgott, 2013).

2. NÚMEROS PRIMOS

Un número es primo cuando es un número natural mayor que 1; que solo tiene dos divisores naturales: el propio número y el 1. (Maor, 2006). Los números naturales \mathbb{N} están formados por: números pares (\mathbb{N}_p o $2\mathbb{N}$) y números impares (\mathbb{N}_i).

$$\mathbb{N} = \mathbb{N}_p \cup \mathbb{N}_i \quad (1)$$

Los \mathbb{N}_i están formados por los números compuestos impares (\mathbb{N}_{ci}) y los números primos (\mathbb{N}').

$$\mathbb{N}_i = \mathbb{N}_{ci} \cup \mathbb{N}' \quad (2)$$

Se tomará en cuenta la tabla de multiplicar mostrada en la **figura 1**:

5	10	15	20	25
4	8	12	16	20
3	6	9	12	15
2	4	6	8	10
1	2	3	4	5

Figura 1. Tabla de multiplicar convencional.

A continuación, se trazan 2 líneas, una que corresponde a la secuencia numérica infinita \mathbb{N} ;($\mathbb{N} + 1$) ;($\mathbb{N} + 2$) ;($\mathbb{N} + 3$) ;($\mathbb{N} + 4$) ; ; ... ; ∞ y la otra, corresponde a la diagonal con pendiente positiva: \mathbb{N}^2 ;($\mathbb{N} + 1$)² ;($\mathbb{N} + 2$)² ;($\mathbb{N} + 3$)² ;($\mathbb{N} + 4$)² ; ; ... ; ∞ como se representa en la **figura 2**:

					25
				16	20
			9	12	15
		4	6	8	10
	1	2	3	4	5
	\mathbb{N} ;($\mathbb{N} + 1$) ;($\mathbb{N} + 2$) ;($\mathbb{N} + 3$) ;($\mathbb{N} + 4$) ; ; ... ; ∞				

Figura 2. Tabla de multiplicar modificada de secuencia \mathbb{N} y \mathbb{N}^2 .

Esta distribución sigue la secuencia de las tablas de multiplicar, en este caso; el 5to elemento (**tabla del 5**). Tal como se muestra en la **figura 3**:

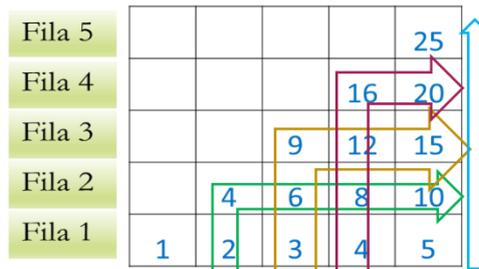


Figura 3. Tabla de multiplicar modificada.

A partir de la fila 2 se encuentran los números compuestos, los impares que constan dentro de esta delimitación no son números primos. Para poder delimitar cuál es, y cuál no es primo; usaremos el método de eliminación en la secuencia \mathbb{N} ; realizando así, una especie de criba de Eratóstenes Ácido.

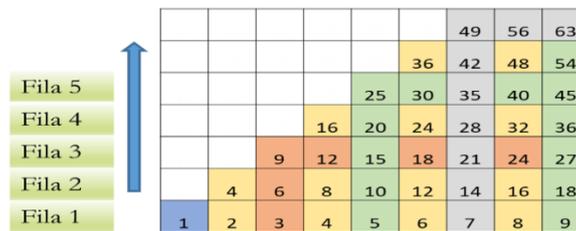


Figura 4. Definición de números compuestos en el gráfico.

2.1. Triangulación

Este método de identificación de números compuestos se basará en el uso de 2 tipos de triángulos: triángulo rectángulo y triángulo isósceles

2.1.1. Triángulo rectángulo

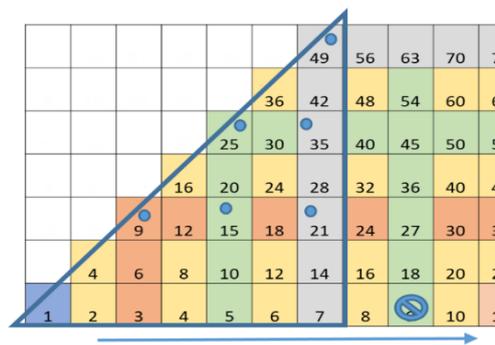


Figura 5. Método del triángulo rectángulo.

Los números que estén dentro del triángulo y sobre la segunda fila se excluyen de la secuencia \mathbb{N} . En la figura 5. los números impares: 9, 15, 21, 25, 35, 49; fueron eliminados de la secuencia de los naturales; por lo tanto, los \mathbb{N}_i que no constan a partir de la fila 2 son elementos primos. En este tipo de triángulo se evalúa la secuencia numérica entre \mathbb{N} y \mathbb{N}^2 en

las diagonales desde 1 hasta N por el lado de la secuencia N ; y desde 1 hasta N^2 (en la secuencia N^2); Ejemplo para $N = 7$ entonces; $N^2 = 49$.

2.1.2. Triángulo isósceles

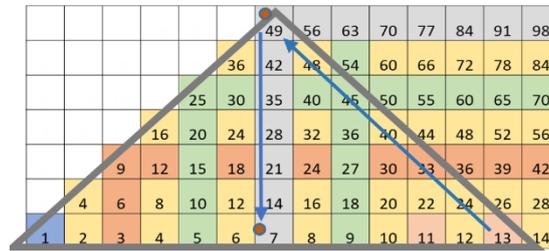


Figura 6. Método del triángulo isósceles.

Si se suma en la secuencia de los naturales (base del triángulo de la figura 6) los números impares del 1 al 13, da como resultado el número 49; que es múltiplo de 7, con esto se deduce que: 13 es el séptimo impar. Ejemplo 1. Se suman los impares consecutivos hasta llegar al impar que se está evaluando: $1+3+5+7+11+13 = 49$.

La suma de los números impares consecutivos desde el 1 hasta el impar (N_i) que se evalúe, siempre es un elemento de la secuencia N^2 cuya raíz cuadrada será un número (n_i) que represente el ordinal del impar evaluado. En las figuras 7a y 7b se puede apreciar el comportamiento que tienen las secuencias N , N^2 y $-N^2$



Figura 7.a.

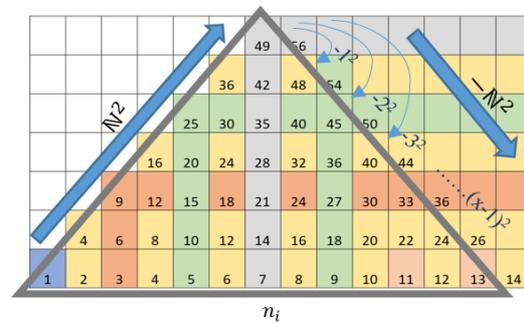


Figura 7. b.

Esta triangulación se realizará siempre desde cualquier N_i , tal como se lo aprecia en la figura 8. Ejemplo 2: El dígito 9 no puede ser número primo, porque es múltiplo de 3; además de ser un elemento que se encuentra en la secuencia N^2 .

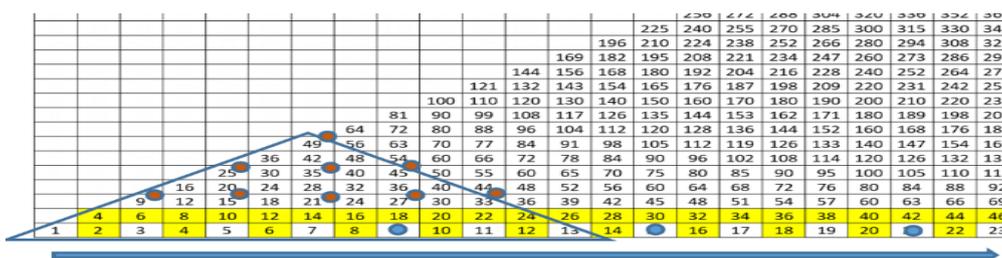


Figura 8. Evaluación de elementos compuestos en secuencia N .



Figura 11. Forma en la que se generarán las líneas de la demostración.

Por cada número primo se trazarán 2 líneas diagonales; una hacia la izquierda, otra hacia la derecha, y se contrastarán sus intersecciones. Luego, en la columna donde se dan los cruces; se toma como referencia la fila que corresponde a la secuencia 2 (tabla del 2 o fila 2).

Ejemplo 3. En la figura 12 en el número 5; específicamente en el elemento compuesto 15, las líneas que generaron la intersección fueron los primos; 3 y 7, se toma como referencia la columna correspondiente y se relaciona con la fila o secuencia 2, verificando así que el número resultante es 10, lógicamente éste se forma por la suma de los primos: 3 y 7, antes mencionados.

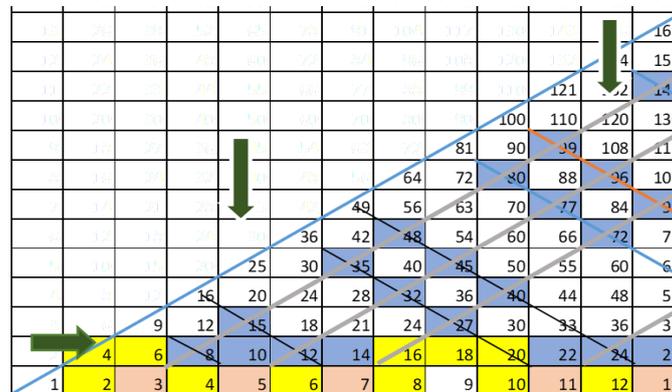


Figura 12. Intersecciones generadas.

Ejemplo 4: Así pues, se tomará otro número: La columna del número 12 tiene 3 intersecciones en: 24, 72 y 96; esto quiere decir, que el número 24 (12+12) tiene 3 posibles resultados; luego se comprueba que las cifras en donde se generaron las intersecciones cumplen con la condición antes mencionada: 11+13; 7+17; 5+19.

2.3. Combinaciones con otros números primos

Para conocer la cantidad mínima de intersecciones que se generan hasta un determinado número primo, es necesario analizar el siguiente gráfico, en donde hay que tomar en cuenta el ordinal de cada número primo (excluyendo por el momento del cálculo al número 2 que es

el primer elemento primo). Cada número primo se relacionaría (n-1) veces con los elementos primos que le anteceden. Este símbolo $\overline{\text{||||}}$ se utilizará para expresar mediante la suma de Gauss, la cantidad mínima de intersecciones que genera un primo al intersectarse con otros que le preceden. El número 2 (único par) genera solo 1 intersección ($2+2=4$) $r_o = (r_o-1) + 1 = r_o$ cada número primo genera r_o intersecciones.

Ejemplo 5. Con la secuencia corta de números primos :(2) 3 5 7 11 13 17 19, se analizará el impar 11 (5to número primo). Para este cálculo será considerado como 4to número primo; el impar 11 generará 4 intersecciones como se muestra en la **figura 13**.

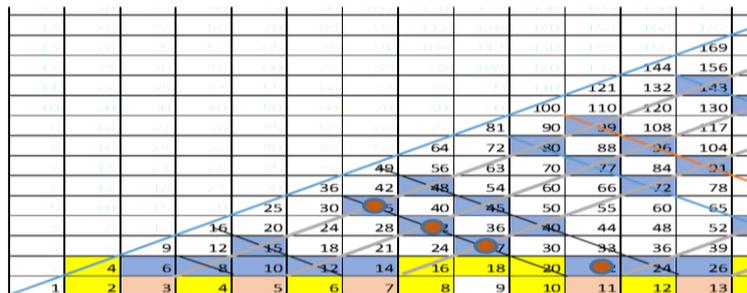


Figura 13. Intersecciones que genera el número primo 11.

Ejemplo 6. En la **figura 14** se examinará el número 19; que es el séptimo número primo, este generará 7 intersecciones.

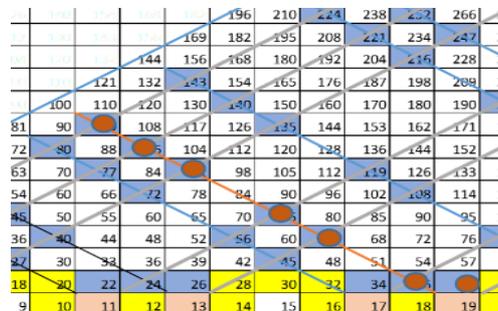


Figura 14. Intersecciones que genera el número primo 19.

Para calcular el número total de intersecciones que se den hasta el número primo que es objeto de análisis, se usará la fórmula de la suma de Gauss. A la misma se le aumentará el dígito +1, que corresponde a la suma de: $2+2=4$; obteniendo como resultado la ecuación (3); en ésta, r representa al número ordinal del elemento primo evaluado:

$$\overline{\text{||||}} \rightarrow = \frac{r(r+1)}{2} + 1 \quad (3)$$

Aplicando un poco de matemática básica, se consigue la expresión equivalente (4); la que al igual que (3) siempre generará números enteros.

$$\left\{ \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right\} \rightarrow = \frac{r^2+r+2}{2} \quad (4)$$

Ejemplos:

Calcular a continuación el número de intersecciones mínimas que genera cada número primo:

Ejemplo 7.: El primer número primo:

(2) 3 5 7 11 13 17 19 23 29 31 37 41 43 47 53 59 61 67 71

El número 3.

$$\left\{ \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right\} = \frac{r^2 + r + 2}{2} = \left\{ \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right\} = \frac{1^2+1+2}{2} = \frac{1+1+2}{2} = \frac{4}{2} = 2$$

Se comprueban las 2 intersecciones, tal como lo indica la **figura 15**:

2+2=4

3+3=6

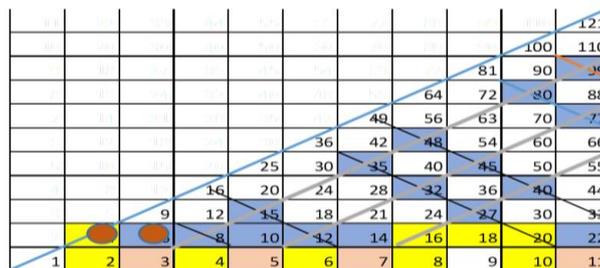


Figura 15. Número de intersecciones mínimas para el número 3.

Ejemplo 8. El tercer número primo:

(2) 3 5 7 11 13 17 19 23 29 31 37 41 43 47 53 59 61 67 71, es el número 7.

$$\left\{ \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right\} = \frac{r^2 + r + 2}{2} = \frac{3^2+3+2}{2} = \frac{9+3+2}{2} = \frac{14}{2} = 7$$

Este elemento primo generará 7 posibles combinaciones, como se muestra en la **figura 16**.

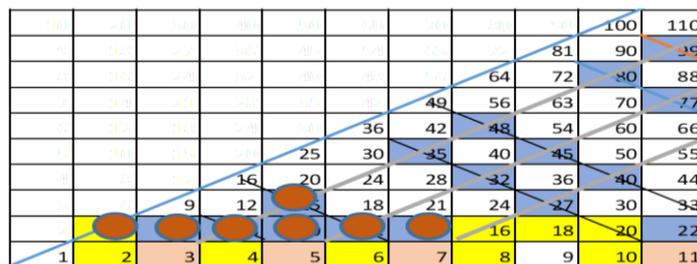


Figura 16. Número de intersecciones mínimas para el número 7.

Ejemplo 9. El séptimo número primo:

(2) 3 5 7 11 13 17 19 23 29 31 37 41 43 47 53 59 61 67, es el número 19. Con la fórmula

(4):

$$\left\{ \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right\} = \frac{r^2 + r + 2}{2} = \frac{7^2 + 7 + 2}{2} = \frac{49 + 7 + 2}{2} = \frac{58}{2} = 29$$

Las 29 intersecciones serían entonces:

$2+2=4$ $11+11=22$ $3+3=6$ $5+17=22$ $3+5=8$ $3+19=22$ $3+7=10$
 $11+13=24$ $5+5=10$ $7+17=24$ $5+7=12$ $5+19=24$ $7+7=14$ $13+13=26$
 $3+11=14$ $7+19=26$ $5+11=16$ $17+11=28$ $3+13=16$ $13+17=30$ $7+11=18$
 $11+19=30$ $5+13=18$ $13+19=32$ $7+13=20$ $17+17=34$ $17+3=20$ $17+19=36$
 $19+19=38$

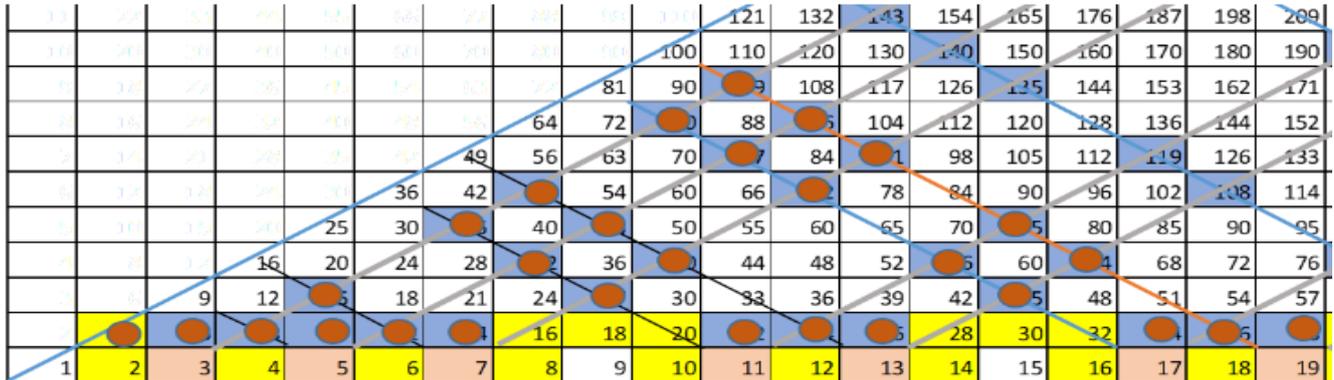


Figura 17. Número de intersecciones mínimas para el número 19.

En la **figura 17** se muestran los lugares donde existen intersecciones hasta el elemento primo 19. A cada número primo le corresponde trazar una línea hacia la izquierda como la de la secuencia $-\mathbb{N}^2$ (Figura 7.b.). Luego de ser evaluado este número, generará una línea con la misma inclinación y dirección de \mathbb{N}^2 la cual se dirigirá hasta el infinito.

Ejemplo 10. El 167avo número primo: 997. En esta ocasión se evaluará con la expresión equivalente (3).

$$\left\| \begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right\| = \frac{r(r+1)}{2} + 1 = \frac{167(167+1)}{2} + 1 = 14028 + 1 = 14029$$

2.4. Gráfico de las intersecciones

Cada elemento de \mathbb{N}' se intersecta con los elementos primos que le anteceden en una distribución; que tiene su afectación desde el ordinal (n_i) que le corresponde como número impar (en la secuencia \mathbb{N}), hasta el primo evaluado.

En la **figura 18** si se toma en cuenta el número 19, se nota que su alcance en diagonal llega hasta el número 100, cuya raíz cuadrada es 10; es decir, 19 es el décimo número impar. La distribución de las intersecciones afectará en este caso a partir de $n_i=10$, hasta llegar al número 19.

Números Primos; Método Gráfico de la Conjetura de Goldbach

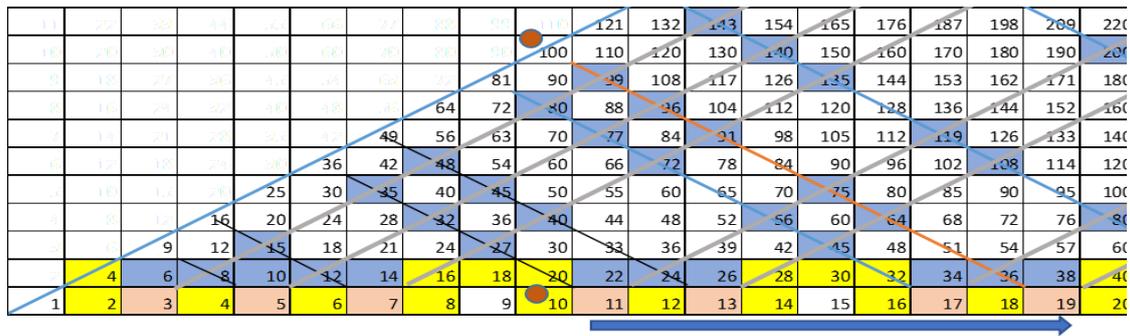


Figura 18. Explicación Gráfica de la zona de distribución de intersecciones para el número 19.

Se realizará el siguiente análisis con gráficos que demuestren esta distribución. El primero de ellos corresponde a los números: 2 y 3 (figura 19), estos números solo se relacionan consigo mismo.

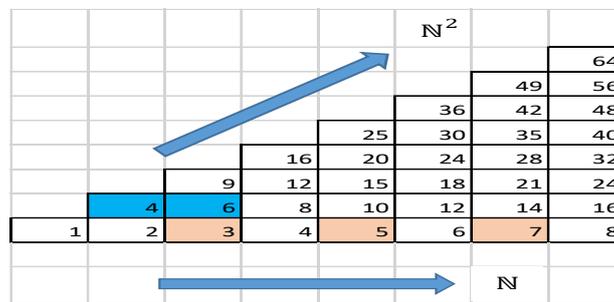


Figura 19. Número de intersecciones para los primeros números primos 2 y 3.

A continuación, se analizarán los números 5 y 7 en las siguientes figuras:

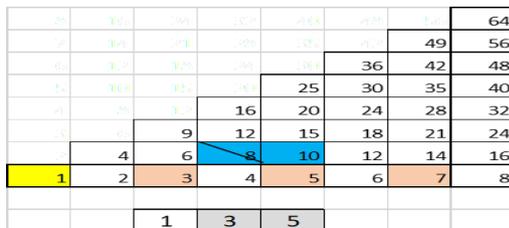


Figura 20.a. Distribución del número 5

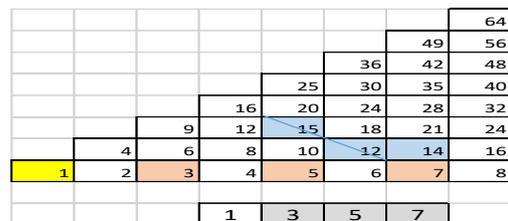


Figura 20.b. Distribución del número 7

Tómese como referencia solo los números primos (N') dentro de la secuencia N ; Los elementos impares compuestos no serán objeto de análisis para este método.

En la figura 20.a. el primo 5 se triangula con el elemento de N^2 que le corresponde (número 9); luego, en la secuencia de los naturales se relaciona con el número 3, que es la raíz cuadrada del número 9; tal y como ya se había dicho anteriormente. Esto significa que el 5, es el tercer número impar.

Entonces, desde ese punto se comenzará a marcar la secuencia de los números impares; desde el 1 hasta llegar al elemento que se está evaluando, mismo que siempre coincidirá con

4) Además, se necesitará las secuencias de los números impares compuestos y primos que recientemente se definió.

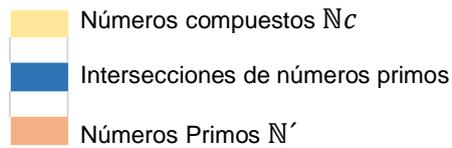


Figura 23. Símbolos del gráfico.

A continuación, en una serie de gráficos, (Figura 24) se mostrará cómo va creciendo la secuencia numérica en función de los elementos primos:

NUMERO PRIMO	ORDINAL								
13	6								
11	5								
7	4								
5	3								
3	2								
2	1								
secuencia N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
secuencia par(x2)		4	6	8	10	12	14	16	18

Figura 24.a. Número de intersecciones para 2 y 3.

NUMERO PRIMO	ORDINAL								
29	10								
23	9								
19	8								
17	7								
13	6								
11	5								
7	4								
5	3								
3	2								
2	1								
secuencia N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
secuencia par(x2)		4	6	8	10	12	14	16	18

Figura 24.b. Número de intersecciones para el número 5.

NUMERO PRIMO	ORDINAL								
29	10								
23	9								
19	8								
17	7								
13	6								
11	5								
7	4								
5	3								
3	2								
2	1								
secuencia N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
secuencia par(x2)		4	6	8	10	12	14	16	18

Figura 24.c. Número de intersecciones para el número 7.

NUMERO PRIMO	ORDINAL											
29	10											
23	9											
19	8											
17	7											
13	6											
11	5											
7	4											
5	3											
3	2											
2	1											
secuencia N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
secuencia par(x2)		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24

Figura 24.d. Número de intersecciones para el número 11.

NUMERO PRIMO	ORDINAL														
29	10														
23	9														
19	8														
17	7														
13	6														
11	5														
7	4														
5	3														
3	2														
2	1														
secuencia N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
secuencia par(x2)		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30

Figura 24.e. Número de intersecciones para el número 13.

NUMERO PRIMO	ORDINAL																	
29	10																	
23	9																	
19	8																	
17	7																	
13	6																	
11	5																	
7	4																	
5	3																	
3	2																	
2	1																	
secuencia N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
secuencia par(x2)		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36

Figura 24.f. Número de intersecciones para el número 17.

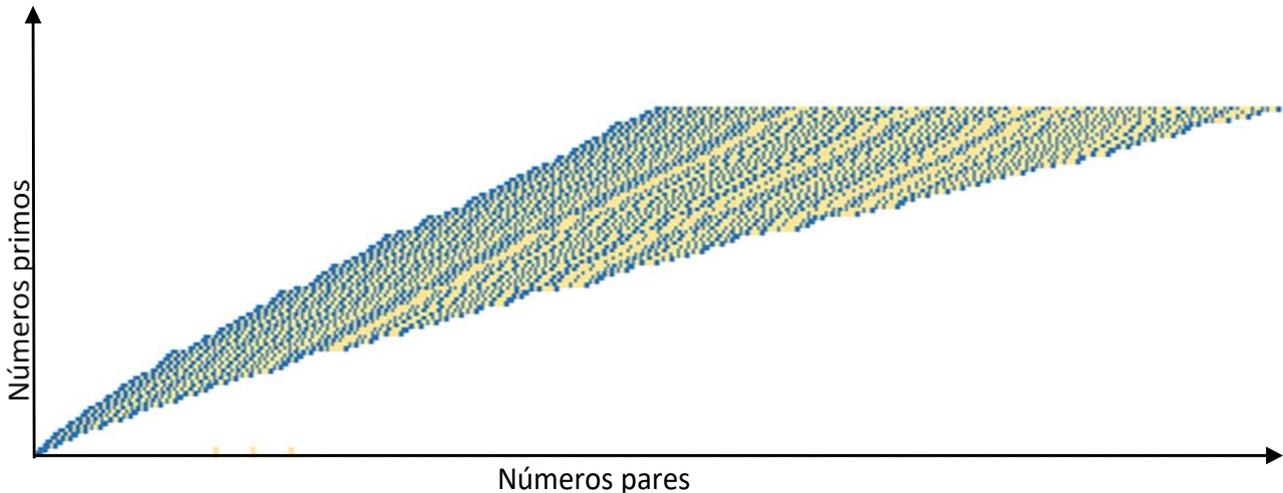


Figura 25. Gráfico resultante de la evaluación de 94 elementos primos consecutivos.

Si se quiere evaluar un primo grande hay que recordar que éste se relacionaría con cada elemento primo que le antecede, desde el número 3 hasta la cifra impar que está siendo evaluada, y la cantidad de sus intersecciones están relacionadas con el número del ordinal que le corresponde como elemento primo.

Ejemplo 11: El número 5281 es el 700avo elemento primo, con la expresión (5) se calculará su distribución en las secuencias \mathbb{N} y $2\mathbb{N}$, donde n_i será el ordinal de la secuencia impar a la cual pertenece el número primo (N') evaluado.

$$n_i = \frac{N' + 1}{2} = \quad (5)$$

$$n_i = \frac{5281 + 1}{2} = 2641$$

$$2n_i = 5282$$

El primo 5281 generará 700 intersecciones las cuales comenzarán a formarse en la secuencia \mathbb{N} a partir del número 2641, en este caso corresponde al 13% del total de números; desde el 1 hasta el 5281. Así mismo, su afectación en la secuencia par es $[(N' + 1); ; 2N']$ (6) lo cual indica que iniciará a partir de $2n_i$ o $(N' + 1)$ y llegará hasta $2N'$, desde 5282 hasta 10564. Se puede emplear la expresión: $[(N' + 3), +\infty)$ (7) para conocer la menor cantidad par que puede generar cualquier número primo. Se considera al número 3 en la notación por ser el menor primo impar.

Ejemplo 12: se tiene el primo 17; utilizando (7) se tendría:

$$[(17 + 3), +\infty) = [20, +\infty)$$

Es decir, el menor número par que puede generar el primo 17 es el número 20, y se extenderá hasta el infinito. En esta explicación no se usan técnicas matemáticas avanzadas, función ζ (zeta) de Riemann o funciones exponenciales como se lo menciona en artículos como: El Teorema de los números primos (Chamizo, 2010), Demostración elemental de los números primos (Cilleruelo, 2000). L'ipotesi di Goldbach da una Congettura Statistica ad una Congettura Matematica (Salmeri & Salmeri, 2002) El Análisis matemático y los Números Primos (Bonet, 2014), Los Números Primos-Hechos y Conjeturas (Prieto, 2013); pues en dichos artículos se denota un elevado rigor matemático y una alta complejidad.

2.5. Conjetura débil de Goldbach: Suma de 3 números primos

Sean los números primos: 2, 3, 5 y 7. De la **figura 26**:

6		9		15		21
4		6		10		14
2		3		5		7

Figura 26. Configuración para sumar 3 números primos.

Los números; 4, 6, 10 y 14 son el doble producto de los elementos 2, 3, 5, 7, respectivamente. En esta ocasión, el número se puede sumar hasta 3 veces consigo mismo, se eliminan los dígitos 2 y 6, pues con ellos no se pueden armar combinaciones efectivas, el 2 proporcionará números pares como resultado, y el 6 es 3 veces el dígito 2. Se verificará de manera gráfica (Figura 27) la cantidad de resultados que generarán estas combinaciones:

6		9		15		21
4		6		10		14
2		3		5		7

6		9		15		21
4		6		10		14
2		3		5		7

6		9		15		21
4		6		10		14
2		3		5		7

Figura 27. Formas de sumar los 3 primeros números primos.

$$\begin{array}{ccccccc}
 3+10=13 & 3+14=17 & 3+3+3=9 & 3+4=7 & 5+6=11 & 5+14=19 & 5+5+5=15 \\
 5+4=9 & 7+6=13 & 7+10=17 & 7+7+7=21 & 7+4=11 & 3+5+7=15 &
 \end{array}$$

Para estos números existe un total de 13 combinaciones posibles; mismas que generan cantidades desde el número 7 hasta el 21, en este intervalo de la secuencia N hay un espacio de 8 números impares, con lo cual la probabilidad de que cada uno de estos elementos posea una combinación es del 1.63 o del 163%. A continuación, se observa lo que ocurre cuando es colocado otro número primo.

Números Primos; Método Gráfico de la Conjetura de Goldbach

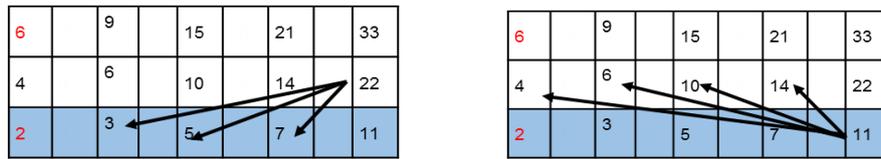


Figura 28. Forma de sumar los 4 primeros números primos.

A las combinaciones anteriores se le debe aumentar también las de la **figura 28**:

$$11+6=17 \quad 11+10=21 \quad 11+14=25 \quad 11+4=15 \quad 11+11+11=33$$

Más las combinaciones:

$$11+3+7=21 \quad 11+5+7=23 \quad 11+3+5=19 \quad 3+22=25 \quad 5+22=27 \quad 7+22=29$$

Con un elemento primo adicional se obtendrán 24 combinaciones distribuidas desde el número 7 hasta el 33, es decir, en el espacio de 14 impares hay 24 combinaciones de números. Estas expresiones se pueden modelar con fórmulas de combinaciones, y se tomará en cuenta que aquí se pueden repetir cada uno de sus miembros.

Con $m \geq n$ donde m es el número de primos evaluados; excluyendo al elemento par 2, y n son los números a combinar, en este caso siempre será 3. Ahora, se calculará por fórmula el número de combinaciones del 4to primo que es el impar 11. Se usará la fórmula (8):

$$CR_{m,n} = \frac{(m + n - 1)!}{n! (m - 1)!} + m \quad (8)$$

$$CR_{4,3} = \frac{(4 + 3 - 1)!}{3! 3!} + 4$$

$$CR_{4,3} = \frac{6!}{3! 3!} + 4$$

$$CR_{4,3} = 24$$

Con la expresión (8) se calculan las posibles combinaciones del 100avo elemento primo (número 541).

$$CR_{m,n} = \frac{(m + n - 1)!}{n! (m - 1)!} + m$$

$$CR_{100,3} = \frac{(100 + 3 - 1)!}{3! (100 - 1)!} + 100$$

$$CR_{100,3} = \frac{102!}{3! 99!} + 100$$

$$CR_{100,3} = 171800$$

Es decir que hay 171800 combinaciones posibles; desde el número 7 hasta el 1623 (541x3); en 809 números impares existe tal cantidad de combinaciones; (excluidos: 1, 3, 5.)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **figura 12**, las líneas paralelas a la diagonal \mathbb{N}^2 seguirán el orden de los $\mathbb{N}i$, entonces: $\mathbb{N}^2 - 1$ con $\mathbb{N} > 1$; $\mathbb{N}^2 - 4$, con $\mathbb{N} > 2$; y así sucesivamente hasta $+\infty$ en el orden de los \mathbb{N} . Si se relacionan las 2 primeras diagonales se tendrá la relación $\prod[\mathbb{N}^2/(\mathbb{N}^2 - 1)]$; dicho producto es cero y lo origina el primer elemento de la secuencia (número 1); entonces, si se tomara en cuenta solo la serie \mathbb{N}' se tendrá que: $\prod[(\mathbb{N}')^2/((\mathbb{N}')^2 - 1)] = \pi^2/6$, la cual es una expresión equivalente del producto de Euler para la función zeta (ζ) de Riemann.

Las fórmulas 3 o 4 son fiables para obtener valores de intersecciones mínimas que posee un determinado elemento primo. Los gráficos 24 y 25, parecerían ser el diseño de lo que se conoce como: Cometa de Goldbach, ya que marcan el número de intersecciones que tiene cada elemento par en la secuencia de los números naturales.

En la **Figura 25**, se aprecia que concurren varias líneas superpuestas, mientras más elementos de \mathbb{N}' se evalúan; mayor cantidad de líneas se obtendrán, y conforme aumentan los elementos; crece la longitud de la línea. Este acrecentamiento se forma a la derecha ($+\infty$) siguiendo la sucesión de los números naturales con el 1 como primer elemento. Además, implica que para un determinado número par ($2\mathbb{N}$) que se aleja del origen de \mathbb{N} y se acerca a $+\infty$ existe una mayor probabilidad de que este se pueda expresar mediante distintas combinaciones de primos. Así pues, el número 8 cercano al origen solo tiene 1 combinación, y el 34 más alejado del origen tiene 4.

El intervalo real de la distribución estaría expresado por la notación: $[(\mathbb{N}' + 1) ; 2\mathbb{N}']$ (6), ya que esta engloba a todos los números pares afectados desde $(\mathbb{N}'+1)$ hasta $2\mathbb{N}'$. De acuerdo a la expresión $[(\mathbb{N}' + 3) , +\infty)$ (7) el intervalo de los números pares que son afectados por el número primo que se está evaluando, siempre tendrá límite inferior $(\mathbb{N}'+3)$ y límite superior $+\infty$.

Para la **figura 17**, en donde hay 29 intersecciones; si a cada una de ellas se le suma el número 3, se cumpliría la conjetura débil. El primo 19 que es objeto de estudio, en este caso se relaciona también con todos los elementos primos que le anteceden: 5, 7, 11, 13, 17, y por única ocasión consigo mismo; es decir, que en este mismo gráfico se podrían evaluar todos

estos elementos tomándolos de 1 en 1, estableciendo una serie de combinaciones que arrojarían una mayor cantidad de elementos impares, en donde varios de estos, poseerán igual valor numérico, y tendrán un valor máximo de $19 \times 3 = 57$.

4. CONCLUSIONES

Las intersecciones generadas en este método gráfico cumplen con las conjeturas de Goldbach. En la construcción de la **figura 25** se notan ciertas particularidades, una de ellas es que todo número par mayor que 14 se puede expresar como la suma de al menos 3 números naturales distintos ($7+7$; $11+3$). Además, hay una mayor densidad en el borde de la imagen que se forma, debido a la cercanía que tienen los primeros elementos primos. Los “huecos” que fueron comparados con el cauce de un río no afectarían a la distribución, ya que estos serían cada vez más comunes, conforme avanza la secuencia, y siempre aparecerán en un orden inferior al del borde. Esta forma de crecimiento se mueve hacia la derecha a medida que avanza la secuencia de los números naturales, también se aprecia que existen números de ciertas secuencias \mathbb{N} con mayor cantidad de intersecciones como aquellos elementos; cuyo último dígito es 5 y otros naturales con poca concurrencia.

5. REFERENCIAS

- Bonet, J. (2014). El Análisis matemático y los Números Primos. Instituto Universitario de Matemática Pura y Aplicada, Universitat Politècnica de Valencia. Conferencia llevada a cabo en Valencia.
- Cilleruelo, J. (2000). La demostración elemental del teorema de los números primos. *Números*: 43 y 44, 243-246.
- Chamizo, F. (2010). El Teorema de los Números Primos.
- Du Sautoy, M. (2010). *The Number Mysteries* (1st edition). HarperCollins UK.
- Giordano, P. (2010). La Soledad de los Números Primos.
- Helfgott, H. (2013) *Major arcs for Goldbach's problem* (1° Edition) Cornell University library.
- Maor, E. (2006). *Historia de un número*. (1° Edición). México. D.F., México, Inst. Nacional de antropología e historia.
- Salmeri, A. & Salmeri, M. (2002). *L'ipotesi di Goldbach da una Congettura Statistica ad una Congettura Matematica*. Dipartimento di Ingegneria Elettronica, Università di Roma. Atti del Congresso nazionale Mathesis. Congreso llevado a cabo en Bèrgamo.
- Prieto, C. (2013). *Los Números Primos-Hechos y Conjeturas*. Montenegro (Presidencia), 2º Encuentro con los números. Congreso llevado a cabo en Envigado, Antioquia, Colombia.



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 Resumo. 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 resumo. 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.
8. El autor no debe presentar cambios en el contenido de su trabajo después de que ha sido aceptado y se le ha devuelto para que realice las correcciones propuestas. Si existiera una razón de peso para realizar cambios el autor debe informarlos al Comité Editorial y este tiene la autoridad para aprobar o no los cambios propuestos.
9. El autor no debe conocer el nombre de los árbitros o indagar sobre los mismos.
10. Los autores cuya investigación involucre seres humanos o animales son responsables de la aprobación por el Comité de Bioética de la Investigación de la institución en que se hizo el estudio e identificarlo en el texto de la forma siguiente:

Responsabilidades éticas





Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de Intereses: Ninguno.

Envíe este documento en formato **.pdf**

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**)/michelgamboagaus@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