

INTRODUCCIÓN

El color es un factor que influye bastante en la aceptabilidad de los consumidores, debido al hecho que los consumidores siempre asocian el color de los alimentos con otras cualidades tales como la frescura, madurez y seguridad alimenticia. De esta manera a muchos alimentos procesados se les han añadido colorantes alimenticios para hacerlos más deseables puesto que los alimentos para su industrialización pasan por diversas etapas donde la mayoría se someten a tratamientos térmicos, lo que conlleva a que los alimentos generen tonalidades que van desde un ligero amarillo hasta un intenso café, mediante las reacciones de Maillard y de caramelización y en otras ocasiones, los pigmentos que contienen se alteran y cambian de color debido a su inestabilidad o a su degradación, perdiendo su buen aspecto^{1,2,3}. Por lo que durante muchos años, los colorantes artificiales se han venido utilizando para reemplazar a los colorantes naturales de los alimentos que se descomponen durante su procesado. Sin embargo, recientemente, el número de colorantes apropiados para el procesado de alimentos se ha reducido drásticamente, como consecuencia de diversos estudios toxicológicos, en los que se han encontrado problemas de salud derivados del uso de ciertos colorantes artificiales^{4,5}.

En la actualidad, existe bastante recelo hacia el consumo de alimentos que contengan colorantes sintéticos. Se prefieren los colorantes naturales. Sin embargo, para su producción industrial, los colorantes naturales se han de extraer del material que los contiene, lo que los hace más caros, menos estables, y con menor poder colorante que sus correspondientes artificiales. Siendo las principales fuentes, la mayoría de las frutas y vegetales, existiendo una gran cantidad de pigmentos de origen botánico, entre los principales están las clorofilas, los carotenoides, las antocianinas, los flavonoides, los taninos y las betalainas; siendo uno de los más utilizados en la industria éste último grupo de pigmentos^{6,7,8}.

Las betalainas dan coloración a diferentes órganos, como flores, frutos, hojas, raíces, donde producen colores rojo, amarillo, naranja, rosa entre otros. Químicamente son moléculas derivadas del ácido betalámico, solubles en agua y son de dos tipos betaxantinas que son de coloración que va de amarillo a naranja y las betacianinas que son de coloración rojiza^{3,9,10}.

Su aplicación se da principalmente en el área de los alimentos, pues son sustitutos de colorantes sintéticos empleándose en la elaboración de gelatinas, confituras, yogur de fresa, helados de cremas, cocktails de frutas, caramelos y galletas, siendo el más empleado

comercialmente, el colorante rojo de remolacha, el cual es aceptado por la Comunidad Económica Europea y E.E.U.U clasificándolos con el código E162 y aditivo 73.40 de la sección CFR 21 de la "Food and Drugs Administration" respectivamente.

Este colorante se obtiene por deshidratación y pulverización de *Beta vulgaris* tipo "remolacha roja" o "betarraga". En España se utiliza en bebidas refrescantes, conservas vegetales y mermeladas (300mg/Kg.), conservas de pescado (200mg/Kg.), en yogures (hasta 18 mg/Kg) y en preparados a base de queso fresco, hasta 250 mg/Kg, proporcionando una coloración rojiza por el tipo de betalaina (tipo betacianina) que posee. No se conocen efectos nocivos de este colorante por lo que la Organización Mundial de la Salud no ha fijado un límite a la dosis diaria admisible^{11,12,13}.

Sin embargo, la problemática de su producción y conservación radica en su estabilidad, ya que por ser estructuras sensibles a la oxidación química, su aprovechamiento integral está limitado en la industria alimentaria, pues generalmente, se usa en alimentos que no requieran o se empleen mínimamente tratamientos térmicos, como en procesos para la obtención de yogures, golosinas, jarabes, helados y salchichas ya que amerita controles enzimáticos eficientes, procedimientos de extracción adecuados y la utilización de atmósferas controladas¹³. Por lo que las investigaciones en esta área se están dirigiendo al estudio de su estabilidad y degradación, reportándose que dependen de diversos factores, entre los que destacan pH, luz, altas temperaturas, oxígeno y actividad del agua^{14,15,16}.

Específicamente la betacianina de betarraga no se ve afectado por ácidos monocarboxílicos como el ácido láctico y ácido acético a concentraciones de 100 ppm y 5.9 % respectivamente; pero cationes metálicos, principalmente el cobre, aceleran su degradación. Los antioxidantes como el -tocoferol y la vitamina C funcionan como prooxidantes a estas concentraciones. Algunos secuestrantes de metales como los ácidos etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido cítrico aumentan 50 % de su estabilidad. Si se calienta fuertemente se acelera la hidrólisis de la betacianina en solución y se produce ácido betalámico y ciclodopa-5-0-glucósido, pero esta reacción es parcialmente reversible de acuerdo con el pH^{17,18}.

Continuando con los reportes o estudios de estabilidad, algunos autores han señalado diferencias en la composición, propiedades espectrales y el color en los diferentes cultivares de "betarraga" o "remolacha", razón por la cual resulta de interés el conocimiento

sobre el comportamiento degradativo y estabilidad de betalaínas en cultivares de betarraga en nuestro país, los factores ambientales propios de una región o país también podrían influenciar en la cantidad de las betalaínas en esta especie^{19,20,21}.

La betarraga, remolacha o betabel, nombre común de ciertas especies de un género de plantas, en su mayoría bianuales, que dan hojas lisas, ovaladas y pecioladas, dispuestas en rosetas y, más tarde, tallos altos con hojas y flores; originarias de las zonas templadas de Eurasia, hoy día se cultivan en todas partes, principalmente por sus grandes y succulentas raíces, que se emplean en alimentación humana, para piensos, y también para extraer azúcar. La especie más importante, la betarraga, remolacha o betabel común, tiene distintas variedades reconocidas. La común está clasificada como *Beta vulgaris*. La acelga, o acelga suiza, está clasificada como *Beta vulgaris*, variedad *cicla*; la remolacha forrajera, como *Beta vulgaris* variedad *macrohiza*, y la remolacha de mesa, como *Beta vulgaris* variedad *crassa*. En el Perú se cultiva *B. vulgaris* subsp. *rapa* forma rubra muy empleado en la alimentación humana²¹.

Por lo que la presente investigación estuvo enfocada en el estudio de los principales factores como la temperatura del medio (almacenamiento) y luminosidad y como influyen en la estabilidad de las betalaínas en *B. vulgaris* subsp. *rapa* forma *rubra* "betarraga".

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología de extracción de las betalaínas

Para la preparación del extracto se utilizaron las raíces de *Beta vulgaris* "betarraga", las muestras fueron lavadas con agua corriente y secadas posteriormente con papel absorbente. Se cortaron con cuchillos de acero inoxidable

en trozos de tamaño variable.

Luego, se procedió a la obtención del extracto acuoso de la betarraga mediante agua caliente a temperatura de 80°C, empleando una proporción de 2:1 (agua - betarraga en pulpa), el proceso de extracción fue durante 25 minutos mediante calentamiento en una marmita de tipo chaqueta de vapor, luego se procedió a la concentración del extracto empleando un vacío de 23" de Hg. y una temperatura máxima de 40°C, hasta obtener una concentración de 60 °Brix, para luego proceder al secado del extracto. Y obtener un producto de un 8 % de humedad.

2. Modelo experimental y tratamiento de datos:

El modelo experimental empleado fue el diseño factorial 3x2 con dos variables independientes: *Temperatura* y *luminosidad*, interaccionando los respectivos niveles, dando lugar a 6 grupos con sus respectivos tratamientos, con tres repeticiones cada uno (tabla 1).

Las temperaturas empleadas fueron: 4 °C, 25 °C y 68 °C; las cuales fueron escogidas debido a que la mayoría de los alimentos se almacenan a estas temperaturas o en caso de tener algún tratamiento térmico se pueden alcanzar temperaturas altas como los 68 °C. Para mantener la temperatura a 4 °C se empleó un refrigerador marca COLDEX, los 25 °C corresponde a las muestras que representan al almacenamiento comercial colocándose en una cámara de madera, a ambos equipos se les instaló un sistema de control automático con el fin de mantener las temperaturas mencionadas y para obtener la temperatura a 68 °C, se empleó una estufa.

En cuanto a la luminosidad se emplearon: 198 lux y 0 lux (oscuridad), para mantener esta última condición (oscuridad) las muestras fueron cubiertas con papel aluminio.

Tabla 1. Esquema del diseño experimental del tipo factorial 3x2

	A1	A2	A3
B1	A1B1(A)	A2B1(B)	A3B1 (C)
B2	A1B2(D)	A2B1(E)	A3B1(F)

Donde A: temperatura: A1:4 °C; A2: 25 °C y A3: 68 °C; B: luminosidad: B1: 0 lux (oscuridad) y B2 198 lux

3. Evaluación de la estabilidad de las betalaínas

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de las betalaínas en el extracto de betarraga, se determinó las concentraciones de los pigmentos betalámicos presentes, durante 120 días en intervalos de 30 días mediante un espectrofotómetro UV-Visible empleando una absorbancia de 537 nm a pH 6,1 y la concentración se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del pigmento mayoritario (betacianina: E1 cm 1%:1120 L mol-

1 cm-1), según procedimiento establecido por Lock⁶.

Las muestras se tomaron con capilares de vidrio recolectando un peso de $0,020 \pm 0,001$ g diluyéndolas en volúmenes de $30,0 \pm 0,1$ mL de agua destilada.

Luego se procedió a registrar los datos de las concentraciones de betalaínas de los grupos experimentales, evaluando su estabilidad, a través del análisis de la disminución por degradación a través del gráfico obtenido por el programa de Excel.

Para mantener el pH estable a 4,5 de los extractos durante todo el periodo que duró el experimento se adicionó el amortiguador citrato esto se realizó antes del proceso de concentrado y secado. Se monitoreo tomando 1 gramo de las alícuotas que contenían el extracto seco, para resuspenderlo en 50 mL de agua destilada y realizar la respectiva medición del pH, semanalmente y durante los 120 días de investigación, además de realizar observaciones, ya que si el extracto cambia a un pH alcalino vira a una tonalidad morada y se

torna muy inestable.

Además, se realizaron las siguientes determinaciones microbiológicas en el extracto de betalainas de betarraga: conteo de coliformes (totales y fecales *Escherichia coli*) y determinación si existe presencia de *Salmonella*. Se realizó este tipo de evaluación ya que las betalainas son empleadas como aditivos alimentarios por sus propiedades colorantes, por lo que deben ser inocuas para ser empleadas en productos de consumo humano.

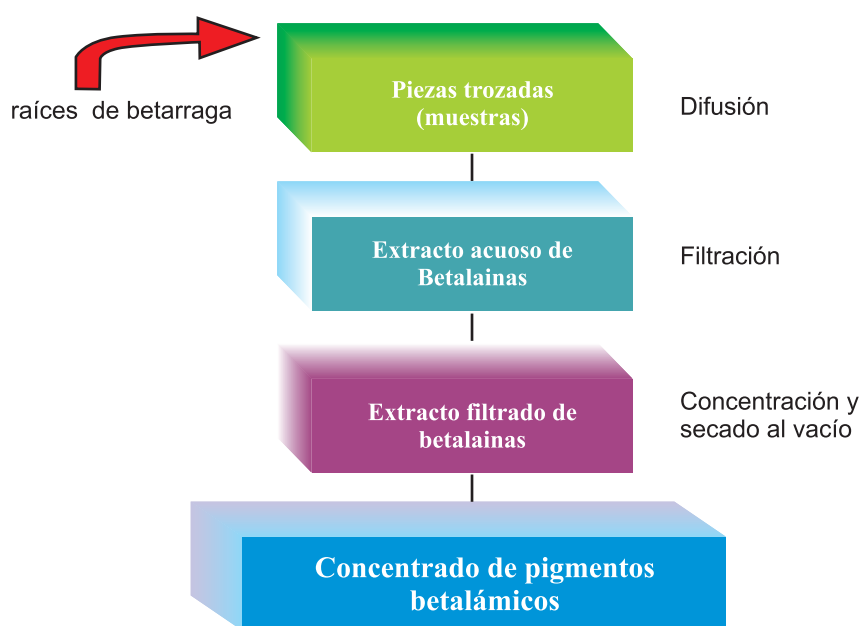


Fig. 1. Diagrama de flujo del proceso para la extracción de pigmentos betalámicos de betarraga.

RESULTADOS

En las **Tablas 2, 3, 4 y 5** se registran los datos de las concentraciones de betalainas de los grupos experimentales por un periodo de 30, 60, 90 y 120 días (tiempo de almacenamiento), observándose que hubo una mayor concentración en el grupo A (4 °C-oscuridad) en todos los periodos de tiempo estudiado así mismo el grupo con menor concentración que fue F (68 °C- 198 lux), acotándose además que si se compara los grupos experimentales donde se aplicó luminosidad (D, E, F) éstos tuvieron menor concentración frente a los grupos a los cuales no se les aplicó la luz (A, B, C). Con respecto a la gráfica que se observa en la **fig. 2**, se obtuvo, empleando las mayores concentraciones de las betalainas de los grupos experimentales por cada intervalo de tiempo, determinando a través de Excel, las ecuaciones respectivas las cuales se expresaron en temperatura de almacenamiento comercial (4 °C

y 25 °C). Con respecto a las determinaciones microbiológicas se observó: ausencia de *Salmonella* y *E. coli* y en conteo de coliformes fue < a 3 MPN g⁻¹ en 25 gramos de muestra, por lo que se considera inocuo y apto para consumo humano.

DISCUSIÓN

Las investigaciones en los pigmentos de tipo betalainas se están dirigiendo al estudio de su estabilidad y degradación, reportándose que dependen de diversos factores, entre los que destacan pH, luz, altas temperaturas, oxígeno y actividad del agua. Su estabilidad está presente en el intervalo de pH 3-7 y se ven afectados al igual que la mayoría de pigmentos naturales por los metales, la temperatura, la presencia de aire y por las radiaciones ultravioleta. El colorante se degrada fácilmente a temperaturas superiores a los 50 °C, particularmente cuando es expuesto a la luz^{13,14,15,16}, como se reportó en

las **Tablas 2, 3, 4 y 5** principalmente en los grupos C y F donde la temperatura fue de 68 °C y presencia de luz (luminosidad: 198 lux).

Esta descomposición se debió principalmente a las reacciones de oxidación que se presentan en los pigmentos naturales cuando son expuestos a factores externos como la luz. Posiblemente, la descomposición acentuada de los pigmentos también se incrementó por haberle aplicado una temperatura elevada al extracto deshidratado, ya que la temperatura también es otro factor importante en la estabilidad de los pigmentos naturales^{16,17}.

En la **fig. 1** se muestra el comportamiento de la concentración del pigmento retenido (mg/g) en función del tiempo de permanencia, para las muestras que se mantuvieron en un pH constante de 4,5 ya que este parámetro no fue causa de estudio en esta investigación; es de importancia monitorearlo ya que el rango de pH óptimo de las betalaínas es de 3-7 fuera de este rango presentan baja estabilidad, mientras que en el presente estudio se tomó como factores variables la presencia o no de luz y las temperaturas. Como era de esperarse, las muestras que se mantuvieron en oscuridad y a 4 °C retuvieron más pigmentos con respecto a las

muestras en presencia de luz y a temperaturas de 25 °C y a 68 °C, lo que concuerda con lo reportado por Herbach *et al* (2006:b y c) para los pigmentos de betalaínas, registrando para el caso de las betacianinas (tipo de betalaínas), que en oscuridad y a 4 °C, se retuvo un 7% más de pigmento^{18,20}.

La pérdida de pigmento por el efecto de la luz se debe a que la radiación electromagnética aceleran las reacciones para que se rompa la estructura de resonancia de los pigmentos, los cuales son responsables de impartir el color rojo que exhiben las betalaínas de la "betarraga"^{12,13,20}.

El efecto de la temperatura en la degradación de los pigmentos también es por la ruptura de resonancia de la estructura de las betalaínas. Esto concuerda con los estudios realizados sobre la estabilidad de betalaínas donde mencionan que tiene su máxima estabilidad a bajas temperaturas como son las temperaturas de refrigeración y/o congelación^{18,20}.

Tenemos a Herbach *et al* (2005) que reportaron el comportamiento del porcentaje de betalaína de pitaya retenido en función del tiempo, para muestras que se mantuvieron a

Tabla 2. Concentraciones de betalaínas en los extractos secos de los grupos A, B, C, D, E y F evaluadas después de un intervalo de tiempo de 30 días y aplicándose los tratamientos correspondientes tanto térmicos como de luminosidad

	A1	A2	A3
B1	70,0 mg/g de extracto seco (A)	65 mg/g de extracto seco (B)	40 mg/g de extracto seco (C)
B2	53,2 mg/g de extracto seco (D)	45,6 mg/g de extracto seco (E)	36,9mg/g de extracto seco (F)

Donde:

A: temperatura: A1:4 °C; A2: 25 °C y A3: 68 °C
B: luminosidad: B1: 0 lux (oscuridad) y B2 198 lux

Tabla 3. Concentraciones de betalaínas en los extractos secos de los grupos A, B, C, D, E y F evaluadas después de un intervalo de tiempo de 60 días y aplicándose los tratamientos correspondientes tanto térmicos como de luminosidad

	A1	A2	A3
B1	68,3 mg/g de extracto seco (A)	62,6 mg/g de extracto seco (B)	30 mg/g de extracto seco (C)
B2	49,2 mg/g de extracto seco (D)	34,6 mg/g de extracto seco (E)	26,9mg/g de extracto seco (F)

Donde:

A: temperatura: A1:4 °C; A2: 25 °C y A3: 68 °C
B: luminosidad: B1: 0 lux (oscuridad) y B2 198 lux

Tabla 4. Concentraciones de betalaínas en los extractos secos de los grupos A, B, C, D, E y F evaluadas después de un intervalo de tiempo de 90 días y aplicándose los tratamientos correspondientes tanto térmicos como de luminosidad

	A1	A2	A3
B1	68,0 mg/g de extracto seco (A)	60,5 mg/g de extracto seco (B)	20 mg/g de extracto seco (C)
B2	38,2 mg/g de extracto seco (D)	27,6 mg/g de extracto seco (E)	17,9mg/g de extracto seco (F)

Donde: A: temperatura: A1 :4 °C; A2: 25 °C y A3: 68 °C
B: luminosidad: B1: 0 lux (oscuridad) y B2 198 lux

Tabla 5. Concentraciones de betalainas en los extractos secos de los grupos A, B, C, D, E y F evaluadas después de un intervalo de tiempo de 120 días y aplicándose los tratamientos correspondientes tanto térmicos como de luminosidad

	A1	A2	A3
B1	67,9 mg/g de extracto seco (A)	57,4 mg/g de extracto seco (B)	20 mg/g de extracto seco (C)
B2	36,2 mg/g de extracto seco (D)	25,8 mg/g de extracto seco (E)	16,7 mg/g de extracto seco (F)

Donde: A: temperatura: A1 :4 °C; A2: 25 °C y A3: 68 °C
B: luminosidad: B1 : 0 lux (oscuridad) y B2 198 lux

***Contenido inicial de pigmentos betalámicos en extracto seco de betarraga sin aplicación de tratamiento: 73,3 mg/g de extracto seco.**

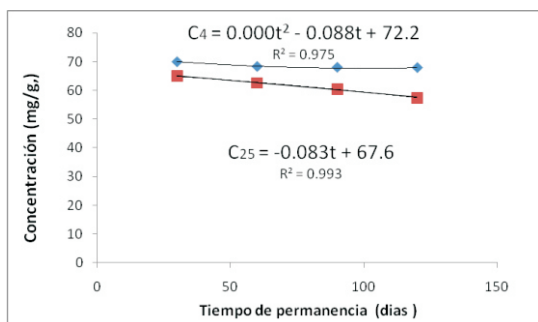


Fig. 2: Concentración de betalainas de acuerdo al tiempo de permanencia en anaquel a temperaturas comerciales (4 y 25 °C).

un pH constante de 5, en ausencia de luz y como factor variable la temperatura (4, 25 y 68 °C)¹⁶. En primera instancia, se encontró que la temperatura fue el factor más determinante en el porcentaje del pigmento retenido en comparación con los otros factores probado (pH y luz), para las betalainas siendo la temperatura de 4 °C la que permitió mantener la estabilidad de los pigmentos. Incluso registraron que a temperaturas de 25 y 68 °C desde la primera semana se empezaron a degradar rápidamente los pigmentos hasta alcanzar valores tan bajos como un 8% de pigmento retenido pero al someterse a los 68 °C. Además las muestras de 25 y 68 °C al final del tratamiento perdieron la coloración roja degradándose a un color amarillo después de más de 15 meses de almacenamiento¹⁷. Contrastando con los resultados obtenidos en el presente estudio, se asemejan en cuanto a que se encontró mayor estabilidad de los pigmentos tanto a temperatura de 4 °C y sin presencia de luz determinándose porque hubo mayor concentración de betalainas (70 mg/g) en el grupo A1 (Tabla 2, 3, 4 y 5) a diferentes tiempos de almacenamiento: 30, 60, 90 y 120 días. La diferencia es que en las muestras donde hubo menor estabilidad de los pigmentos, estos no llegaron a degradarse hasta color amarillo sino permanecieron con la coloración rojiza que los caracteriza en gran parte se debería a que la betarraga, especie con la que se trabajó en esta investigación contiene mayor contenido de



Fig. 3. Extractos acuosos de betarraga, a los 120 días de almacenamiento en condiciones de oscuridad y a 4 °C para el grupo A, se observa una coloración rojiza oscura y para F en el cual las condiciones fueron 68 °C y presencia de luminosidad (198 lux), donde se observa una coloración rojo claro

betalainas que la pitaya.

Al analizar en forma conjunta los dos factores estudiados se encontró que la conjunción de los factores: temperatura –presencia de luz, son los determinantes en la estabilidad de los pigmentos tipo betalainas presentes en el extracto seco de betarraga. Por lo que las mejores condiciones para mantener su estabilidad consisten en mantener una temperatura de 4 °C y de preferencia en ausencia de luz.

CONCLUSIONES

Se determinó que hay mayor estabilidad de betalainas de extracto seco de “betarraga” a una temperatura de 4 °C y en ausencia de luz. El incremento de temperatura por encima de los 25 °C, produce disminución de la estabilidad teniendo a los 68 °C y en presencia de luminosidad (198 lux) una concentración de 40

mg/g de extracto seco en un intervalo de tiempo en estante de 30 días.

A medida que se incrementa el tiempo en estante o anaquel del extracto de "betarraga", disminuye la concentración de betalaínas.

Para un tiempo de permanencia en anaquel de 90 días, las condiciones de 4 °C y en oscuridad, el extracto de betarraga no sufre alteración significativa respecto a un tiempo de permanencia de 60 días presentando una merma de 0,44 %; en cambio a condiciones de 68 °C y presencia de luz, el producto sufre una significativa merma del orden de los 73,7% de concentración de betalaínas.

A un tiempo de permanencia en anaquel de 120 días del extracto de betarraga a condiciones de 4 °C y oscuridad disminuye en un 3% respecto al tiempo de permanencia del extracto a las mismas condiciones pero evaluada a los 30 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brennan J; Butters J. Cowell, N. Las Operaciones de la Ingeniería de los Alimentos. Tercera Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1998.
- Casp A, Abril J. Procesos de Conservación de Alimentos. Ediciones Mundi Prensa. España. 1999.
- Fellows M. Tecnología del Procesado de Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1994.
- Ficha Técnica de Industrialización de Frutas en Conserva. Dirección de Mercadeo y Agroindustria - Área Desarrollo de Producto. Disponible en: http://www.mercanet.cnp.go.cr/Desarrollo_Agroid/documentospdf/Conservas_FTP.pdf
- Potter N. La Ciencia de los Alimentos. Editorial Edutex. México. 1973.
- Lock O. Colorantes Naturales. Fondo. Edit. Pontifica Universidad Católica el Perú. Lima - Perú. 1997.
- Singh R P, Heldman DR. Introducción a la Ingeniería de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 1997.
- Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ICTA. Empleo en la deshidratación osmótica en frutas. 2004. Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006228/teoria/obfrudes/p3.htm>
- García Barrera FA, Reynoso CR, González de Mejía E. Estabilidad de las betalainas extraídas del garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Sci Technol Int* 1998; 4:115-20.
- Hamburg A, Hamburg M. The stability properties of red beet pigments: influence of pH, temperature and some stabilizers. *MedFacLandbouww Univ Gent* 1991 ; 56:1693-1695.
- Kujala T; Lopenen J, Pihlaja K. Betalains and phenolics in red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extracts: extraction and characterisation. *Z. Naturforsch.* 2001; 56 (5-6): 343-348.
- Han D, Kim SJ, Kim SH, Kim DM. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *J Food Sci* 1998; 63:69-72.
- Havlí'kov'aL, M'íkov'aK, KyzlinkV. Heat stability of betacyanins. *ZLebensmUnters Forsch* 1983;177:247-250.
- Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J Food Sci* 2004a.; 69: 491-498.
- Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. *Eur Food Res Technol* 2004b; 219:377-385.
- Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spectrom* 2005; 19:2603-2616.
- Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hylocerenin solutions. *J Agric Food Chem* 2006a; 54: 390-398.
- Herbach KM, Maier C, Stintzing FC, Carle R. Effects of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *Eur Food Res Technol* 2006b; 42: 180-188.
- Braúl VE. Investigación de los parámetros operativos térmicos en la conservación de la pulpa de mango con fines industriales. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 1994.
- Herbach KM, RoheM, Stintzing FC, Carle R. Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Res Int* 2006c; 39:667-377.

Correspondencia:

José Luis González Sánchez.

Dirección:

Las Gaviotas 1245 Urb. Los Pinos. Trujillo.

Teléfono:

949595600

E-mail:

jogulosa@hotmail.com

Efecto del probiótico *Bifidobacterium bifidum* sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en helado

Effect of probiotic Bifidobacterium bifidum on the survival of Listeria monocytogenes in ice cream

**Mercado-Martínez, Pedro¹; Villanueva-Carrasco, Gabriela¹;
Mendoza-Mariños, Tania**

RESUMEN

Listeria monocytogenes puede contaminar los alimentos que se conservan en refrigeración e inclusive crecer a estas temperaturas. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto probiótico de *Bifidobacterium bifidum* sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en helado. Se establecieron cuatro sistemas, tres de control y un problema donde se inoculó ambas bacterias en unidades de muestras de 300 g de helado a una concentración final de 1×10^6 UFC/g. Se conservaron en refrigeración (4° C) y evaluó la supervivencia de *Listeria monocytogenes* a los 0; 5; 10; 15; 20 y 30 días, mediante recuento de UFC/g. Se encontró que *Bifidobacterium bifidum* aumenta su población de 10^6 a 10^7 , hasta los 30 días de evaluación y *Listeria monocytogenes* disminuye hasta en cuatro logaritmos, de 10^6 a 10^2 , en el mismo tiempo de evaluación. Se concluye que *Bifidobacterium bifidum* posee acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en helado y que la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* no se ve afectada en este producto, pudiendo constituirse como alternativa para proteger a los alimentos refrigerados que podrían estar contaminados con *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Probióticos, *Bifidobacterium bifidum* y *Listeria monocytogenes*, helados.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes can contaminate food stored in refrigeration and even grow at these temperatures. Therefore, this study was to evaluate the effect of probiotic *Bifidobacterium bifidum* on the survival of *Listeria monocytogenes* in ice cream. We developed four systems, three control and an issue where both bacteria inoculated in units of 300 g samples of ice cream at a final concentration of 1×10^6 UFC/g. Stored in refrigeration (4 ° C) and evaluated the survival of *Listeria monocytogenes* at 0, 5, 10, 15, 20 and 30 days, by counting UFC/g. *Bifidobacterium bifidum* was found to increase its population of 10^6 to 10^7 , up to 30 days for evaluation and *Listeria monocytogenes* in up to four log decrease, from 10^6 to 10^2 , at the same time of evaluation. It was concluded that *Bifidobacterium bifidum* has inhibitory action on growth of *Listeria monocytogenes* in ice cream and the viability of *Bifidobacterium bifidum* not affected in this product may become an alternative to protect refrigerated food may be contaminated with *Listeria monocytogenes*.

Key words: Probiotics, *Bifidobacterium bifidum*, *Listeria monocytogenes*, ice cream.

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNT

² Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. UNT.

Presentado el 17.12.2009, aceptado el 20.07.2011.

INTRODUCCIÓN

En la flora intestinal humana existen más de 400 especies de microorganismos que conviven en armonía sintetizando vitaminas, sustancias beneficiosas, contribuyendo a la absorción de nutrientes, favoreciendo el metabolismo colónico de la fibra, mejorando la digestibilidad, neutralizando sustancias potencialmente patógenas; el intestino ofrece sustratos y las condiciones para su desarrollo permitiendo así que la flora promueva una mejor función intestinal¹.

Además, son funciones de la flora intestinal limitar el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos en el intestino e interactuar con sustratos no absorbidos de la dieta. Sin embargo, es vulnerable a determinadas condiciones, como la inmunosupresión, infecciones intestinales y antibacterianos aplicados. En los adultos varía notablemente ya que dependen de varios factores como la edad, la alimentación, los genes, el medio que habita, tratamientos con antibióticos, estrés, infecciones, intervenciones quirúrgicas en estómago o intestino, enfermedades hepáticas, renales, cáncer^{2,3}.

El ácido gástrico y el flujo peristáltico normal del intestino delgado limitan la población bacteriana del tracto gastrointestinal alto. El intestino delgado es una zona de transición entre el estómago y el colon, en él se produce una transición gradual de la flora Gram-positiva a una población Gram-negativa. Esta flora varía según el segmento intestinal y por sí misma no produce alteraciones, constituyendo un verdadero cultivo autorregulable⁴.

Hay dos tipos de flora intestinal: la flora residente o autóctona y la pasajera o transitoria. La primera se adhiere a las células epiteliales de la mucosa, son microorganismos fijos que se multiplican con rapidez, que están bien adaptados y son estables e inofensivos. La flora pasajera no se fija al epitelio ni se establece en el intestino y está formada por los microorganismos no patógenos procedentes de la porción superior del tubo digestivo, los alimentos y el medio ambiente⁵.

Existen ciertas características propias de la microflora colónica en las que predominan las bifidobacterias; esta microflora produce ácidos grasos de cadena corta, como el ácido pirúvico, oxalacético, cetoglutárico y ácido láctico como producto de la fermentación de los carbohidratos, que disminuyen el pH en el colon creando un medio donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse. También producen las llamadas bacteriocinas, que actúan como antibióticos e inhiben a las bacterias patógenas, estimulan al sistema inmune, especialmente el intestinal y la capacidad de sintetizar algunas vitaminas del

complejo B⁶.

Los procesos infecciosos y específicamente la diarrea infecciosa aumentan la frecuencia de daños en la mucosa y disminuye de la motilidad intestinal, constituyendo pérdida de una de las funciones más importantes para el control de la proliferación bacteriana. El sobrecrecimiento de bacterias patógenas en el tracto intestinal produce un mecanismo de reparación defectuoso en la mucosa intestinal la cual tiene mecanismos de defensa que discriminan adecuadamente entre la flora comensal, la simbiótica y los patógenos exógenos⁷.

Tener una flora estable y bien equilibrada es garantía de buena salud ya que evita la colonización y el sobredesarrollo de microorganismos patógenos mediante mecanismos tales como la competencia y la síntesis de bacteriocinas. El desequilibrio de la flora puede prevenirse con la administración de cultivos microbianos vivos, estos cultivos se llaman probióticos⁷.

Un cultivo probiótico, está constituido por aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino del huésped⁸.

Son múltiples los efectos beneficiosos que han sido atribuidos a la administración de probióticos, tales como el restablecimiento del ecosistema intestinal post-terapia antibiótica y quimioterapia, modulación del sistema inmune, estabilización de la enfermedad de Crohn y protección de la mucosa intestinal; mejoramiento de la intolerancia a la lactosa; reducción del riesgo de constipación; tratamiento de la diarrea; entre otros. También se atribuyen efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de las alergias; la reducción de los niveles de colesterol; participan en la producción de vitaminas, como la vitamina B; favorece el peristaltismo intestinal; potencia la incorporación de sales minerales como el calcio^{9, 10, 11}.

Los microorganismos más utilizados como probióticos son las bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, comensales del tracto gastrointestinal que son tradicionalmente utilizadas en diversas fermentaciones alimentarias. Las cepas del género *Bifidobacterium* son particularmente importantes ya que colonizan selectivamente el tracto intestinal de los recién nacidos, representando hasta el 91% de su flora, y en adultos entre el 3 y el 7%. Estas bacterias anaeróbicas constituyen un 91% de la flora predominante de los niños alimentados con leche materna y por el contrario, el intestino de niños alimentados con fórmulas infantiles está colonizado por una microbiota más heterogénea (*Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, etc.)^{12, 13}.

También conocidas como Bacterias Ácido Lácticas (BAL), los *Bifidobacterium* producen bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antimicrobiana. Esta actividad representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios tóxicos. Existen numerosas bacteriocinas, clasificadas en clases I, II y III, siendo las más representativas: la Nisina, Pediocina, Plantarinas, Divergicina A, Helveticina J, producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares; esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y listerias, respectivamente¹⁴.

Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las BAL examinadas, y aún dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos. La producción de bacteriocinas se detectó en *B. bifidum* NCFB 1454 y, posteriormente, en otras cepas aisladas de heces de niños, aunque éstas resultaron ser activas exclusivamente frente a bacterias grampositivas. Los últimos estudios indican, no obstante, que ciertas cepas aisladas de heces de adultos y niños son capaces de sintetizar proteínas antimicrobianas de amplio espectro, activas frente a bacterias grampositivas, gramnegativas y levaduras. Entre éstas se incluyen a importantes patógenos gastrointestinales, como *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli* y *Acrobacter butzleri*^{15,16}.

Entre las bacterias probióticas más utilizadas para el consumo humano se encuentran las BAL, que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *raimnosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, entre otros^{17,18}.

Algunas bifidobacterias aisladas de heces de niños producen péptidos antimicrobianos activos frente a *L. monocytogenes* y sólo se ha purificado una bacteriocina (Bifidocina B) de *B.*

bifidum NCFB 1454, que posee un espectro de inhibición restringido a bacterias Gram-positivas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que algunas cepas del género *Bifidobacterium*, así como sus productos metabólicos, adicionados en forma de extractos sin purificar, actúan como inhibidores del desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en alimentos y bebidas. Es decir, actúan como cultivos bioprotectores en alimentos. Las bifidobacterias crecen y se mantienen viables en diversos alimentos y bebidas constituyendo, por tanto, vehículos idóneos para su aporte. Por ejemplo, en las leches fermentadas y no fermentadas se comprobó su capacidad para secretar compuestos antimicrobianos al medio de cultivo durante su crecimiento^{8,15,16}.

En el caso del género *Bifidobacterium*, se considera que esta bacteria es importante para el mantenimiento del equilibrio del ecosistema intestinal y el desplazamiento de microorganismos potencialmente perjudiciales, por lo que se le atribuye una función protectora. Se considera que cepas de este género ejercen efectos beneficiosos en el tratamiento de la diarrea del viajero, las infecciones por rotavirus y la diarrea asociada al uso de antibióticos¹⁷. También se han descrito sus efectos antagónicos frente a patógenos de los géneros *Clostridium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Proteus*, y *Escherichia*¹⁵.

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad. Las colonias son pequeñas (de 1-2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37 °C, pero pueden crecer a 4 °C en pocos días. Son anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas; además hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni sulfuro de hidrógeno (H₂S); sin embargo producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares¹⁸.

El género *Listeria* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, puede encontrarse en el suelo, en los vegetales y formando parte de la flora fecal de muchos mamíferos; siendo capaz de sobrevivir a diversas condiciones ambientales. Asimismo, se ha aislado de vegetales crudos, leche, pescado, pavo y carne ya sea fresca o procesada bien sea de pollo o res. Dentro de este género existen 7 especies donde las especies *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* se consideran patógenas; sin embargo, la primera se encuentra asociada únicamente con infección en animales, mientras que la segunda se relaciona tanto con

infección en animales como en humanos¹⁹.

L. monocytogenes es de interés en salud pública ya que causa listeriosis, una infección que provoca meningitis, septicemia, abortos, infecciones gastrointestinales; además del desarrollo de secuelas, como retardo psicomotor en las personas infectadas. La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas), sumados a otros factores que pueden aumentar la susceptibilidad. El período de incubación de la infección invasiva es desconocido pero se cree que va de 11 a 70 días con un promedio de 31 días²⁰.

La dosis mínima requerida de *L. monocytogenes* para causar infección clínica en humanos no ha sido determinada, pero se estima niveles de contaminación de 10^2 a 10^4 células por gramo de alimento. Sin embargo, la dosis infectiva varía dependiendo de la patogenicidad y virulencia de la cepa involucrada y de los factores de riesgo del hospedero²¹.

El helado constituye uno de los triunfos de la tecnología de alimentos, y el aire es uno de sus principales ingredientes. Sin el aire, el helado sería una nieve de leche, pero con el aire se convierte en un sistema coloidal de alta complejidad. Consiste en una espuma semisólida de celdas de aire rodeadas por grasa emulsificada junto con una red de diminutos cristales de hielo que están rodeados por un líquido acuoso en forma de sol. En su forma más simple, el helado o crema helada es un postre congelado hecho de leche, nata o natillas combinadas con saborizantes, edulcorantes y azúcar. En general los productos utilizados en su elaboración son: leche, azúcar, edulcorantes, nata de leche, huevo, frutas, chocolate, frutos secos, yogurt, agua mineral y además, estabilizantes, que ayudan a su preservación evitando la proliferación de microorganismos contaminantes²².

En la actualidad el uso de probióticos es importante para mejorar la respuesta inmune a bacterias patógenas, por lo que en el presente trabajo se determinó el efecto de *Bifidobacterium bifidum* sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* inoculados conjuntamente en helado pasteurizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico

- Un cultivo de *Bifidobacterium bifidum* liofilizado importado del Laboratorio Saccor SRL de Italia.
- Un cultivo de *Listeria monocytogenes* Lm002-09-FGB-UNT, proporcionado por el

Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

- Helado de sabor fresa comercializado por la fábrica Aruba E.I.R.L Trujillo-Perú, preparado para el presente trabajo sin preservantes.

2. Métodos y Técnicas:

2.1. Reactivación y estandarización del inóculo de *L. monocytogenes*

- Reactivación del cultivo de *L. monocytogenes*.

A partir del cultivo, conservado en congelación (con glicerina 50% a -10°C), de *L. monocytogenes*, se cultivó en Caldo de Enriquecimiento Base *Listeria* (LEB), e incubado a 37°C por 24 – 48 horas, luego se sembró en Agar Base *Listeria* Oxford y se incubó a 37°C por 24 horas.

- Estandarización del inóculo de *L. monocytogenes*.

Se preparó 20 mL de suspensión bacteriana en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) de 3×10^8 UFC/mL equivalente al tubo N°1 del nefelómetro de Mac Farland.

2.2. Reactivación y estandarización del inóculo de *B. bifidum*.

- Reactivación del cultivo de *B. bifidum*.

A partir del cultivo liofilizado comercial se cultivó en caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS), luego se incubó en microaerobiosis con ambiente de CO_2 por 48 horas a 37°C . Después se sembró en placas con Agar MRS y se incubó igualmente en microaerobiosis con ambiente de CO_2 por 24 horas a 37°C , mediante método de la vela, más un sobre de antiácido "Alka seltzer"

- Estandarización del inóculo de *B. bifidum*.

Se preparó 20 mL de suspensión bacteriana en SSFE de 3×10^8 UFC/mL equivalente al tubo N°1 del nefelómetro de Mac Farland.

2.3. Distribución del helado

Se distribuyó en 40 potes de plástico, a razón de 10 de 300g; 20 de 299 g y 10 de 298 g. Todos los potes fueron pasteurizados en baño maría a 90°C por 2 min, enfriados a temperatura ambiente.

2.4. Diseño experimental

Se prepararon 4 sistemas de 10 potes de helado, de acuerdo al siguiente esquema:

- Sistema 1: control, solo helado sin la adición de ningún cultivo para evaluación de presencia de mesófilos o psicrófilos aeróbicos.
- Sistema 2: control, se adicionó solo la suspensión de *B. bifidum*.
- Sistema 3: control, se adicionó solo la suspensión de *L. monocytogenes*
- Sistema 4: problema, se adicionó *B.*

bifidum y *L. monocytogenes*

2.5. Inoculación de *B. bifidum* y *L. monocytogenes*:

Con ayuda de una jeringa se procedió a inocular 1mL de las suspensiones bacterianas en cada uno de los potes de helado, de acuerdo al esquema de ensayo. Se homogenizó el inóculo con el helado y luego cada sistema se colocó en refrigeración (4°C) para su posterior evaluación.

2.6. Medición de la Poblaciones:

Las poblaciones de *B. bifidum* y *L. monocytogenes* fueron determinadas por recuento total de unidades formadoras de colonias por gr (UFC/g) en cada uno de los sistemas mencionados utilizando un pote diferente por medición. Estas poblaciones se monitorearon por duplicado a los 0 (inicial), 5, 10, 15, 20 y 30 días.

2.7. Recuento total de *B. bifidum*.

Para el recuento de *B. bifidum*, se realizó diluciones decimales seriadas tomando 0,1 mL de estas para sembrar por superficie con asa de Drigalski en placas con Agar MRS suplementado con antibióticos y se incubaron en microaerobiosis con ambiente de CO₂ por 24 horas a 37° C. La lectura se realizó en aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

2.8. Recuento de *L. monocytogenes*:

Se realizó utilizando las diluciones decimales seriadas tomando 0,1 mL de

estas para sembrar por superficie con asa de Drigalski en placas con Agar Base Listeria Oxford Modificado con suplemento de antibióticos. Posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas. La lectura se realizó en aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

3. Análisis de los resultados

Se utilizó el promedio de las mediciones como valor final para interpretar los resultados. Los recuentos de crecimiento obtenidos (UFC/g) fueron sometidos a la distribución por cuantiles. La comparación de los grupos experimentales con el grupo testigo se realizará con la prueba T student²³.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se observa que *L. monocytogenes* sin *Bifidobacterium bifidum* disminuye un logaritmo en su crecimiento, mientras que en presencia del probiótico *Bifidobacterium bifidum* disminuye hasta 4 logaritmos, observándose diferencia significativa entre ambos crecimientos.

En la Fig. 2 se observa que *B. bifidum* presenta crecimiento, tanto solo como en presencia de *L. monocytogenes* sin diferencia significativa entre ambos crecimientos.

En la Fig. 3 se observa que la supervivencia de *L. monocytogenes* en presencia de *B. bifidum*, disminuye significativamente en relación al tiempo.

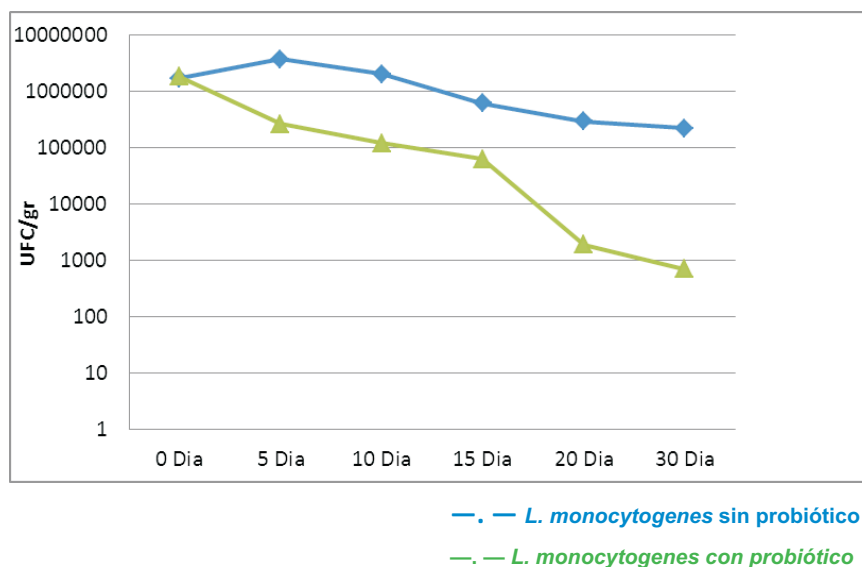


Fig. 1. Supervivencia de *L. monocytogenes* en el sistema 3 de control (sin probiótico) y en el sistema 4 (con probiótico) a través del tiempo

* Prueba T: Si hay diferencia significativa ($T_c = -1,69 < T_t = 2,23$); Proyección $Y=0$ para X problema: 35 días y para X control: 72 días

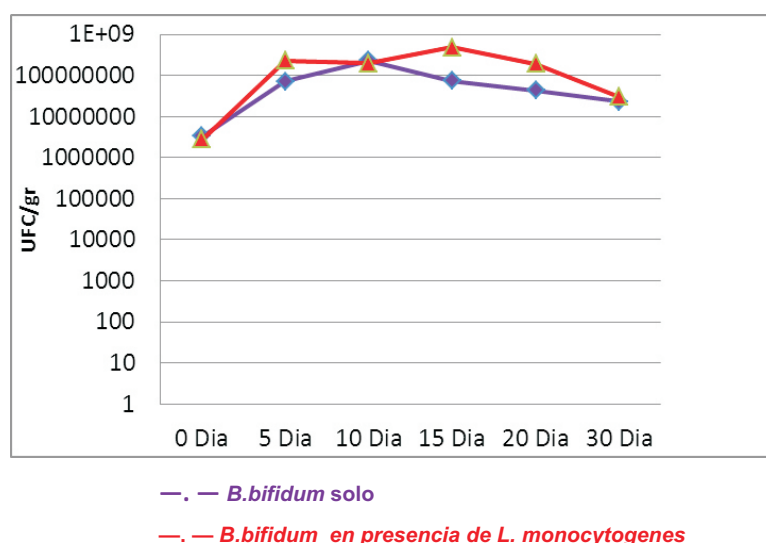


Fig. 2. Supervivencia de *B. bifidum* solo y en presencia de *L. monocytogenes* en relación al tiempo
 * Prueba T: No hay diferencia significativa (Tc=-2,89 Tt=2,23)

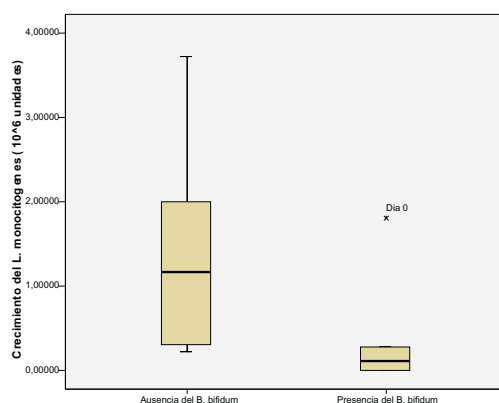


Fig. 3. Distribución cuartil del crecimiento *L. monocytogenes* en helado en ausencia y presencia de *B. bifidum* en relación al tiempo

DISCUSIÓN

Diversos trabajos científicos han evaluado el efecto de cultivos probióticos sobre el crecimiento de bacterias patógenas entéricas, obteniéndose resultados diversos pero que identifican claramente la acción antagónica de especies de probióticos sobre microorganismos patógenos.

En la Fig. 1, se muestra el comportamiento de *L. monocytogenes* en helado solo y en presencia del probiótico adicionado. Una concentración inicial de *L. monocytogenes* de 10⁶ UFC/g es reducida a 10² UFC/g en el tiempo de 30 días en presencia de *B. bifidum*. Esta misma población disminuye solo un logaritmo cuando está solo en el helado, en mismo tiempo.

Esto nos indica que el probiótico *B. bifidum* ha actuado antagónicamente sobre el crecimiento *L. monocytogenes*. Datos similares fueron obtenidos por Zúñiga y colaboradores¹⁶, donde *L. monocytogenes* fue inoculada a una concentración de 10⁷ UFC/mL en leche fermentada con cultivo iniciador para yogurt (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*), disminuyendo en pocas horas y desapareció al cabo de 32 días.

Es necesario destacar que la acidez del medio es un factor importante en el control del crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos en ambientes ácidos. No obstante, en el presente trabajo, el pH de los sistemas mostró muy leves modificaciones a través del tiempo de incubación (de 7 a 6 para los sistemas evaluados), los cuales, probablemente, no

afectaron el crecimiento de *L. monocytogenes*, ya que ésta bacteria es capaz de crecer en ambientes de pH mucho más ácido^{14,15}.

L. monocytogenes es una bacteria que ha demostrado su resistencia tanto a pH ácido, así como su capacidad de multiplicación a bajas temperaturas. Así tenemos diversos estudios que revelan que ésta puede crecer en un ámbito de pH entre 5,0 y 9,6, siendo su pH óptimo de crecimiento alrededor de 7,0, aunque le favorece una ligera alcalinidad¹⁴.

Por su parte, Brackett⁹ establece que el ámbito de pH en el cual *L. monocytogenes* puede crecer es de 5,6 a 9,8. Es importante destacar que Sorrels et al¹³ reportaron que la bacteria puede crecer a pH 4,4, un valor considerablemente inferior de lo anteriormente reportado. Por otro lado, Gahan et al¹⁵ reportan la adaptación de esta bacteria a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante (ATR), logrando inclusive sobrevivir a pH de 3,8. Del mismo modo los estudios realizados por Arias et al¹⁷ en leche pasteurizada inoculada con este patógeno demuestran que posee una importante resistencia a bajas temperaturas y es capaz de reproducirse a pH ácido.

Al comparar los resultados obtenidos con un trabajo anterior realizado con la misma metodología, pero evaluando el efecto de probióticos sobre *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7¹⁸, se encontró que la primera bacteria desaparecía luego de 8 días de incubación en el sistema con probióticos adicionados, pero en el sistema sin probióticos se necesitó de 16 días para desaparecer. La diferencia de actividad de los probióticos, específicamente de sus bacteriocinas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas^{19, 20}, demuestran una menor sensibilidad dada la presencia de membrana externa y la constitución de su pared celular²¹.

La producción de bacteriocinas se detectó por primera vez en *B. bifidum* NCFB 1454 y posteriormente en otras cepas, aunque éstas resultaron ser activas exclusivamente frente a bacterias grampositivas^{24, 25}. Estudios indican, no obstante, que ciertas cepas son capaces de sintetizar proteínas antimicrobianas de amplio espectro activas frente a bacterias grampositivas, gramnegativas y levaduras. Entre éstas se incluyen importantes patógenos gastrointestinales, como *C. difficile*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. entérica* serovar *Typhimurium*, *H. pylori*, *Campylobacter coli* y *Arcobacter butzleri*^{21,24}.

Esta diferencia de comportamiento de las bacteriocinas puede ser debida al efecto de las diversas sustancias producidas por las bacterias acidolácticas además de las

bacteriocinas, como ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono; así como la producción de otros compuestos antimicrobianos como el diacetilo, el ácido piroglutámico, etc.⁶. Se ha comprobado que el diacetaldehído es más efectivo contra bacterias Gram negativas, levaduras y hongos que contra bacterias Gram positivas²¹.

Debe resaltarse que el número inicial de bacterias probióticas inoculadas fue de 10⁶ UFC/mL y aumentó hasta en dos logaritmos tanto a los 10 días, cuando está solo, y a los 15 días, cuando está en presencia de *L. monocytogenes*, finalizando con el aumento de un logaritmo, en relación al inicial, a los 30 días. Estos resultados, son los recomendados por la Organización Mundial de la Salud como la cantidad necesaria para que ejerzan sus efectos beneficiosos sobre nuestro organismo, a pesar de la reducción que sufren al pasar por la barrera de la acidez estomacal¹¹.

En el sistema control, sin inoculación de ninguna bacteria, no se observó crecimiento alguno de *L. monocytogenes* ni de *B. bifidum*, ni de otra bacteria aerobia mesófila; lo que nos dice que estos microorganismos no están presentes originariamente en el helado utilizado, ya que podrían haber sido eliminados por completo en nuestra pasteurización; y que en transcurso del tiempo de evaluación no fueron contaminadas con alguna otra bacteria, por lo tanto no hay interferencia con nuestros resultados.

CONCLUSIONES

Existe acción inhibitoria del probiótico *B. bifidum* sobre la supervivencia de *L. monocytogenes*, contaminado artificialmente en helados, en relación al tiempo.

La supervivencia de *B. bifidum* no es afectado durante 30 días en el helado ni por la presencia de *L. monocytogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro, L. A. y Rovetto, C. Probióticos: utilidad clínica. Cali, Colombia. Revista de enfermedades endémicas. 2005. 10(5): 170-175
2. López, M. y Domingo, D. Antibiótico terapia con prebióticos. Revista Española de Quimioterapia. 2007. 20 (2): 170-181.
3. Heller, S. Microflora del tracto gastrointestinal en el niño. Simposio sobre Utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Revista de Enfermedades Infecciosas en ediatría. 1998. 11(6): 179.
4. Suárez, L; Perdomo, M. y Escobar H.

- Microflora bacteriana y ecosistema intestinal. Fisiopatología del intestino delgado contaminado. Diarrea aguda. Medio Ambiente en España. GEN. 1994. 48 (2): 61-64.
5. Arbo, A. y Santos, J. Diarrheal diseases in the immunocompromised host. *Pediatric Infect Dis J.* 1987. 6: 894-906.
 6. Ouwehand, A; Tuomola, E; Tolkkio, S y Salminen, S. Assessment of adhesion properties of novel Probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol.* 2001. 64: 119-126.
 7. Berrocal, D; Arias, M. y Henderson, M. Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 2002. 52 (4): 375-380.
 8. Harmsen, P. Analysis of intestinal flora development in breast-feed and formula-feed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.* 2000. 30: 61-67
 9. Bracket, R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech.* 1988. 42: 162-164.
 10. Robaek, S; Johansson, M. y Molin, S. Alteration of intestinal microflora in associated with reduction in abdominal bloating and pain with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterology.* 2000. 95: 1-8.
 11. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol.* 1999. 65: 3763-3766.
 12. González, B; Treviño, M. y Jiménez, Z. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN.* 2003. 4: 99-106
 13. Sorrells, K; D, Enigl y Hatfield, J. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 1989. 52: 571-573.
 14. Donnelly, C. y Briggs, E. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot.* 1986. 49: 994-998.
 15. Gahan C, B; Driscoll, O y Hill, C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Food Tech.* 1996. 62: 3128-3132.
 16. Zúñiga, A; A, López-Merino y L, Mota de la Garza. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en leche fermentada con un cultivo iniciador para elaborar yogur. *Rev Lat Microbiol.* 1995. 37: 257-265.
 17. Arias, M; Monge, R; Antillón, F. y Chaves, C. Effect of storage temperature on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a Neotropical environment. *Rev Biol Trop.* 2001. 42: 517-524.
 18. Barrantes, X; Raileyl, D; Arias, M. y Chaves, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos de dos diferentes marcas de yogurt comercial sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Arch Latinoamer Nutr.* 2003. 109: 6.
 19. Jack, R; Tagg, J y Ray, B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microb. Rev.* 1995. 59: 171-200.
 20. Kalchayananel, N; Itanilin, M y Ray, B. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin Acti and nisin. *Lett Appl Microbiol.* 1992. 15: 239-243.
 21. Naidu, A. Probiotics spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Rev. Food Science Nut.* 1999. 38: 13-126.
 22. Mantello, S. Helados: Estadísticas de consumo a nivel mundial. Disponible en: <http://www.mundohelado.com/helados/estadisticas.htm>.
 23. Montgomery, D. Diseño de Análisis de Experimentos. 2003. 2ª ed. Edit. Limusa. E.E.U.U.
 24. Hurts, A. Adv. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *Appl Microbiol.* 1981. 27: 85-123.
 25. Ray, B y Daeschel, M. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC press, Ing. Boca Ratón, Florida. 1992. 17: 125-132.
- Correspondencia:**
Pedro Mercado Martínez
Dirección:
Av. Juan Pablo II s/n Ciudad Universitaria
Teléfono:
231864
Email:
peemercado_1@hotmail.com

Efecto musculotrópico uterina del decocto de *Nasturtium officinale* en *Rattus rattus* var. albinus in vitro

Uterine muscle tropism's effect of water decoction's Nasturtium officinale of Rattus rattus var. albinus in vitro.

Castillo-Saavedra Ericson¹; Castillo-Viera, Segundo²; Reyes-Alfaro, Cecilia³.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objeto demostrar el efecto musculotrópico in vitro de *Nasturtium officinale* en útero de *Rattus rattus* var. albinus, para esto se preparó el decocto de las hojas y tallos frescos de *Nasturtium officinale*, y fue ensayado en útero de *Rattus rattus* var. albinus; se utilizaron 20 ratas hembras prepúberes todas ellas ovariectomizadas, separándolas en cuatro grupos, animales sin tratamiento hormonal y animales con tratamiento hormonal con dosis de deposito. Las respuestas contráctiles fueron comparadas con el basal, con las de oxitocina y con las fases pre-oxitocina y post-oxitocina, encontrándose acción musculotrópico uterina en *Rattus rattus* var. albinus, inclusive mayor frente a oxitocina y dependiente del estado hormonal.

Palabras clave: *Nasturtium officinale*, efecto musculotrópico.

ABSTRACT

The following scientific report have investigated the contractile effect of *Nasturtium officinale* about the uterine muscle of *Rattus rattus* var. albinus in vitro, with this propose, it was prepared the water decoction dosage with leafs and stalks of *Nasturtium officinale*, and tested about the uterus de *Rattus rattus* var. albinus, it was worked with 20 prepubers females rats, they were oophorectomized and they were located in 4 groups, animals without hormonal treatment and with hormonal treatment with depot doses. The contractile responses the uterus was compared with the basal, with the oxitocin and with the phase post and pre oxitocin, it was encountered that water decoction's *Nasturtium officinale* have uterine muscle tropism's effect, this effect is better than oxitocin and it depend of hormonal treatment.

Key Words: *Nasturtium officinale*, muscle tropism's effect.

¹ Universidad Católica Los Angeles de Chimbote y Universidad César Vallejo.

² Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. UNT. Perú.

³ Hospital Regional Docente de Trujillo.

INTRODUCCIÓN

Los cambios cíclicos y regulares que se presentan en el sistema reproductor femenino funcional, tienen por finalidad la preparación del organismo para los eventos de fecundación y gestación. Los reguladores del ciclo ovárico y estral son las hormonas estrógenos y progesterona principalmente, que varían sus niveles en las diferentes fases del ciclo, las cuales se hallan sujetas al control hipotálamo – hipofisiario, haciendo un eje de integración con los órganos de la reproducción^{1,2,3,4}.

En los mamíferos los ovarios constituyen la principal fuente de producción de esteroides: Los estrógenos son secretados por las células de la teca y estroma ovárico y, progesterona por el cuerpo lúteo en la fase secretora del ciclo. Durante el embarazo, sin embargo, la placenta pasa a ser la fuente más importante de producción de estrógenos y secreta grandes cantidades de progesterona, en especial en la segunda mitad de la gestación³.

Los estrógenos incrementan la respuesta uterina a la oxitocina, hormona neurohipofisiaria asociada al evento del parto en tanto que la progesterona disminuye sensibilidad del útero ante ésta, lo cual ayuda a evitar la expulsión del huevo implantado y el mantenimiento del feto^{5,6}. En el embarazo a término y durante el puerperio se incrementa la sensibilidad a la oxitocina, lo cual concuerda con su papel funcional de facilitar y estimular la contracción uterina posparto que controla la hemorragia uterina. La oxitocina ejerce una acción dual: uterotónica en células miometriales y, acción liberadora de prostaglandinas en las células endometriales⁷.

La progesterona produce los cambios prostaglandínicos en el endometrio y los cíclicos en el cuello uterino y vagina. Tiene un efecto antiestrogénico sobre las células del miometrio que hace decrecer su excitabilidad, su sensibilidad a la oxitocina y su actividad eléctrica espontánea, mientras que se eleva su potencial de membrana⁸.

El mecanismo mediante el cual las hormonas toman parte en el desencadenamiento de las contracciones uterinas durante el parto, es bastante complejo y para esclarecerlo se han planteado varias hipótesis, una de la cuales sería la apertura de un tipo de canal permeable al ión calcio operado por un receptor, que se activaría tras el acoplamiento de una molécula de hormona. Otra alternativa sería la activación de la fosfolipasa C presente en la membrana que originaría la hidrólisis del fosfoinositol difosfato (PIP₂) generando un segundo mensajero el inositol trifosfato (IP₃) que viaja al retículo sarcoplasmático, se une a su receptor específico en su membrana y apertura canales de calcio de ese organelo determinando la fuga del ion hacia el citosol⁴. Mediante un mecanismo similar se produciría la activación de la adenilato ciclasa de la membrana generando adenosin monofosfato cíclico (AMP_c) cuya concentración influye en la potencia de la contracción⁹.

Estos mecanismos conducen a un incremento de la concentración de calcio mioplasmático señalando como responsable

del desencadenamiento y mantenimiento de la contractura del musculo liso. Asimismo se menciona como consecuencia de esta cascada, una fosfolipasa activada por calcio la cual produciría prostaglandinas PGF₂ descubiertas en el líquido amniótico y en la sangre de la madre en labor de parto^{5,7,10,11}.

Uno de los principales problemas en el Perú es la elevada tasa de mortalidad materna y perinatal, constituyéndose en una emergencia de salud pública y un buen indicador de la calidad de los programas de protección materno infantil. En nuestro país, cada año se producen alrededor de 1800 muertes por causas de complicaciones en el embarazo, parto y puerperio; es así, que nos interesamos en estudiar los órganos del aparato genital femenino, los cuales están condicionados fisiológicamente para cumplir su fin primordial en la reproducción humana y en la perpetuación de la especie³.

Esta es la razón por la que, la población peruana se ve precisada a utilizar productos de la medicina folklórica en la aceptación de que no generan complicaciones en su salud. En nuestro medio en los niveles socioculturales y económicos bajos, es frecuente la práctica de algunas costumbres tradicionales para tratar de solucionar algunos problemas relacionados con el embarazo no deseado, aun si no se tiene implementado un buen programa de control de la natalidad, es por ello que se acude al empleo de plantas, como el "berro", científicamente conocida como *Nasturtium officinale*, a la que se le atribuye posibles efectos musculotrópicos^{7,12,13,14}.

El "berro" es miembro de la familia de las Brassicaceae que también comprende el repollo, brócoli, coliflor, col de Bruselas, berza, hojas de mostaza y nabos. Estas plantas contienen indoles específicos (compuestos orgánicos aromáticos), los cuales son miembros de una clase de sustancias que contienen azufre, llamadas glucosinolatos; formándose a partir de precursores cuando se ingieren trituradas o cocidas^{15,16}.

Los glucosinolatos también llamados heterósidos sulfocianogenéticos o heterósidos azufrados pertenecen al grupo de metabolitos secundarios denominados heterósidos, mayoritariamente glucósidos, que contienen azufre y se biosintetizan a partir de aminoácidos diversos, lo que da lugar a diferentes estructuras químicas^{7,16,17}.

Se han realizado investigaciones sobre la composición fitoquímica de *Nasturtium officinale*. Carvalho informa de la presencia de glucosinolatos, cumarinas, flavonoides y esteroides, por lo que se podría inferir sobre el posible efecto musculotrópico uterino en *Rattus rattus* var. *albinus*¹⁷.

No conociéndose en nuestro medio estudios controlados que demuestren sus posibles efectos oxitócicos sobre la musculatura uterina y que aclaren su posible mecanismo de acción en base a los antecedentes mencionados, surgió el interés de investigar en que medida el decocto de *Nasturtium officinale* afecta la respuesta musculotrópica uterina in vitro de *Rattus rattus* var. *albinus*, previa sensibilización

con estrógenos y/o progesterona, para lo cual se planteó el siguiente problema:

¿Qué efecto tendrá el decocto de *Nasturtium officinale*, sobre la amplitud de las contracciones de la musculatura lisa uterina de *Rattus rattus* var. *albinus* in vitro?

Teniendo en cuenta la presencia de heterósidos sulfocianogénicos en las hojas y tallos de *Nasturtium officinale*, se puede postular: El decocto de *Nasturtium officinale* tiene efecto musculotrópico positivo aumentando la amplitud de las contracciones uterinas en *Rattus rattus* var. *albinus*; planteándose los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto del decocto de *Nasturtium officinale* sobre la amplitud de las contracciones uterinas del músculo liso de *Rattus rattus* var. *albinus*.
- Comparar el efecto oxitócico in vitro de *Nasturtium officinale* con la oxitocina sobre la musculatura uterina de *Rattus rattus* var. *albinus*.
- Determinar si la acción oxitócica del decocto de *Nasturtium officinale* depende del estado hormonal uterino en *Rattus rattus* var. *albinus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tratamiento de las ratas:

Las ratas fueron ovariectomizadas y colocadas en jaulas metálicas acondicionadas para su recuperación. Se les mantuvo en condiciones de laboratorio sometidas a las mismas características ambientales de temperatura, presión barométrica, iluminación y alimentación y, luego de 8 días se les dividió aleatoriamente en 4 grupos y se procedió a aplicarles dosis únicas de hormonas vía intramuscular. El primer grupo recibió estrógenos (Valerianato de estradiol: "Progynon Depot" ^(R) ampolla de 10 mg/mL Laboratorio Schering Farmacéutica Peruana) a la dosis de 0.5 mg/Kg de peso corporal; el segundo grupo recibió progesterona (Medroxiprogesterona: "Depo-provera" ^(R) ampolla de 150 mg/mL Laboratorio Pharmacia) a la dosis de 5 mg/Kg; mientras que el tercer grupo se le administró ambas hormonas: 0.25 mg/Kg de estrógenos y 2.5 mg/Kg de progesterona. El grupo restante que no recibió tratamiento hormonal fue usado como control ⁷.

Obtención de los cuernos uterinos:

Los animales fueron sacrificados 8 días después de la administración de las hormonas y los cuernos uterinos fueron aislados cuidadosamente y colocados en la solución de Smith y Mc Closky fresca, a 37 °C que los mantuvo viables por 3 a 4 horas en promedio ^{7,10}.

Colocación de los cuernos uterinos en el aparato de órganos aislados:

El montaje de los cuernos se realizó atando un hilo en cada extremo del cuerno uterino cuidando de no ocluir el lumen, uno de los hilos fue asegurado al tubo proveedor de oxígeno; se introdujo el cuerno en el baño de órganos aislados conteniendo 40 mL de solución a 37 °C, mientras que el otro hilo del otro extremo se unió a la palanca inscriptora, la que se ajustó al

tambor del kimógrafo.

Los cuernos uterinos del espécimen fueron trabajados usando la solución de Smith y Mc Closky. La solución fue preparada con químicos de grado analítico, usando agua bidestilada y desionizada y, fueron mantenidos a 37 °C, airadas con una mezcla de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂, el cual llega al baño de órganos aislados a través de un tubo proveedor de burbujeo a la solución fisiológica y poder de este modo alcanzar condiciones artificiales, que permitan al tejido mantenerse en condiciones fisiológicas de in vivo. El registro se obtuvo en el tambor del kimógrafo que giró a una velocidad de 4 mm/min. Para su conservación se usó la solución fijadora ^{7,18}.

Obtención del decocto de *Nasturtium officinale*:

Se colocaron 50 g. de hojas y tallos de *Nasturtium officinale* "berro" en 50 mL de agua destilada fría, luego se dejaron hervir por 15 minutos, se enfrió unos minutos y finalmente se filtró a través de una gasa.

El decocto así obtenido se dejó evaporar en una placa petri a una temperatura de 40 a 45 °C y, una vez desecado se pesó y se le resuspendió en agua bidestilada, siendo utilizado el mismo día de su preparación ^{7,12}.

Protocolo experimental:

Luego de la regularización de la actividad contráctil uterina se tomó un registro basal inicial durante 5 minutos. Seguidamente se registraron las respuestas de cada cuerno uterino de cada *Rattus rattus* var. *albinus* a las cuatro fases de la experiencia, primero, tras añadir la dosis efectiva 50 (DE₅₀) del decocto de *Nasturtium officinale*, segundo, la DE₅₀ de la oxitocina (ambas DE₅₀ fueron determinadas en un estudio previo), tercero, la DE₅₀ del decocto de *Nasturtium officinale* más la DE₅₀ de oxitocina (Oxitocina sintética: "Pitocin" ^(R) ampolla de 10 UI/mL Laboratorio Parke Davis) y, finalmente, la DE₅₀ de oxitocina más la DE₅₀ de *Nasturtium officinale*, y se obtuvo un registro gráfico. En cada ensayo, que tuvo de 5 a 8 minutos de duración, se cuidó de enjuagar el cuerno uterino por tres veces en la solución correspondiente, tomándose un nuevo registro basal válido para el ensayo siguiente. Se siguió el mismo protocolo con cada uno de los grupos experimentales.

Los datos fueron analizados teniendo en cuenta las variaciones de las contracciones en función de las alturas máximas registradas en el kimógrafo ^{14,18,19,20}.

Evaluación estadística:

Los resultados fueron procesados estadísticamente mediante los valores como: Media Aritmética (X), Desviación Estándar (DS), Error Estándar (ES). El estudio comparativo se realizó mediante la Función de Test de Student (Tc) - Test de Student comparativo y para determinar el nivel de significancia estadística se usó una Probabilidad (P) menor a 0,05 con un 95% de confiabilidad ¹⁸.

RESULTADOS

TABLA 1: Variaciones grupales y evaluación estadística del efecto musculotrópico basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *N. officinale* (50 mg/mL/Kg) en útero de *R. rattus var. albinus* y su respuesta motora comparada con la de Oxitocina (1.5 mUI/mL) en el Grupo Control (N = 6).

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)					
	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C	
	Basal	Nast.	Nast.	Oxit.	Nast.+Oxit.	Oxit.+Nast.
X	2.5	6.5	6.5	4.0	4.5	2.5
D.S.	2.12	3.53	3.53	1.41	2.12	0.71
t _c	0.68		1.85		1.26	
p	<0.50 N.S.		<0.10 N.S.		<0.20 N.S.	

TABLA 2: Variaciones grupales y evaluación estadística del efecto musculotrópico basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *N. officinale* (50 mg/mL/Kg) en útero de *R. rattus var. albinus* y su respuesta motora comparada con la de Oxitocina (1.5 mUI/mL) en el Grupo Problema tratado con estrógenos (N = 6).

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)					
	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C	
	Basal	Nast.	Nast.	Oxit.	Nast.+Oxit.	Oxit.+Nast.
X	11	23	23	19.2	22	17.57
D.S.	10.77	12.09	12.09	17.16	10.16	9.34
t _c	1.96		0.46		0.85	
p	<0.05 SIG.		<0.60 N.S.		<0.40 N.S.	

TABLA 3: Variaciones grupales y evaluación estadística del efecto musculotrópico basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *N. officinale* (50 mg/mL/Kg) en útero de *R. rattus var. albinus* y su respuesta motora comparada con la de Oxitocina (1.5 mUI/mL) en el Grupo Problema tratado con progesterona (N = 6).

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)					
	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C	
	Basal	Nast.	Nast.	Oxit.	Nast.+Oxit.	Oxit.+Nast.
X	6.0	16.4	16.4	16.0	15.2	13.0
D.S.	7.91	11.23	11.23	12.94	12.56	10.34
t _c	1.69		0.05		0.30	
p	<0.10 N.S.		<0.90 N.S.		<0.70 N.S.	

TABLA 4: Variaciones grupales y evaluación estadística del efecto musculotrópico basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *N. officinale* (50 mg/mL/Kg) en útero de *R. rattus var. albinus* y su respuesta motora comparada con la de Oxitocina (1.5 mUI/mL) en el Grupo Problema tratado con estrógenos y progesterona (N = 6).

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)					
	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C	
	Basal	Nast.	Nast.	Oxit.	Nast.+Oxit.	Oxit.+Nast.
X	8.25	16.37	16.37	10.25	12.12	9.87
D.S.	4.74	5.04	5.04	3.95	4.21	4.83
t _c	3.32		2.71		0.24	
p	<0.01 SIG.		<0.02 SIG.		<0.80 N.S.	

TABLA 5: Variación de la fase basal entre el grupo control y el grupo problema, basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *Nasturtium officinale* (50 mg/mL/Kg) sobre el músculo uterino de *Rattus rattus var. albinus* sensibilizado con estrógenos, progesterona y la combinación de ambos.

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)			
	GRUPO CONTROL		GRUPO PROBLEMA	
		Estrógenos	Progesterona	Estrog.+Progest.
X	2.5	11	6.0	8.25
D.S.	2.12	10.77	7.91	4.74
t _c		1.96	0.91	2.56
p		<0.05 SIG.	<0.30 N.S.	<0.02 SIG.

TABLA 6: Variación de la Fase *N. officinale* entre el grupo control y el grupo problema, basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *Nasturtium officinale* (50 mg/mL/Kg) sobre el músculo uterino de *R. rattus var. albinus* sensibilizado con estrógenos, progesterona y la combinación de ambos.

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)			
	GRUPO CONTROL		GRUPO PROBLEMA	
		Estrógenos	Progesterona	Estrog.+Progest.
X	6.5	23	16.4	16.37
D.S.	3.53	12.09	11.23	5.04
t _c		3.16	1.76	3.21
p		<0.01 SIG.	<0.10 N.S.	<0.01 SIG.

TABLA 7: Variación de la fase oxitocina entre el grupo control y el grupo problema, basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *N. officinale* (50 mg/mL/Kg) sobre el músculo uterino de *R. rattus var. albinus* sensibilizado con estrógenos, progesterona y la combinación de ambos.

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)			
	GRUPO CONTROL	Estrógenos	GRUPO PROBLEMA Progesterona	Estrog.+Progest.
X	4.0	19.2	16.0	10.25
D.S.	1.41	17.16	12.94	3.95
t _c		2.33	2.04	3.65
p		<0.02 SIG.	<0.05 SIG.	<0.001 A.S.

TABLA 8: Variación de la fase *N. officinale* mas oxitocina entre el grupo control y el grupo problema, basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *Nasturtium officinale* (50 mg/mL/Kg) sobre el músculo uterino de *R. rattus var. albinus* sensibilizado con estrógenos, progesterona y la combinación de ambos.

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)			
	GRUPO CONTROL	Estrógenos	GRUPO PROBLEMA Progesterona	Estrog.+Progest.
X	4.5	22.0	15.2	12.12
D.S.	2.12	10.16	12.55	4.21
t _c		4.24	1.84	3.07
P		<0.001 A.S.	<0.05 SIG.	<0.01 SIG.

TABLA 9: Variación de la fase oxitocina mas *N. officinale* entre el grupo control y el grupo problema, basado en la amplitud de las contracciones del decocto de *N. officinale* (50 mg/mL/Kg) sobre el músculo uterino de *R. rattus var. albinus* sensibilizado con estrógenos, progesterona y la combinación de ambos.

Valoración estadística	AMPLITUD (mm)			
	GRUPO CONTROL	Estrógenos	GRUPO PROBLEMA Progesterona	Estrog.+Progest.
X	2.5	17.57	13.0	9.87
D.S.	0.71	9.34	10.34	4.83
t _c		4.23	2.25	4.07
p		<0.001 A.S.	<0.05 SIG.	<0.001 A.S.

LEYENDA:

X: Media Aritmética
 SIG: Significativo
 N.S.: No significativo
 A.S.: Altamente significativo
 D.S.: Desviación estándar
 t_c: Student comparativo
 p: probabilidad <0.05

Nast.: *Nasturtium officinale*
 Oxit.: Oxitocina
 Nast.+Oxit.: *Nasturtium officinale* mas Oxitocina
 Oxit.+Nast.: Oxitocina mas *Nasturtium officinale*
 Estrog.+Progest.: Estrógenos mas progesterona

DISCUSIÓN

El parto constituye un trabajo y, mecánicamente todo trabajo consiste en la generación de movimiento contra una resistencia. En este proceso, la contracción uterina representa la fuerza o motor principal; sin embargo, sucede que algunas veces las contracciones no son eficaces para vencer la resistencia de la pelvis ósea y las partes blandas, dificultándose el parto; lo que se conoce como hipoactividad o hipodinamia uterina es en este momento que se recurre a sustancias que estimulan directa o indirectamente al útero con el fin de expulsar el contenido uterino^{4, 7, 11, 21, 22}.

N. officinale es una planta herbácea de la familia Brassicaceae, comúnmente llamada "berro", a dicha planta recurren mujeres con problemas de embarazo no deseado y de escasos recursos económicos de los niveles pobres de nuestra región, para inducir el aborto¹³.

La pérdida del producto de la concepción es comúnmente una consecuencia del incremento de la motilidad uterina. Las plantas reportadas como que tienen efecto oxitócico son: *Ruta graveolens*, *Ruta chalepensis*, *Ocinum micranthum*, *Ageratina Sternbergiana* King y Robinson^{10, 12}. En esta línea de trabajo el interés de comprobar experimentalmente si el decocto de *Nasturtium officinale* tiene efecto musculotrópico uterina en *Rattus rattus* var. *albinus* tratadas con estrógenos, progesterona y la combinación de ambas, después de haber sido ovariectomizadas, para descartar la influencia del ovario en la producción de hormonas esteroideas, simulando lo que ocurre en el ciclo estral de la rata..

Un estudio piloto previo nos permitió establecer la dosis efectiva⁵⁰, de decocto de *N. officinale* para útero de *R. rattus* var. *albinus*, in vitro fue de 38 mg/mL del baño de órganos aislados y para la oxitocina fue de 1.2 mUI/mL.

Analizando la respuesta contráctil del músculo uterino frente al decocto de *N. officinale* en la **Tabla 1**, grupo A, se observa que al comparar la respuesta basal y frente al decocto de *N. officinale*, hay diferencia a favor del decocto, pero dicha respuesta no es estadísticamente significativa. Esta respuesta a favor del decocto de *N. officinale* se debería a la actividad de las células del endometrio que tendrían afinidad por los componentes fitoquímicos de la planta en estudio, dichos componentes a través de ligandos disponibles y factores tisulares específicos mediarían para la liberación de prostaglandinas, las que actúan sobre el retículo sarcoplasmático liberando

iones calcio y produciéndose acoplamiento de actina - miosina². Seguimos analizando la **Tabla 1**, grupo B, al comparar la respuesta contráctil del útero frente al decocto de *N. officinale* y frente a la oxitocina, la respuesta es a favor del decocto de *N. officinale* ya que como en el caso anterior estaría activando a las células del miometrio, sensibles en términos de receptores no tradicionales y que en éste caso generan mejor respuesta que los receptores oxitócicos²¹. De igual modo en la **Tabla 1**, grupo C, se aprecia que al comparar la respuesta motora del útero frente al decocto de *N. officinale* más oxitocina y oxitocina más decocto de *N. officinale* la mejor respuesta da a favor de *N. officinale* más oxitocina, indicándonos que los receptores no tradicionales sensibles a *N. officinale* tienen mejor actividad motriz que los receptores oxitócicos, aunque en los tres grupos de la **Tabla 1** predomina una respuesta contráctil mayor frente al *N. officinale*, pero que dichas diferencias analizadas estadísticamente no tienen significancia.

Al observar la **Tabla 2**, donde se dan las respuestas contráctiles del útero de *R. rattus* var. *albinus*, tratadas con estrógenos, se aprecia en el grupo A, que la mayor respuesta entre el basal y el decocto de *N. officinale*, está frente al decocto, luego en el Grupo B, al comparar la respuesta entre decocto de *Nasturtium officinale* y oxitocina, la mejor respuesta se da a favor de *N. officinale* y en el grupo C al comparar decocto de *N. officinale* más oxitocina con la respuesta oxitocina más decocto de *N. officinale*, se evidencia que la mayor respuesta está a favor cuando el útero se estimula primero con decocto de *N. officinale* más oxitocina. Al efectuar el análisis estadístico, solo es significativo el grupo A. Dicha respuesta puede ser atribuible a la activación de los receptores no tradicionales sensibles a los componentes fitoquímicos de *N. officinale*, para una mejor comprensión recordamos que los receptores son proteínas que se hallan adheridas a la membrana pero nunca existe igual número de receptores en un tejido en un momento dado, pues están sintetizando y catabolizando continuamente y este número variará de acuerdo al estado metabólico y a la sensibilización hormonal de la célula². Asimismo se conoce que los estrógenos en el útero inducen crecimiento del miometrio y el endometrio, con aumento de la masa muscular, es decir de los elementos contráctiles de actina y miosina, al mismo tiempo la producción de nutrientes macroérgicos como el adenosin trifosfato, como también de iones inorgánicos de calcio^{22, 23, 24}. También cabe la posibilidad de que los principios activos del decocto de *N. officinale* posean acciones

oxitócicas y actúen estimulando en receptores activos de la oxitocina, ya que tales receptores se encontrarían en mayor número en útero tratado con estrógenos^{5, 7, 25, 26}. La alta significancia encontrada al comparar la respuesta contráctil del basal y frente al decocto de *N. officinale*, o sea el aumento en amplitud de la respuesta contráctil, es una característica del efecto oxitócico, cuando el útero está sometido a dosis elevadas de estrógenos^{2, 4, 27, 28}. Esta hormona esteroidea penetra en sus células diana por difusión, formando un complejo activado que presenta una particular afinidad por varios sitios de fijación en el núcleo, esta fijación parece modificar la expresión genética, ya que probablemente, los sitios aceptores se encuentran en secuencias de ADN, cuya transcripción ha de ser inducido por la hormona. Entre los efectos resultantes de las interacciones esteroide - receptor se encuentra la transcripción del ARN_m precursor, su procesamiento y traslación a proteínas específicas que modifican la función, la síntesis y la diferenciación de las células²⁷.

Al apreciar la **Tabla 3**, y las variaciones grupales de respuesta contráctil del útero de ratas tratadas con progesterona se observa en el A, al comparar la respuesta basal frente a la respuesta con el decocto de *N. officinale*, es mayor la amplitud a favor de decocto de *N. officinale*. En el grupo B, al comparar la respuesta motora del decocto de *N. officinale* y el de la oxitocina, la diferencia se orienta a favor de *N. officinale* y en el grupo C, al comparar la respuesta del decocto de *N. officinale* más oxitocina y oxitocina más decocto de *N. officinale*, la respuesta mayor la tiene cuando se agrega al baño de órganos aislados primero decocto de *N. officinale* y luego oxitocina, de tal manera que en todos los grupos la mayor respuesta uterina está a favor del decocto de *N. officinale*, aunque hecho el análisis estadístico no hay diferencia significativa. Esta respuesta se debería a la utilización de receptores no tradicionales que culminarían en contracción uterina, pues como se conoce el efecto de la progesterona sobre el útero es la de producir hiperpolarización de la membrana variando el potencial de -60mV a -90mV de modo que disminuye la actividad espontánea, más tarde también se establece que disminuye la permeabilidad al calcio y hoy se reporta que inhibe la entrada y salida del potasio, alterando el intercambio de Ca^{++}/K^{+} , y como es de conocimiento la labor del ion K, es responsable de la repolarización de la membrana en el proceso contráctil^{27, 29}.

Al revisar la **Tabla 4**, y observar las respuestas del útero tratado con estrógenos

más progesterona juntos, tenemos que en el grupo A, al comparar el basal y decocto de *N. officinale*, la respuesta es favorable a *N. officinale*; en el grupo B, al comparar decocto de *N. officinale* mas oxitocina, la mayor respuesta está a favor de *N. officinale* y en el grupo C, al comparar la combinación del decocto de *N. officinale* más oxitocina y oxitocina mas decocto de *N. officinale* también la mayor respuesta la tiene cuando el útero es estimulado por *N. officinale* más oxitocina, siendo las diferencias estadísticamente significativas, excepto en el grupo C. La experiencia nos indica que aún cuando el útero, está bajo la influencia de los estrógenos y la progesterona la respuesta motora prevalece en función de los estrógenos, es decir la no logra disminuir en términos estadísticos las respuestas contráctiles³⁰.

En base al esquema experimental, se trabajó las respuestas uterinas en etapas o fases: basal, frente al decocto de *Nasturtium officinale*, frente a oxitocina, frente al decocto de *N. officinale* más oxitocina y la fase oxitocina más decocto de *N. officinale*. En la **Tabla 5**, se aprecian los valores de respuesta uterina de en términos de amplitud valorados en milímetros, en la fase basal de todos los grupos trabajados, la mejor respuesta motriz, la dió el grupo tratado con estrógenos, seguido el grupo tratado con estrógenos más progesterona, ambas diferencias estadísticamente significativas. Esta respuesta se debería a las acciones que tienen los estrógenos sobre el miometrio uterino ya que en ausencia de estrógenos el músculo uterino disminuye su poder de respuesta contráctil, en cambio cuando está sensibilizado con esta fase, se contrae con regularidad y mayor fuerza y sensible a las drogas oxitócicas²³.

En la **Tabla 6**, se aprecia las respuestas del útero en la fase *N. officinale* en el control y los grupos problemas, en la que se aprecia que la mayor respuesta la tiene frente al decocto de *N. officinale* el grupo tratado con estrógenos y dicha diferencia es estadísticamente significativa. Esta respuesta se debería a la acción estimulante del decocto de *N. officinale* sobre los receptores oxitócicos y los receptores no tradicionales que permiten una alta respuesta motora. Asimismo al comparar las respuestas del grupo control y el grupo tratado con estrógenos más progesterona, hay diferencia estadísticamente significativa. Esta respuesta se debería a la sensibilización del útero con los estrógenos³⁰.

En la **Tabla 7**, se reportan los datos de los valores de respuesta motora de la fase oxitocina, en la que a la rata la mejor respuesta motora la tiene el útero tratado con estrógenos porque al compararlos con el control hay

diferencia estadísticamente significativa; del mismo modo al comparar en la fase oxitocina, la respuesta del control vs progesterona y control vs estrógenos más progesterona, en ambos existe diferencia estadísticamente significativa. Estos hallazgos se deberían a la acción estimulante de la oxitocina sobre dichos receptores que están funcionalmente acoplados a la proteína $G_{\alpha q/11}$ que estimula la actividad de la fosfolipasa C, la cual estimula la liberación de calcio, desde niveles intracelulares, además de la ocupación de receptores, produce la activación inducida por despolarización de una mayor disponibilidad del calcio a los elementos contráctiles de actina - miosina y con ello genera amplitud en la contracción muscular uterina^{23,26}.

En la **Tabla 8**, se aprecian las respuestas motoras del útero frente al decocto de *N. officinale* más oxitocina tanto en el control y los subgrupos problemas, en la que la máxima respuesta la tiene el útero de las ratas tratadas con estrógenos y al comparar el control y el grupo tratado con estrógenos se alcanza una diferencia de alta significancia. Este hallazgo comprobaría de que los constituyentes fitoquímicos del decocto de *N. officinale* estimularían los receptores aumentados por la sensibilización estrogénica y además estarían actuando los receptores no tradicionales y generando una mayor amplitud en la respuesta musculotrópica^{7, 10, 25, 31}.

En la **Tabla 9**, al observar las respuestas motoras del útero de rata y el grupo problema frente al control, nos da diferencia de alta significancia frente al grupo tratado con estrógenos, con significancia estadística al grupo tratado con progesterona y alta significancia con el grupo tratados con estrógenos mas progesterona. Estas respuestas demostrarían en la fase Oxitocina mas *N. officinale* los úteros con mayor amplitud corresponden al tratado con estrógenos, y también al de la asociación estrógenos más progesterona, ya que su respuesta obedecería a la acción estrogénica^{5, 7}.

Finalmente, las respuestas contráctiles encontradas en el kimógrafo fueron comparadas con el basal, con las de oxitocina y con las fases pre-oxitocina y post-oxitocina, encontrándose acción musculotrópico uterina en *R. rattus var. albinus*, inclusive mayor frente a oxitocina; y éstas respuestas son dependientes del estado hormonal de la rata en tratamiento.

CONCLUSIONES

- El decocto de *N. officinale* "berro", tiene efecto musculotrópico en útero de *R. rattus var. albinus*.

- La respuesta contráctil del músculo uterino frente al decocto de *N. officinale* es mayor que frente a la oxitocina.
- El efecto inducido por *N. officinale* depende del estado hormonal del útero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anwer K. Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase-C activities via coupling to G alpha q/11. *Endocrinology*. USA 1995. 136(1):1509-1515.
2. Bossmar T. Receptor for and miometrial responses to OT and vasopresin in preterm and term human pregnancy. *Am. J. Obstet.* 1994. 171(6): 1634-1642.
3. Bowman W. *Farmacología*. 2° ed. Edit. Interamericana. México. 1984:20,33-35.
4. Lopez J. Controlled trial of a program for the active management of labor, *N. Eng. J. Med.* 1992. 326:450-454.
5. Batra X. Destrogen induced changes in muscarinic receptor density and contráctil responses in the females. *Acta physiol scnd.* 1989:137-141.
6. Odonovan B. *Manual de endocrinología*. 2° ed. Edit. Manual Moderno. México, págs. 77-78, 143-150.
7. Castillo F. Efecto del decocto de la *Ruta graveolens* en ratas gestantes. Tesis Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 1995:1-21.
8. Page C. *Farmacología integrada*. 2° ed. Editorial Harcourt Bruce. España. 1998:288-292.
9. Alva N. Efecto del decocto de *Ageratina Sternbergiana King y Robinson* sobre la musculatura uterina de rata in vitro. Tesis Bach. Biología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 1996:3-8.
10. Berne R, Levy M. *Fisiología*. 2° ed. Editorial Harcourt Brace. España. 1998:731-735.
11. Conn M., Gebhart G. *Principios de Farmacología*. 1° ed. Traducido por Q.F.B.: María del Rosario Carsolio Pacheco. Edit. El Manual Moderno S.A. México D.F. 1991:317-319.
12. Mostacero J. *Botánica Sistemática Fanerogámica*. Editorial Botánica de UNT. 1990:45.
13. Kuklinski C. *Farmacognosia*. 1ra. ed. Edit. Omega. España. 2000:3-39.
14. Qian A. Evidence for the involvement of several intracellular domains in the coupling of oxytocin receptor to G alpha(q/11). *Cell Signal*. USA 1998. 10(2):101-5.
15. Antunes A. Flavonol Glycosides from Leaves of *Cotus spiralis*; *Fitoterapia* 71,

- Elsevier. 2000: 507-510.
16. Hase A. Separation and Determination of intact glucosinolatos in Rapeseed by High-Performance Liquid Chromatography; Journal of Chromatography, 435, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988: 501-507.
 17. Carvalho J. Contribución del estudio fitoquímico y analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., brassicaceae. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Federal de Paraná. Brasil. 2001.
 18. Varkeviser C, Pathmanathan I. Diseño y realización de proyectos de investigación sobre sistemas de salud. Vol. 2. Ottawa. Centro internacional de investigaciones para el desarrollo. 1995:378-380.
 19. Tresguerres J. Fisiología Humana. 2ª ed. Edit. Mc Graw – Hill Interamericana. España. 1999:1062-1065.
 20. Strakova Z. Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat myometrium during labor: Gi receptor interaction. Am J Physiol. USA 1997. 272(5): 193-198.
 21. Herrera E. Racial Differences in Cesareans: An Analysis of U.S. 2001 National Inpatient Sample Data. *Obstetrics & Gynecology* 2005; 105:710-718.
 22. Velasco A. Farmacología de Velásquez. 16ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. España 1993:775-779.
 23. Chan W. Subtipos de receptores oxitocínicos en el miometrio de rata preñada. 1993:1381-1386.
 24. Sanborn B, Dodge K. Molecular Mechanisms Regulating the effects oxytocin an myometrial intracellular calcium. University of Texas. USA. 1998. 449:277-86.
 25. Brody T. Human Pharmacology Molecular to Clinical. 3ª ed. Editorial Morby. EEUU 1998:559,562-565.
 26. Eckert R. Fisiología Animal. Editorial Interamericana. México 1992: 106, 281, 316-342.
 27. Vaca L. Depletion of intracellular Ca stores activates a Ca selective channel in vascular endothelium. Am. J. Physiol. 1994; 267: c920-c925.
 28. Johnston A. High- versus Low-Dose Oxytocin for Augmentation or Induction of Labor. *The Annals of Pharmacotherapy*: Vol. 39, No. 1. USA 2004.
 29. Katzung M. Farmacología Básica y Clínica. 4ª ed. Editorial El Manual Moderno. México 1993:470.
 30. Yallampalli C. Uterine contractile responses to endothelium receptors are elevated during labor. Biol. Reprod. 51(4):640-645.
 31. Merrill D. Randomized, Double-Masked Comparison of Oxytocin Dosage in Induction and Augmentation of Labor. *Obstetrics & Gynecology* 1999; 94:455-463.

Correspondencia:

Ericson Félix Castillo Saavedra

Dirección:

Jr. Juan Zapata 977 El Bosque.

Teléfono:

205465

Correo electrónico:

ericson_fcs@hotmail.com

Hongos causantes de enfermedades de postcosecha en *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga", procedentes de zonas de distribución del distrito Trujillo, Perú.

Fungi causing postharvest diseases in Lactuca sativa var. capitata L. "lettuce" from distribution areas of the district Trujillo, Peru

Rodríguez-Lacherre, Manuel¹.

RESUMEN

Se determinaron los hongos más frecuentes causantes de enfermedades de post cosecha en las hojas comestibles de *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga", procedentes de las zonas de distribución del distrito de Trujillo, mercados la "Hermelinda" e "Indoamericano", utilizando 264 plantas enfermas atacadas por hongos, en el período comprendido entre Enero a Diciembre de 2008. Se realizaron aislamientos, monocultivos y microcultivos de las especies patógenas en medios de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Lima Bean para efectuar observaciones macro y microscópicas de las estructuras fúngicas, previa coloración con Azul de Amann.

Las especies determinadas fueron las siguientes: *Bremia lactucae* Regel, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Erysiphe cichoracearum* D.C., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)D' By, *Cercospora longissima* Sac. y *Septoria lactucae* Pass.

Palabras clave: Hongos, enfermedades de postcosecha, *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga".

ABSTRACT

The most frequent pathogenic fungi attacking to vegetables post crop of *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga" determined from zones of distribution of the Trujillo district, Perú; between January to December 2008. Samples of the fungi were taken from sick vegetables and cultures were made on Agar Sabouraud Dextrosa and Agar Bean Lima medium. Fixation and mounting were made with Amann blue. The isolated fungi were: *Bremia lactucae* Regel, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Erysiphe cichoracearum* D.C., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)D' By, ***Cercospora longissima*** Sac. y *Septoria lactucae* Pass.

Key words: Fungi, postharvest diseases, *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lettuce".

¹ Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.

INTRODUCCIÓN

Los hongos, son organismos heterotróficos caracterizados por su amplio número, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, participando en la degradación progresiva de la materia orgánica y produciendo enfermedades en los vegetales, animales y el hombre¹.

En América Latina como en el resto del mundo, existen numerosos hongos que como parásitos obligados o facultativos, constituyen la causa de infecciones y enfermedades en las plantas^{2,3}. En el Perú, el panorama es parecido, contándose con una variedad de hongos que atacan a hortalizas de plantas superiores de interés económico, como *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga", una planta herbácea anual de gran importancia hortícola y elevada demanda; cuya parte comestible, las hojas sésiles, se consumen en ensaladas. Es ampliamente conocida y se cultiva casi en todos los países del mundo. El origen de la "lechuga" es bastante antiguo, ya que existen pinturas que representan a esta hortaliza en una tumba de Egipto que data del año 4,500 a.C. Procede probablemente de Asia Menor. Es propia de climas templados. El rango de temperatura para su crecimiento y desarrollo es de 13° a 25° C, siendo la óptima entre 16° y 22° C⁴.

En nuestro país, la "lechuga" es considerada como el principal cultivo hortícola con respecto a las demás *Compuestas*; toda la producción de esta hortaliza se destina al mercado nacional, razón por la que se encuentra durante todo el año.

La principal característica de la parte comestible de la "lechuga", es su balance adecuado de compuestos orgánicos e inorgánicos. Cada 100 gramos de parte comestible de "lechuga" contienen 94.0% de agua; 1.3 gr de proteínas; 3.5 g de carbohidratos; 8.0 mg de Ca; 25.0 mg de P; 1.4 mg de Fe; 264.0 mg de K; 18.0 mg de ácido ascórbico; 190.0 U.I. de vitamina A⁵.

La "lechuga", por ser una planta de gran importancia en el desarrollo económico y social de la agricultura a nivel mundial, y sobretodo en la alimentación de nuestro país, justifica el estudio de los hongos que le producen deterioro. A pesar de la existencia de sistemas de protección naturales, la conservación de las partes comestibles es limitada; así también, las causas de la alteración son variadas. Además, de los deterioros enzimáticos y desintegraciones, los hongos desempeñan un papel fundamental como causantes de podredumbres⁶.

Las pérdidas de las plantas en especial las hojas frescas de "lechuga" debidas a las

enfermedades de post cosecha, generalmente son directas; porque, disminuyen la calidad y cantidad de los productos afectados. Asimismo, uno de los efectos más importantes de los ataques de hongos sobre la parte comestible de las plantas de post cosecha, es la inducción a la *micotoxicosis*; es decir, enfermedades de animales y del hombre ocasionadas por el consumo de alimentos invadidos por hongos que producen sustancias tóxicas denominadas *micotoxinas*. La ingestión de alimentos que contienen micotoxinas, pueden producir efectos graves, tanto en el hombre como en animales. En efecto, estas sustancias pueden causar graves enfermedades hepáticas, renales, del aparato circulatorio y de los órganos hematopoyéticos; aún cuando, sean ingeridas en dosis pequeñas⁷.

En nuestro medio, no se ha reportado trabajo alguno sobre hongos productores de enfermedades de postcosecha en las hojas comestibles de la "lechuga". Asimismo, teniendo en cuenta el peligro potencial que representa para la salud pública la acción de estos hongos, como causantes de daño y productores de *micotoxinas* en la parte comestible; es por ello, que se ha creído conveniente realizar el presente trabajo, con la finalidad de determinar que hongos causan enfermedades de postcosecha en las hojas de *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga" en las zonas de distribución del distrito de Trujillo, reduciendo su calidad comercial. Planteándose como objetivos, determinar las especies causantes de enfermedades de postcosecha en las hojas comestibles de "lechuga", determinar la frecuencia de aislamiento de los hongos causantes de estas enfermedades de postcosecha en las hojas de "lechuga", y relacionar la presencia de dichos hongos con cada una de las estaciones del año.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se inició con la toma de la muestra en las zonas de distribución de las "cabezuelas" cosechadas y almacenadas, ubicadas en los sectores Norte, mercado "La Hermelinda" y Sur, mercado "Indoamericano" (Sto. Dominguito), del distrito de Trujillo. Las muestras fueron tomadas en el período comprendido entre Enero a Noviembre de 2008.

Los muestreos se realizaron en las primeras horas de las mañanas; a razón, de 6 ejemplares deteriorados por semana (3 x 2 días). Se analizaron un total de 264 "cabezuelas" de post cosecha con biodeterioro pertenecientes a *Lactuca sativa* var. *capitata* L. "lechuga".

La toma de las muestras se realizó buscando aquellas "cabezuelas" que presentaban signos

y síntomas de enfermedad fúngica como: necrosis, pudrición, presencia de esporas y micelio, etc. Las "cabezuelas" fueron transportadas en cajas de cartón, que contenían camas de algodón al Laboratorio de Micología de la Universidad Nacional de Trujillo, para su análisis mediante la disección directa de las estructuras fúngicas y su correspondiente estudio microscópico.

En ciertos casos, cuando la hoja lesionada de la planta presentaba las manifestaciones vitales del hongo (síntomas), pero no mostraba externamente el desarrollo de elementos fúngicos (signos), se realizaron cortes histológicos finos con navaja y micrótopo de mano de las zonas afectadas del órgano, buscando estructuras de los hongos patógenos como: apresorios, rizoides, haustorios, esporas, micelio, capas fructíferas. El hallazgo de dichos elementos confirmaba que la hortaliza estaba infectada, y los cortes fueron fijados y coloreados con azul de Amann. En otros casos, cuando las estructuras fúngicas eran visibles externamente se extrajo parte de éstas, procediéndose a su coloración y fijación como en el caso anterior.

Otra parte de la hoja infectada fue sembrada en Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Lima Bean, distribuidos en tubos de ensayo y placas Petri, con el objeto de obtener monocultivos fúngicos. Previamente al sembrado, con la finalidad de eliminar posibles contaminantes, los órganos se lavaron con hipoclorito de sodio (lejía) diluido al 0.5 - 1.0%, durante un minuto y se enjuagaron en agua estéril; luego, se procedió a cortar pequeñas porciones (aprox. 9 mm²) de la parte afectada, las que se sembraron en placas Petri y tubos de ensayo que contenían medio de cultivo, y fueron incubados a temperatura ambiente⁸.

Seguidamente se realizaron microcultivos, inoculando las estructuras fúngicas (esporas, hifas o micelio) procedentes de los monocultivos o de las colonias aisladas en bloques de agar Sabouraud dextrosa y agar Lima bean de 1 cm² de área y de 1 mm de altura, dispuestos cada uno sobre una lámina portaobjeto y cubiertos con una laminilla cubre objeto. Las láminas con microcultivos sembrados fueron colocadas dentro de una

cámara húmeda estéril, consistente en una placa Petri conteniendo un soporte de vidrio en "v" sobre una capa de gasa humedecida con agua. Luego, los microcultivos fueron incubados en condiciones ambientales, realizándose controles diarios que consistieron en observaciones macro y microscópicas de las estructuras fúngicas características. Cabe señalar, que todo este proceso se realizó bajo condiciones de asepsia. Cuando el crecimiento de la especie había llegado a su madurez; es decir, había esporulación, se procedió a su fijación y coloración con azul de Amann.

Las características obtenidas tanto de los monocultivos como de los microcultivos, sirvieron de base para la determinación de la especie de hongo causante de enfermedad de postcosecha, empleando las claves taxonómicas hechas por especialistas en fitopatología^{9,10}.

RESULTADOS

De las 264 "cabezuelas" de plantas recolectadas con biodeterioro en las dos zonas de distribución del distrito de Trujillo, se aislaron 6 especies fúngicas causantes de enfermedades de postcosecha en la hortaliza en estudio, con diferentes grados de aislamiento; como se observa, en la **Tabla 1**.

Al analizar la frecuencia de aislamiento de las especies determinadas en las "cabezuelas" recolectadas de *Lactuca sativa* var. capitata L. "lechuga", se halló que *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Erysiphe cichoracearum*, fueron los hongos más frecuentes con 37.05, 20.52 y 16.93% respectivamente; en cambio, *Bremia lactucae* y *Septoria lactucae*, fueron los menos frecuentes con 7.57 y 4.18%, respectivamente (**Tabla 1**).

Así mismo, se observó que las diferentes especies causantes de enfermedades de postcosecha en hojas de "lechuga", hicieron su aparición en determinadas estaciones del año, por 3 a 5 meses; *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Erysiphe cichoracearum* en las estaciones de otoño-invierno, *Cercospora longissima* y *Bremia lactucae* en las estaciones de primavera-verano, y *Septoria lactucae* en la estación de invierno; como se observa en la **Tabla 2**.

TABLA 1: Frecuencia de aislamiento de hongos causantes de enfermedades de postcosecha en plantas de *L. sativa* var. capitata L. "lechuga", en zonas de distribución de Trujillo, Perú.

Hongos	Frecuencia de aislamiento	
	N°	%
<i>Botrytis cinerea</i>	186	37,05
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	103	20,52
<i>Erysiphe cichoracearum</i>	85	16,93
<i>Cercospora longissima</i>	69	13,75
<i>Bremia lactucae</i>	38	7,57
<i>Septoria lactucae</i>	21	4,18

Fuente: Datos obtenidos en trabajo de laboratorio y de gabinete.

TABLA 2: Presencia de hongos causantes de enfermedades de postcosecha en *L. sativa* var. capitata L. "lechuga", en zonas de distribución del distrito Trujillo, Perú, de enero a noviembre del 2008.

Hongos fitopatógenos	Meses											
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	-	+(29)*	+(35)	+(41)	+(48)	+(33)	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	-	-	-	+(25)	+(23)	+(21)	+(19)	+(15)	-	-
<i>Erysiphe cichoracearum</i>	-	-	-	-	-	+(14)	+(17)	+(20)	+(23)	+(11)	-	-
<i>Cercospora longissima</i>	+(15)	+(14)	+(20)	-	-	-	-	-	-	-	+(8)	+(12)
<i>Bremia lactucae</i>	+(11)	+(12)	+(10)	-	-	-	-	-	-	-	+(6)	+(9)
<i>Septoria lactucae</i>	-	-	-	-	-	-	+(5)	+(10)	+(6)	-	-	-

El signo +: indica presencia, el signo -: indica ausencia.

*N° de aislamientos.

DISCUSIÓN

Según las observaciones realizadas, las manifestaciones de enfermedades causadas por hongos en las plantas de postcosecha almacenadas de *L. sativa* var. capitata L. "lechuga" en estudio, fueron evidentes. Esto se debería a que el medio ambiente donde se almacenan las plantas contiene un alto porcentaje de humedad, óptimo para el desarrollo de estos hongos patógenos.

La mayor frecuencia de aislamiento de las especies *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de postcosecha, se debería a su amplia distribución de estos hongos; concordando, con lo que sostiene al respecto otros investigadores¹¹.

La infección a las plantas de postcosecha era frecuentemente a través de lesiones de los tejidos protectores naturales; como por ejemplo, la cutícula de la epidermis, facilitando la penetración del hongo hacia el interior de los mismos, favoreciendo su alteración en mayor o menor profundidad, siendo los causantes de dichas lesiones, la acción en campo, los insectos, cortes, golpes y en general cualquier agente traumatizante. Asimismo, otros investigadores refieren que la causa alterante ya puede existir en la planta antes de su recolección, a pesar de no manifestarse más que durante su almacenamiento¹².

En lo que se refiere a *Botrytis cinerea* "moho gris", es una de las especies que se encontró en las hojas frescas de postcosecha, ocasionando un tipo de biodeterioro denominado

"podredumbre gris"; coincidiendo, con lo que refieren otros investigadores, quienes afirman que es un parásito vigoroso, y que no existen frutos ni hortalizas frescos de tejidos blandos que no sean atacados por este hongo cuando son almacenados, siendo su desarrollo favorecido por la elevada humedad y el calor del almacenamiento¹³.

Con respecto a *Sclerotinia sclerotiorum* encontrado como hongo de almacén, ataca directamente a las plantas ocasionando pérdidas considerables en la producción, causadas por la "pudrición" de las hojas frescas de las plantas almacenadas, su presencia es favorecida por la alta humedad ambiental y baja temperatura; coincidiendo, con lo señalado por algunos investigadores¹⁴.

En cuanto a *Erysiphe cichoracearum* que produce la enfermedad denominada "oídio", ocasionando el característico desarrollo de un polvillo blanco cenizo en las hojas más viejas, en condiciones ambientales de baja temperatura y alta humedad, coincidiendo al respecto con otros investigadores, quienes afirman que una de las razones por la que generalmente se infecta la planta, es la cierta cantidad de humedad y los nutrientes presentes en ella, necesarios para su desarrollo¹⁴.

Con respecto a *Bremia lactucae*, su crecimiento es favorecida por condiciones de temperaturas de 20° C y nocturnas de 10° C, y con alta humedad ambiental. La presencia de agua libre es esencial para el inicio de la infección; coincidiendo, con lo que señalado por otros investigadores¹⁵.

De igual manera, en lo que se relaciona con *Cercospora longissima*, su presencia es favorecida por temperaturas y humedad relativa altas; concordando, con lo que sostienen otros autores¹⁶.

Así mismo, se observó que las especies de hongos causantes de enfermedades de postcosecha se encontraron en algunos meses del año, esto se debe a los factores ambientales presentes en cada estación, como las características climáticas (tiempo atmosférico) existentes en nuestra zona por la presencia del Proyecto CHAVIMOCHIC, que favorecen el crecimiento de ciertas especies de hongos causantes de enfermedades e impiden el desarrollo de otras; coincidiendo, con lo que refieren al respecto otros investigadores¹⁷.

Cabe señalar que, según las observaciones realizadas en las zonas de muestreo, un buen número de hongos que atacan a las plantas de postcosecha investigadas, causan perjuicio económico para el agricultor y el comerciante, quienes limitados económicamente no pueden adquirir los fungicidas necesarios para el cuidado de sus productos almacenados temporalmente.

CONCLUSIONES

- Las especies de hongos causantes de enfermedades de postcosecha en las "cabezuelas" de plantas de *L. sativa* var. capitata L. "lechuga", procedentes de zonas de distribución del distrito Trujillo, Perú; fueron las siguientes: *Bremia lactucae* Regel, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Erysiphe cichoracearum* D.C., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) D. By, *Cercospora longissima* Sac. y *Septoria lactucae* Pass.
- La frecuencia de aislamiento de las especies determinadas en las "cabezuelas" recolectadas de *Lactuca sativa* var. capitata L. "lechuga", indicó que *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Erysiphe cichoracearum*, fueron los hongos más frecuentes con 37.05, 20.52 y 16.93% respectivamente; en cambio, *Bremia lactucae* y *Septoria lactucae*, fueron los menos frecuentes con 7.57 y 4.18%, respectivamente.
- *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Erysiphe cichoracearum* estuvieron presentes en las estaciones de otoño-invierno, *Cercospora longissima* y *Bremia lactucae* en las estaciones de primavera-verano, y *Septoria lactucae* en la estación de invierno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexopoulos, C. & Ch. Mims. Introducción a

- la Micología. Edit. Omega S.A. Barcelona - España. 1985.
2. Agrios, G. Fitopatología. 3ª. ed. Edit. Limusa S.A. México. 2004.
3. Finch, H. & A. Finch. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 2ª. ed. Edit. Trillas. México. 1990.
4. Valadez, A. Producción de hortalizas. Edit. Limusa S.A., México D.F. 1996.
5. Collazos, C. Tablas peruanas de composición de alimentos. Edit. del Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. 1996.
6. Müller, G. Microbiología de los alimentos vegetales. Edit. Acirbia S.A. Zaragoza-España. 1985.
7. Mossel, D. & B. Moreno. Microbiología de los alimentos. 2ª. ed. Acirbia S.A. Zaragoza - España. 1982.
8. Echandi, E. Manual de Laboratorio de Fitopatología General. Edit. Herrero Hnos. Sucesos S.A. México, D.F. 1971.
9. Barnett, H. and B. Hunter. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4ª. edic. Edit. Burgess Publishing Co. Minneapolis-EE.UU. 1998.
10. Gilman, J. Manual de los Hongos del Suelo. 3ª. Edic. Edit. Continental, S.A. México, D.F. 1983.
11. Jauch, C. Patología Vegetal. 2ª. ed. Edit. Ateneo. Buenos Aires. Argentina. 1979.
12. Deacon, J. Introducción a la Micología Moderna. Edit. Limusa S.A. México D.F. 1990.
13. Pariona, D.; C. Higaonna; B. Matos. Enfermedades en hortalizas. Edit. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Dirección General de Investigación Agraria. Lima-Perú. 2001.
14. Llácer, G.; M. López; A. Trapero; A. Bello. Patología Vegetal. 2ª. Edic. Edit. Grupo Mundi-Prensa, S.A. de C.V. México D.F. 2000.
15. García-Alvarez, M. Patología Vegetal Práctica. Edit. Limusa S.A. México. 1979.
16. Yamaguchi, M. World Vegetables. Principles Production and Nutritive Values. AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut. U.S.A. 1983.
17. Sarasola, A. & M. Roca. Fitopatología. Micosis. Tomo II. Edit. Hemisferio Sur. Buenos Aires - Argentina. 1975.

Correspondencia:

Manuel Roberto Rodríguez Lacherre.

Dirección:

Francisco Xandoval 114. Urb. Palermo-Trujillo

Teléfono:

247236 949251825

E-mail

rola_rob10@hotmail.com

Antígenos de excreción-secreción de las formas adultas de *Toxocara canis* detectados por Western Blot utilizando anticuerpos específicos producidos en conejo

Excretory-secretory antigens of Toxocara canis adult parasites detected by Western blot using specific antibodies produced in rabbits

Chuyo-Zavaleta, Mirtha; Jara-Campos, César.

RESUMEN

Se determinó a los antígenos de excreción-secreción (AE/S) de la formas adultas de *Toxocara canis* mediante la técnica de "Western blot" utilizando anticuerpos específicos producidos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, raza Neozelandesa inmunizado experimentalmente. Para ello, formas adultas vivas de *T. canis* fueron recolectadas del intestino delgado de cachorros de *Canis familiaris* infectados naturalmente, lavadas con PBS y cultivadas en medio mínimo esencial (Minium Essential Media –MEM Eagle- BioRad) durante 18, 20, 22 y 24 horas para obtener los productos de excreción-secreción que contengan a los antígenos. Los anticuerpos específicos, por su parte, fueron obtenidos en los conejos por inoculación, vía subcutánea, de 101.0 ug/mL de productos excretados-secretados obtenidos a las 18, 22 y 24 horas de cultivo, según esquemas previamente establecidos.

Mediante la técnica de "Western blot", se detectaron cinco bandas antigénicas inmunodominantes cuyos pesos moleculares, en Kilodaltons (KDa), fueron: 79.4, 70.8, 32.1, 31.6 y 28.2 kDa, de los cuales las tres últimas han sido también halladas en las larvas infectivas, por lo que podrían utilizarse en el diagnóstico de la toxocarosis humana.

Palabras clave: *Toxocara canis*, Western blot, antígenos de excreción-secreción, *Canis familiaris*

ABSTRACT

Excretory-secretory antigens of adult specimen of *Toxocara canis* by an electroimmunoblotting Western blot technique using specific antibodies obtained in rabbit, *Oryctolagus cuniculus* Neozelandes strain, immunized experimentally were determined. For this, live specimens of *T. canis* were collected from gut of puppies naturally infected, washed with PBS and cultured in Essential Minimum Media (Eagle-BioRad) during 18, 20, 22, and 24 hours with the purpose to obtained excretory-secretory products. Specific antibodies, on the other hand, were obtained in rabbit specimens by inoculation, subcutaneously utilizing schemes previously proposed, of 101.0ug/mL excretory-secretory products. By a Western blot technique were detected five immunodominant immunoreactive bands: 79.4, 70.8, 32.1, 31.6 and 28.2 kDa. Of them, the three last ones were found previously in *T. canis*-infective larvae too and so should be employed in the human toxocarosis Western blot diagnosis

Key words: *Toxocara canis*, Western blot, excretory-secretory, *Canis familiaris*

¹Exalumna de la EAP de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

INTRODUCCIÓN

La toxocariosis es una infección zoonótica causada por los nematodos ascáridos *Toxocara canis* y *T. cati* que rutinariamente infectan a perros y gatos en todo el mundo. En el humano, cuando los huevos infectivos de estos nematodos son accidentalmente ingeridos la larva eclosiona en el intestino y migra a través de órganos, de preferencia al hígado y a los ojos, y produce las dos clásicas formas de la enfermedad: la larva migrans visceral y la larva migrans ocular^{1,2}.

La larva migrans visceral se caracteriza por la presencia de manifestaciones crónicas, con dolor abdominal, compromiso hepático, diversos signos de alergia e hipereosinofilia; la ocular, en cambio, se presenta clínicamente como una uveítis o una papilitis óptica³. La toxocariosis humana es una zoonosis donde es frecuente la geofagia y la falta de prácticas de higiene; la severidad crónica depende del número de huevos infectivos ingeridos y de la frecuencia de reinfecciones^{4,5}.

Más complejo que el de otros nemátodos, el ciclo de vida de *T. canis* incluye la parasitación del intestino de perros y gatos por las formas adultas, la contaminación del medio ambiente por los huevos y la migración y enquistamiento de las L2/L3 en los tejidos de diferentes especies de hospederos incluyendo el hombre, en quien produce los síndromes ya señalados^{6,7,8}).

La prevalencia de la toxocarosis es elevada en países tropicales y en vías de desarrollo y se asocian generalmente con poblaciones de niveles socioeconómicos bajos^{1,9}. En el Perú existen pocos registros los cuales indican frecuencias de 7.8 a 20% en poblaciones rurales y 40% en individuos con sospecha de toxocarosis ocular^{10,11,12,13,14,15,16}.

El diagnóstico clínico de la infección humana por *T. canis* resulta dificultoso debido a que la sintomatología es inespecífica y similar a la de otras patologías y, asimismo, el diagnóstico coprológico directo rutinario resulta impracticable porque los huevos no se encuentran en las heces. Entonces, la detección de anticuerpos en sangre u otros fluidos biológicos adquiere gran importancia como herramienta diagnóstica. Para este caso la técnica de ELISA en sus diversas variantes ha sido la más utilizada^{17,18,19}; sin embargo, la tendencia actual es el uso de técnicas más específicas, tales como, la de Electroinmunotransferencia o "Western blot"^{20,21} y el PCR²¹.

La técnica de "Western Blot" es básicamente un proceso cualitativo que combina la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida con la sensibilidad del inmunoensayo, convirtiéndose en una prueba de alta sensibilidad y especificidad²³. Es en las

enfermedades causadas por cestodos en las que esta técnica ha tenido más éxito, probablemente porque en este grupo se hallan la cisticercosis y la hidatidosis, dos dolencias graves en el humano^{22,23}; sin embargo, algunas enfermedades causadas por nematodos, como la ascariasis²⁴, la ancilostomiasis²⁵, la estrongiloidiasis²⁶ y la toxocarosis también han sido estudiadas mediante la técnica de Western blot.

Respecto del diagnóstico de la toxocariosis utilizando la técnica de Western blot, se tiene referencia de trabajos ejecutados mayormente con antígenos obtenidos de la larva infectiva. En efecto, Jara²⁷ detectó cuatro bandas inmunodominantes (200, 48, 43 y 25 kDa) al enfrentar a los antígenos de excreción-secreción y somáticos con sueros de cachorros de perro positivos a la parasitación por las formas adultas de *T. canis*; posteriormente, Ramírez²⁸, Castro-Sesquén²⁹ y Roldán y Espinoza²⁰ al utilizar a los antígenos de excreción-secreción, luego que se determinara que tienen mayor utilidad diagnóstica comparada con los antígenos somáticos, hallaron bandas inmureactivas de pesos semejantes, cuando los enfrentaron a sueros obtenidos en conejo inmunizado experimentalmente y de humanos con serología positiva a *T. canis*.

Sin embargo, la obtención de antígenos de las formas larvarias requiere de: (i) el aislamiento de las hembras grávidas, (ii) la separación de huevos de las últimas porciones de sus úteros, (iii) la embrionación por periodos no menores a un mes en soluciones de formol al 2% o de solución salina fisiológica con lavados diarios, (iv) el decorticado de los huevos con hipoclorito de sodio y posterior liberación de las larvas y (v) lavado repetido de las larvas a fin de que no hayan bacterias ni restos de cascarones que induzcan a la obtención de resultados erróneos. Entonces, teniendo en cuenta lo laborioso que resulta este proceso y que además tienen que obtenerse miles de larvas vivas para obtener productos de excreción-secreción suficientes como para ejecutar el Western blot o el ELISA, resulta necesario buscar nuevas fuentes de antígeno y en mayores cantidades, en menor tiempo y con menos esfuerzo. Una de esas fuentes son las formas adultas que se encuentran con frecuencia en cachorros y en grandes cantidades, como lo afirman Hassanain et al¹⁹ quienes investigaron la utilidad de los antígenos somáticos.

En el presente trabajo se utiliza la técnica de Western blot utilizando anticuerpos específicos obtenidos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, para determinar los antígenos de excreción/secreción de las formas adultas de *Toxocara canis* y se compran con aquellos obtenidas de las larvas

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- **50 ejemplares adultos de T. canis** obtenidos de Canis familiares “perro” infectados de dos a tres meses de edad, para la obtención de antígenos de excreción/secreción.
- 02 ejemplares de *Oryctolagus cuniculus* “conejo” de raza Nueva Zelanda de tres semanas de edad y de un peso promedio de 1.5 kg obtenidos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para lograr la producción de anticuerpos como respuesta a la inmunización de los antígenos de excreción/secreción de T. canis adultos.

Antígenos

Del intestino delgado de cinco cachorros de perro obtenidos en el “Mercado Mayorista” de la ciudad de Trujillo, Perú, naturalmente infectados con T. canis se recolectaron 50 ejemplares **adultos**, de los cuales se utilizaron 40 los que fueron lavados cuatro veces con PBS pH 7.2 estéril adicionándose penicilina y gentamicina para su desinfección.

Los ejemplares adultos, una vez desinfectados, fueron colocados en cada placa petri (ocho parásitos en cinco placas) conteniendo medio mínimo esencial -Minium Essential Media-Eagle, (Sigma, MEM) e incubados durante 18, 22 y 24 horas, a fin de obtener los productos de excreción-secreción²⁴.

Transcurridos los tiempos de incubación, los parásitos fueron descartados y el medio fue centrifugado a 1500 rpm, por 5 minutos, del cual fue separado en viales el sobrenadante que contenía a los productos excretados secretados del parásito, los que fueron conservados a -20 °C, hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford³⁰.

Anticuerpos

Con los productos excretados-secretados se inmunizó, por vía subcutánea, a cada conejo en cada una de las caras internas de las patas posteriores utilizando 1 mL mezclado (v/v) con 1 mL de adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y con Adyuvante incompleto en las tres restantes inmunizaciones, a intervalos de una semana entre cada inmunización. A los siete días posteriores a la última inmunización se obtuvo por punción cardiaca 20mL de sangre de los conejos, la cual se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos para obtener el suero, que también fue conservado a -20°C hasta el momento de su procesamiento^{24,25,26}.

La técnica de Western Blot:

La preparación de los antígenos, su

separación e identificación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Escalante et al²⁴, cuyas particularidades fueron las siguientes:

- Los antígenos de excreción-secreción fueron tratados con 0.01 M de Tris- HCl a pH 8.0; 0.1% de azul de bromofenol; 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), de glicerol, para luego ser calentado a 65°C por 20 minutos, siendo la concentración final del antígeno a preparar de 0.025 ug/ul y 0.05 ug/ul.
- El gel de poliacrilamida fue preparado en placa, entre dos láminas de vidrio separadas por espaciadores de plástico. Cada gel estuvo formado en la primera porción por el gel de apilamiento con una concentración de 5 % de acrilamida, en este se elaboró los pocillos donde se colocaron los patrones moleculares y la mezcla de antígenos preparados en una cantidad equivalente a 1 uL por mm de ancho de gel y la segunda porción por el gel separador con una concentración de 12 % de acrilamida.
- Los corridos fueron hechos en minigeles de 8 x 7 x 0.05 cm a la concentración de 12% de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA (corriente constante) en el gel de apilamiento y a 60 mA en el gel separador a un voltaje de 200 V por 30 minutos aproximadamente hasta que el colorante trazador alcanzó el extremo inferior del gel. En el corrido se incluyó el marcador de bajo peso molecular (Low Range Weigh Standard; Bio Rad).
- Los componentes proteicos separados en los geles de poliacrilamida fueron transferidos al papel de nitrocelulosa en una cámara de electroforesis horizontal (Trans-Blot Cell, BioRad) utilizando un buffer de transferencia constituido por 0.2 M Tris-HCl pH 8, 20% de metanol y agua destilada.
- Para realizar la electroforesis, el gel se unió con el papel de nitrocelulosa, se cubrió con papeles de filtro y esponjas que fueron colocadas en un cassette especial, los cuales fueron colocados en la cámara de transferencia, de tal modo que el gel se encuentre cercano al polo negativo y el papel de nitrocelulosa cerca al polo positivo. La transferencia se realizó a 2 A por espacio de 1.5 horas y a 4 °C.
- El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se lavaron (4 veces) con PBS/Twen-20 (0.1 M NaCl; 0.05 M Na₂PO₄, pH 7.2 y 0.35 Twen-20) y dos veces con PBS.
- Se colocó 500 ul de solución bloqueadora (leche descremada) y 10 ul de los dos sueros respectivos a cada tira
- Las tiras de nitrocelulosa fueron enumeradas en orden progresivo y colocado

en placas y tubos de ensayo respectivamente, los cuales fueron incubados por una hora en agitación constante y a temperatura ambiente.

- Se realizaron tres lavados con PBS Tween 20 cada 5 minutos cada uno en agitación constante.
- Se colocó 500 uL de conjugado enzimático (Purified Goat Anti Rabbit IgG Horseradish Conjugate BioRad) por cada tira en PBS – Tween 20, los cuales fueron mantenidos en agitación constante por una hora.
- Se realizaron nuevos lavados con PBS Tween 20 de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Para revelar las bandas antigénicas se agregó 500 uL de la solución de sustrato, se detuvo la reacción al lavarlos con agua destilada.
- Para la determinación de los pesos moleculares se utilizó como patrón un marcador de bajo peso molecular conocido (SDS- PAGE Molecular Weight Standards Low Range). Se determinó el peso molecular relativo de las bandas antigénicas observadas de los antígenos de excreción-secreción de la larva de *T. canis*, para ello se encontró la movilidad relativa (RF) del marcador y de los antígenos en estudio.

RESULTADOS

Las lecturas de las concentraciones de los productos excretados-secretados de *T. canis* usando el método de Bradford a las 18, 22 y 24 horas fue de: 67.5, 101.0, 68.0, 43.0 y de 64.0 ug/mL (Tabla 1), de los cuales el de mayor concentración fue usado en la inmunización de los conejos.

Luego de ejecutada la técnica de Western blot se observaron bandas inmunoreactivas en mayor número y nitidez cuando se usaron los productos obtenidos a las 24 horas de incubación, los cuales tenían una concentración óptima de 101.0 ug/mL (Fig. 1).

La detección de anticuerpos producidos en los conejos inmunizados con **antígenos de excreción / secreción** de *Toxocara canis* a la concentración de 101.0 ug/mL realizados mediante la técnica de “Western blot”, evidenció la presencia de cinco bandas antigénicas inmunodominantes cuyos pesos moleculares fueron: 79.4 kDa, 70.8 kDa, 32.1 kDa, 31.6 kDa y 28.2 kDa (Fig. 1).

Cuando se comparó con trabajos previos se encontró coincidencias y diferencias, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1.- Valores de las concentraciones de proteínas obtenidas de cinco cultivos de formas adultas de *T. canis**

*Las determinaciones se hicieron mediante la técnica de Bradford.

Código	Tiempo (Horas)	N° parásitos	Temp (°C)	Humedad	[] ug/mL
A	18	8	32	62	67.5
B	24	8	32	48	101.0
C	22	8	35	56	68.0
D	18	8	37	62	43.0
E	24	8	37	50	64.0

Tabla 2. Comparación de las bandas reactivas de los antígenos de *T. canis* halladas con anterioridad con las halladas en la presente investigación

Forma evolutiva	Medio cultivo	% SDS-PAGE	Fuente de IgG	Bandas reactivas detectadas (kDa)	Referencia
Larva 3	RPMI-1640	2 - 10	Suero humano	24, 28, 30, 35, 132, 147, 200	Mag
Larva 3	RPMI-1640	2 – 5.5	Suero humano	29-35, 50-55, 97-116, 205	Nun
Larva 3	RPMI-1640	4-- - 16	Suero humano	24, 28, 30, 35, 48-56, 67, 117, 136, 152	Rol
Larva 3	MEM-Eagle	3 – 12	Suero perro	25, 27, 34, 43, 48, 80, 200	Jar
Larva 3	RPMI-1640	3 - 10	Suero conejo	57	Id
Adulto	RPMI-1640	4 - 12	Suero humano	19.3, 21.9, 30.5, 35.7, 40.7, 47.4, 47.4, 80, 85, 88	Hus
Adulto	MEM-Eagle	3 - 12	Suero conejo	28.2, 31.6, 32.1, 70.8, 79.4	

DISCUSIÓN

El desarrollo de pruebas de diagnóstico sensibles y específicas para demostrar la presencia de anticuerpos en suero de pacientes con sospecha de presentar toxocarosis es un importante paso hacia el mejoramiento del diagnóstico^{4,12,31}.

Toxocara canis, es un parásito excepcional entre los nemátodos por su capacidad para sobrevivir in vitro por mucho tiempo en las formas adulta y larvaria. En efecto, se verificó en la presente investigación lo registrado en comunicaciones anteriores^{27,28,29} que en el medio de cultivo, el parásito secreta abundantes cantidades de glicoproteínas antigénicas, las cuales, como se ha podido comprobar, tienen gran valor para el inmunodiagnóstico. Esta estabilidad in vitro, ha permitido coleccionar los antígenos secretados (E/S) en cantidades apreciables para análisis inmunológicos y bioquímicos y el empleo de *T. canis* como modelo de expresión antigénica en parásitos nemátodos.

Se ha demostrado que el parásito utiliza sus propias reservas endógenas para mantener sus procesos metabólicos esenciales, bajo estas circunstancias, si el periodo de sobrevivencia del parásito se prolonga, sus productos de excreción disminuyen paulatinamente y pueden en algún momento diferir de aquellos que resulten de un proceso metabólico in vitro, por eso resulta importante determinar el tiempo apropiado de cultivo de modo tal, que en pocas horas no se producen suficiente cantidad como para ejecutar una prueba de Western blot exitosa y, por el contrario, si se prolonga demasiado los parásitos mueren y las sustancias extraídas no son necesariamente antígenos de excreción-secreción^{17,23,32}. Se sabe que los antígenos de excreción-secreción de las larvas son enzimas o productos metabólicos eliminados por el parásito: entre ellos, (i) la aminopeptidasa, cuya actividad está implicada en el proceso de muda y en la desintegración de inmunoglobinas del huésped localizadas alrededor del cuerpo del parásito, (ii) las fosfatasas, que permiten el desarrollo embrionario (clavaje y gastrulación) teniendo una elevada demanda energética y tomando esta energía de las reservas de glicógeno, (iii) la proteasa, que posee un factor de invasividad necesaria para la penetración y migración en el huésped, esto de debería a que esta enzima ayuda a que la larva se libere del cascarón y proceda invadir los tejidos en el huésped^{13,7,17,29}. Probablemente, algunas de estas enzimas sean compartidas por los adultos, por ello la similitud de las bandas en ambas formas evolutivas, mediante la técnica de Western blot, siguiendo un protocolo similar.

Al igual que en trabajos previos^{25,28,29} el cultivo de parásitos en medio mínimo esencial (MEM) resultó exitoso y se pudo obtener proteínas que son, en definitiva los productos excretados-secretados cuando se cultivó por 24 horas (101.0 mg/mL) suficiente como para ejecutar en buena forma la técnica de Western blot. Sin embargo, tales trabajos han sido ejecutados con las larvas infectivas obtenidas directamente de los huevos embrionados y esta es la primera investigación en la que se emplean formas adultas. Lógicamente, por el gran tamaño respecto de las larvas, se emplean menor cantidad (ocho ejemplares por placa), pero suficiente como para obtener los productos requeridos para ejecutar la técnica.

En un trabajo inicial, utilizando suero de cachorros de perro positivos al parasitismo por las formas adultas de *T. canis*, comprobado mediante análisis coprológicos, Jara²⁷ halló 12 bandas reactivas de alto y bajo peso molecular, dentro de las cuales estuvieron las bandas de 80 KDa, que bien puede ser la correspondiente a la de 79.4 detectado en el presente estudio, la de 33 KDa semejante a la de 32.1, la de 31 de casi el mismo peso que la de 31.6 y la de 27 concordante con la banda de 28.2 de las formas adultas. Es de esperar que con el uso de suero de perro la técnica de Western blot permita el hallazgo de mayor número de bandas que con suero de mamíferos diferentes, aunque la concentración de proteínas usadas para los corridos y las concentraciones algo diferentes del gel concentrador y gel difusor empleados para el SDS-PAGE podrían estar influyendo en el número de bandas y en los correspondientes pesos de las bandas.

Ramírez-Zapata²⁸ obtuvo productos de excreción-secreción de las larvas 3 de *T. canis* y anticuerpos contra esos productos en conejo neocelandés, siguiendo la metodología utilizada en otros helmintos parásitos del hombre²⁴. Luego de ejecutada la técnica de Western blot, y usando dichos productos sin tratar con dithiotreitol (DTT), obtuvo cinco bandas de complejos ag-ac: 38.1, 31.6, 28.9, 14.1 y 12.6 KDa, de las cuales dos son semejantes a las encontradas en la presente investigación la de 31.6 y la de 28.9, que bien puede ser la correspondiente a la de 28.2 encontrada con las formas adultas.

Para acercar las investigaciones anteriores a lo que podría ser el hallazgo de bandas útiles en el diagnóstico de la toxocarosis humana que, en definitiva, es lo que importa, Castro-Sesquén²⁹ utilizó los antígenos de excreción-secreción de las larvas y los enfrentó a suero de humanos con serología positiva a *T. canis*, y detectó nueve bandas, con pesos muy semejantes a los detectados por Jara et al²⁶ y con algunas

bandas, como la de 28 KDa, de gran similitud con las halladas en el presente estudio que, como se ha señalado, pueden servir para el diagnóstico de la toxocarosis humana, luego de afinar las pruebas de especificidad.

Así fue, recientemente Roldán et al¹² señalan, luego de usar los antígenos de excreción-secreción de las larvas infectantes de *T. canis* y sueros de humanos con seroprevalencia positiva a esta especie, que dos son las bandas diagnósticas: la de 28 y la de 35 KDa. Si se compara con los hallado en el presente trabajo, se puede notar que aquí también se halló la banda de 28.2 KDa y también la banda de 32.1 KDa, que bien podría tratarse de la de 35, si se tiene en cuenta que los autores mencionados

usaron la poliacrilamida para el SDS-PAGE de 4% en la parte de la concentración y 16% en la parte del corrido, algo diferente al 12% de concentración del gel de corrida usada en este trabajo. Esta leve diferencia podría estar influyendo en leve diferencia hallada, ya que otras bandas también son bastante cercanas en peso, como la de 67 KDa que encontraran Roldán et al., que podría tratarse de la de 70.8 registrada en la presente investigación.

Como puede apreciarse en la Tabla 2 los diferentes trabajos efectuados revelan la existencia de bandas similares y si se compara con las obtenidas en los adultos, al menos tres bandas son coincidentes: las de 28, 31-32 y 79-80Kda que podrían utilizarse en el diagnóstico.

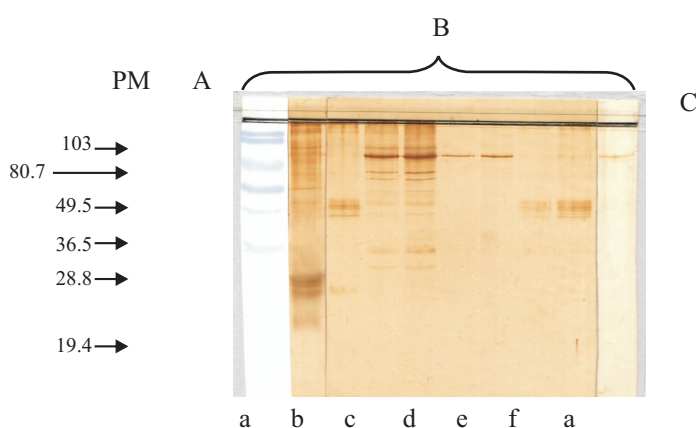


Fig. 1. Bandas inmunoreactivas, obtenidas mediante la técnica de Western Blot, de antígenos de excreción/secreción de *Toxocara canis* y anticuerpos específicos obtenidos en conejos inmunizados experimentalmente

PM=Peso molecular en Kilodaltons

A= Pool de sueros

B= Sueros hiper-inmunes

C=Suero pre-inmune

a. Cultivo de 24 horas, 0.025 ug/uL de productos excretados-secretados

b. Cultivo de 24 horas, 0.05 ug/uL de productos excretados-secretados

c. Cultivo de 18 horas, 0.025 ug/uL de productos excretados-secretados

d. Cultivo de 18 horas, 0.05 ug/uL de productos excretados-secretados

e. Cultivo de 22 horas, 0.025 ug/uL de productos excretados-secretados

f. Cultivo de 22 horas, 0.05 ug/uL de productos excretados-secretados

Con ello se verifica la utilidad de los antígenos obtenidos de las formas adultas que, como se ha señalado, son más fáciles de obtener que los de las formas larvianas. Sin embargo, queda por determinar la especificidad de los antígenos de las formas adultas y finalmente proponer su uso en el diagnóstico de la toxocarosis humana, que si bien es producida por la larva, hay antígenos comparables en las formas adultas que bien podría ser de utilidad diagnóstica si se tiene en cuenta que su obtención se hace con mucho menor esfuerzo, costo económico y de tiempo que los antígenos de las larvas. Anteriormente, esta búsqueda de antígenos más accesibles para ser usados en el diagnóstico de

enfermedades humanas ha sido verificado en la cisticercosis cerebral¹³⁴ pues, se utiliza antígenos obtenidos en los cisticercos de *Taenia crassiceps* (que puede mantenerse el ciclo en el laboratorio debido a que los hospederos intermediarios son los roedores y los definitivos los perros) en lugar de los de *Cysticercus cellulosae*, cada vez más difícil de encontrar porque el hospedero definitivo es solamente el hombre que, por razones de bioética no pueden ser usados como instrumentos de obtención de parásitos aunque se trate para el diagnóstico de una enfermedad de mal pronóstico, como es la neurocisticercosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Archelli, S. & L. Kozubsky. Toxocara y Toxocariosis. *Acta bioquím. clín. latinoam.*, 42(3), 379-384. 2008.
2. Schaller, LG; FS Cuba; J Breña-Chávez; D Toorejon & C Maguiña. Relación entre toxocariosis y asma: estudio prospectivo en niños del Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Perú. *Acta Med Per* 24(2):81-90. 2007.
3. Lee, S-U; J-R Yu & S Huh. Ultrastructural localization of *Toxocara canis* larval antigen reacted with seropositive human serum. *Korean J Parasitol*, 47(1):65-68. 2009.
4. Despommier, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev*, 16(2):265-272. 2003.
5. Ugbomoiko, US; L Ariza & J Heukelbach. Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limit knowledge of pet owners. *BMC Vet Res*, 4:49. 2008.
6. Terrones-Campos C, Andrade T, L Achira A, Valladolid O, Lanata CF. Toxocariosis atípica: reporte de un caso en la costa norte del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2010; 27(1):138-141
7. Chung, L-Y; B-H Fang; J-H Chang; S-M Chye & C-M Yen. The infectivity and antigenicity of *Toxocara canis* eggs can be retained after long-term preservation. *Ann Trop Med & Parasit*, 98(3):251-260. 2004.
8. Sowemimo, OA. Prevalence and intensity of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in dogs and its potential public health significance in Ife-Ife, Nigeria. *J Helminthol.* 81:433-438. 2007.
9. Mgnaval JF, Glikman LT, Dorchiis P, Morassin B, Highlights of human toxocariosis. *Korean J Parasit* 2001; 39:1-11.
10. Espinoza, Y; P Huapaya; R Suárez; V Chávez; C Sevilla; E Dávila & et al. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de la toxocariosis humana. *Ann Fac Med*, 64(1):7-12. 2003.
11. Espinoza, Y; P Huapaya; C Sevilla; A Huiza S Jiménez & C Náquira. Toxocariosis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA. *Ann Fac Med*, 64(4):228-232. 2003.
12. Roldán, W; Y Espinoza; A Atúncar; E Ortega; A Martínez & M Saravia. Frequency of eosinophilia and risk factors and their association with *Toxocara* infection in schoolchildren during a health survey in the North of Lima. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 50(5):273-278. 2008.
13. Espinoza, Y; P Huapaya; W Roldán; S Jiménez; Z Arce & E López. Clinical and serological evidence of *Toxocara* infection in school children from Morrope District, Lambayeque, Peru. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 50(2):101-105. 2008.
14. Roldán, W; Y Espinoza; P Huapaya; A Huiza; C Sevilla & S Jiménez. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by Dot-ELISA Test. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 51(2):67-71. 2009.
15. Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WR, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA et al. Seroprevalence of human toxocariasis in andean communities from the northeast of Lima, Peru. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2010; 52(1):31-36
16. Roldán WH, Cavero YA, Espinoza YA, Jiménez S, Gutiérrez CA. Human toxocariasis: a seroepidemiological Survey in the Amazonian City of Yurimaguas, Peru. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2010; 52(1):37-42
17. Espinoza, Y; P Huapaya; C Ayllón; C Sevilla; A Huiza & S Jiménez. 2003. Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. *Ann Fac Med*, 64(4):247-251
18. Iddawela, RD; RPVJ Rajapakse; NAND Perera & TAgatsuma. Characterization of a *Toxocara canis* specie-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean J Parasit*, 45(1):19-26. 2007.
19. Hassanain NA, Mahmoud MS. Serodiagnosis of human toxocariasis using adult somatic antigens of *Toxocara canis*. *Res J Parasitol* 2008; 3(3):85-91
20. Roldán WH, Espinoza YA. Evaluation o an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocarosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(3):411-418
21. Fogt-Wyrwas, R; W Jaosz & H Mizgajski-Wiktor. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol*, 81:75-78. 2007.
22. Escalante, H; E Miranda; M Lorca; M Verástegui & P Torres. La técnica de "Western blot" con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus celluloseae* para el diagnóstico de la cisticercosis. *Boletín Peruano de Parasitología* 11:26-31. 1995.
23. Escalante, H; K Davelois & P Torres. Antígenos específicos de *Taenia solium* detectados por "Western Blot" usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. *SCIENDO*, 2(1-2):33-39. 1999.
24. Ramírez, LA. Antígenos de escreción/secreción de *Ascaris lumbricoides* var suum detectados por

- "Western blot" usando suero de *Oryctolagus cuniculus* "conejo" inmunizado experimentalmente. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2002.
25. Jara, CA; H Escalante; E Díaz-Limay & W Reyes-Vega. Antígenos de excreción/secreción de geohelminthos parásitos del hombre productores de anticuerpos policlonales IgG. *SCIENDO*, 6(1-2):81-87. 2003.
 26. Vilela-Alburqueque, M. Sensibilidad y especificidad de la técnica de "Western blot" para el diagnóstico de la estroglyoidiasis humana usando antígenos de excreción/secreción de larvas filariformes de *Strongyloides stercoralis*. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2007.
 27. Jara CA. La técnica de Western blot con antígeno larvario de *Toxocara canis* para el diagnóstico de la toxocariosis. Tesis Maestría. Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
 28. Ramírez-Zapata. MR. Antígenos de excreción/secreción de la larva 3 de *Toxocara canis* detectados mediante la técnica de "Western blot" usando suero de *Oryctolagus cuniculus* "conejo" inmunizado experimentalmente. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2004.
 29. Castro-Sesquen, YE. Antígenos de larvas infectivas y titulares de *Toxocara canis* evaluados mediante electroinmunotransferencia con anticuerpos de *Oryctolagus cuniculus* y de humanos. Tesis Bachiller Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2006.
 30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
 31. Magnaval, J; R Fabre; P Maurieres; J Charlet & B de Larrard. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariosis. *Parasitol Res*, 77(8):697-702. 1991.
 32. Chávez, F; O Vásquez & H Escalante. Evaluación de la técnica Western blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. *Rev peru biol*, 14(2): 283-286. 2007.
 33. Suzuki, LA; GC Arruda, EMAB Quagliato & CL Rossi. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 40(2):152-155. 2004.
 34. Trillo-Altamirano, M; JA Carrasco & R Cabrera. Prevalencia de helmintos enteroparásitos zoonóticos y factores asociados en *Canis familiaris* en una zona urbana de la ciudad de Ica, Perú. *Parasitol Latinoam*, 58:136-141. 2003.
 35. Vidal, S & U Vergara. Diagnóstico serológico de toxocariosis humana: comparación de los antígenos de excreción/secreción y antígeno larval somático de *Toxocara canis*. *Immunol*, 14(4):166-172. 1995.
 36. Zevallos-Lescano, S; PP Chieffi; BA Peres; E O de Mello; C Náquira-Velarde, A Apaza-Salinas; et al. Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. in the Urban Area of Lima, Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(6):733-734. 1998.

Correspondencia:

César Jara Campos

Dirección:

Los Tréboles 275-201, Palmeras del Golf, Víctor Larco. Trujillo

Teléfono:

280071

E-mail:

cesarj75@hotmail.com

Maduración, muda y crecimiento de hembras del camarón de río *Cryphiops caementarius* con ablación del pedúnculo ocular, en condiciones de laboratorio

*Maturation, moulting and growth of females prawn *Cryphiops caementarius* with eyestalk ablation, in laboratory conditions.*

**Reyes-Avalos, Walter¹; Melgarejo-Velásquez, Gladis²;
Rojas-González, Elizabeth².**

RESUMEN

El objetivo fue estudiar la maduración, muda y crecimiento de hembras de *C. caementarius* con ablación del pedúnculo ocular. Se emplearon 25 hembras con ovarios en estado II y en muda C y D₁; 5 hembras con pedúnculos oculares intactos; 10 con ablación de un solo pedúnculo ocular y 10 con ablación de ambos pedúnculos oculares. El experimento duró 98 días y abarcó época no reproductiva. La ablación unilateral no afectó la maduración ovárica ni la duración del ciclo de muda, solo ocasionó reducido crecimiento por muda (4% en LC) y moderada mortalidad (40%). En cambio la ablación bilateral ocasionó maduración temprana (25 días), menor duración del ciclo de muda (22 días), mayor crecimiento por muda (8% en LC), alta mortalidad (65%) y cambios en la relaciones de las medidas morfométricas. La ablación unilateral y bilateral no alteraron la duración de los estados de muda AB ni C, pero la ablación bilateral redujo la duración del estado D principalmente la división D₁'.

Palabras clave: Ablación, maduración, muda, crecimiento, camarón.

ABSTRACT

The aim was to determine the effects of ablation unilateral and bilateral eyestalk, in maturation, moult and growth female *C. caementarius*. Twenty-five females were used with ovaries in stage II and in moult C and D₁; five females with eyestalk intact, ten with ablation of a single eyestalk and ten with ablation of both eyestalks. The experiment lasted 98 days and covered non-reproductive season. The unilateral ablation did not affect neither the ovary maturity nor cycle moult; caused only reduced growth by moult (4% in LC) and moderate mortality (40%). Instead ablation bilateral caused early maturation (25 days), shorter cycle moult (22 days), higher growth by moult (8% in LC), high mortality (65%) and changes in relationships of the morphometric measures. The unilateral and bilateral ablation did not alter the duration of the molting stages AB or C, but bilateral ablation reduced the duration of state D division mainly D₁'.

Key Words: Ablation, maturation, moult, growth, prawn.

¹ Departamento de Fisiología, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa.

² Egresada de la Escuela de Biología en Acuicultura. Universidad Nacional del Santa

Presentado el 19.11.2009, aprobado el 15.03.2010.

INTRODUCCIÓN

Cryphiops caementarius es el camarón de los ríos costeros del Perú que soporta pesquería comercial¹ y cuya reproducción en su ambiente natural es fluctuante, con un máximo entre Noviembre a Marzo², situación que limita el cultivo comercial, pues para ello se requieren de reproductores maduros durante el año. En este sentido, los estudios biológicos de la especie, solo describen aspectos importantes de la reproducción y el desarrollo^{3,4,5}, sin embargo, poco se ha avanzado en el manejo de reproductores en cautiverio.

Para inducir la maduración ovárica en crustáceos que tienen reproducción estacional se aplican diversos métodos como implantación de ganglios⁶, mediante control ambiental^{7,8}, por aplicación de hormonas⁹ y generalmente por ablación del pedúnculo ocular¹⁰. La ablación de uno de los pedúnculos oculares ocasiona maduración precoz en especies de *Penaeus*^{11,12}, en cambio en *C. caementarius*, no causa efecto ni en la reproducción ni en la muda¹³, pero la ablación de ambos pedúnculos oculares produce un efecto favorable sobre el desarrollo ovárico y el crecimiento¹⁴, sin embargo no se ha estudiado el efecto específico sobre la muda y la reproducción en sucesivas ecdisis, ni las alteraciones biométricas del crecimiento por muda, lo cual es de importancia para selección de reproductores.

La ablación de los pedúnculos oculares permite retirar las neurohormonas que inhiben la maduración gonadal y la muda¹⁵ lo que ocasiona aceleración de estos procesos, dependiendo de cual de ambos domina en el momento de la extirpación¹⁶. En este sentido muchas de las funciones que incluyen reproducción, comportamiento y procesos metabólicos están afectadas por la fisiología del ciclo de muda¹⁷ la cual depende de la especie y del estado del animal. En este sentido, la ablación peduncular produce alteraciones en la maduración ovárica, en el ciclo de muda y en el crecimiento de los camarones.

El objetivo fue conocer la maduración, muda y el crecimiento de hembras de *C. caementarius* con ablación unilateral y bilateral del pedúnculo ocular, en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Camarones adultos de *C. caementarius*, fueron capturados del río Lacramarca (09°07'70" LS y 78°34'20" LW) comprensión de la Provincia del Santa, Departamento de Ancash y transportados al laboratorio donde fueron estabulados en acuarios durante una semana; luego fueron seleccionadas 25 hembras con

ovarios en estado II de madurez y en estados de muda C y D₁. Las medidas de los camarones fueron 5,2 ± 0,1 g de peso total; 50,3 ± 1,2 mm de longitud total (escotadura post orbital hasta el extremo posterior del telson) y 13,2 ± 0,3 mm de longitud cefalotorácica (LC= escotadura postorbital hasta el extremo posterior de la línea media dorsal del cefalotórax). El sexo de los camarones fue determinado por la separación de las coxas del quinto par de periópodos¹⁸.

El experimento se realizó entre los meses de Setiembre y Diciembre del 2005; es decir dos semanas de invierno y doce semanas de primavera. Se emplearon 9 acuarios de vidrio (60 x 30 x 30 cm), cada uno con tres compartimentos (600 cm²) divididos con malla plástica tipo mosquitero, lo que permitió mantener a un camarón por compartimento. El agua fue aireada a flujo constante (2 l min⁻¹). Se emplearon 5 hembras con pedúnculos oculares intactos, 10 con ablación de un solo pedúnculo ocular (ablación unilateral) y 10 hembras con ablación de ambos pedúnculos oculares (ablación bilateral). La ablación del pedúnculo ocular se realizó por corte y cauterización¹¹. El desarrollo de los ovarios se observó a través del cefalotórax². Los estadios del ciclo de muda fueron observados en el endopodito de los urópodos¹⁹. El crecimiento por muda fue expresado como el porcentaje de incremento de la longitud del cefalotórax (% en LC) por muda, midiendo la LC de los exoesqueletos expulsados después de cada ecdisis (E). Los muestreos se realizaron tres veces por semana, durante tres ciclos de muda. Para los cálculos no se consideró la primera muda después de la ablación.

Los camarones fueron alimentados *Ad libitum* con carne de almeja (*Semele solida*) y pescado seco salado (*Trachurus* sp). La limpieza de los acuarios se realizó diariamente antes de cada alimentación. Los cambios de agua (30% del volumen total) se realizaron semanalmente. La temperatura del agua fue chequeada diariamente y quincenalmente se determinó pH, oxígeno disuelto, CO₂ y dureza total²⁰. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza simple y a la prueba de amplitud múltiple de Duncan, con 5% de significancia; además, se realizaron análisis de correlación y de regresión²¹.

RESULTADOS

Maduración: Las hembras con pedúnculos oculares intactos y las con ablación unilateral no maduraron durante los 98 días del experimento; excepto, una con ablación unilateral que maduró a los 29 días. En cambio las con ablación bilateral maduraron en 25 días, cuyos estados II y III del ovario demoraron 11,2 ±

5,6 y $10,5 \pm 3,8$ días, respectivamente y el estado IV $3,8 \pm 1,0$ días. Todas las hembras con ovarios IV realizaron muda pre nupcial y fueron ovíferas pero los huevos no fueron fecundados por falta de camarones machos en condiciones para reproducción. La maduración de las hembras con ablación ocurrió en Setiembre y Octubre, cuando la temperatura del agua fue de $18,6 \pm 0,5^\circ\text{C}$. En Noviembre la temperatura del agua fue de $20,4 \pm 0,6^\circ\text{C}$ y en Diciembre de $21,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$.

Muda: La duración del ciclo de muda en las hembras de *C. caementarius* con ablación bilateral fue de 22,6 días, significativamente ($p < 0.01$) menor que las hembras con ablación unilateral que demoraron 27 días (**Tabla 1**). Solo en las hembras con ablación bilateral se observó cambio del color de su cuerpo hacia un tono más claro y además ellas tuvieron mayor actividad locomotriz e incremento del apetito.

Tabla 1. Duración (Días $\pm$ DE) de las ecdisis sucesivas en hembras de *C. caementarius* con pedúnculos oculares intactos y con ablación unilateral y bilateral.

Hembras	Ecdisis 1		Ecdisis 2		Ecdisis 3		Total ciclos de muda		Duración Promedio
	n	Duración	n	Duración	n	Duración	N	%	
Intactas	5	$27,8 \pm 3,9$	3	$27,0 \pm 2,6$	2	$28,2 \pm 2,5$	10	23,5	$27,5 \pm 3,3^a$
Ablación unilateral	8	$28,6 \pm 5,1$	6	$27,5 \pm 3,7$	3	$27,7 \pm 3,2$	17	50,0	$27,9 \pm 4,1^a$
Ablación bilateral	6	$23,3 \pm 3,5$	3	$21,0 \pm 2,6$	-	-	9	26,5	$22,6 \pm 3,3^b$

DE = Desviación estándar. Valores con letras en superíndice iguales en una columna indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$).

En los tratamientos no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en postmuda, intermuda ni en premuda reciente e intermedia hasta D_1''' . Sin embargo, diferencia significativa ($p < 0,05$) fue observada solo en la duración de premuda tardía D_2 de aquellos camarones con ablación

unilateral y bilateral en relación con el control. Además, con los datos obtenidos fue posible calcular los días que faltan para la ecdisis a un estado de muda del camarón (**Tabla 2**).

Tabla 2. Duración de los estados, subestados y divisiones del ciclo de muda de hembras de *C. caementarius*, con pedúnculos oculares intactos y con ablación peduncular unilateral y bilateral.

Estados, subestados y divisiones del ciclo de muda	Hembras con pedúnculos oculares intactos				Hembras con ablación peduncular unilateral				Hembras con ablación peduncular bilateral			
	Duración		Días para la ecdisis	n	Duración		Días para la ecdisis	n	Duración		Días para la ecdisis	n
	n	Días $\pm$ DE			n	Días $\pm$ DE			n	Días $\pm$ DE		
AB	8	$4,8 \pm 0,9$	17,4	17	$4,63 \pm 1,3$	16,5	27,3	9	$3,8 \pm 0,9$	16,8	22,6	17
C	8	$2,5 \pm 1,1$	9,1	22,8	13	$2,8 \pm 1,1$	10,4	23,0	6	$2,4 \pm 0,7$	10,6	18,8
D	4	$20,3 \pm 1,6$	73,5	20,3	89	$20,0 \pm 1,3$	73,1	20,2	45	$16,4 \pm 1,0$	72,6	16,4
Do	4	$2,9 \pm 1,4$	10,5	20,3	15	$3,8 \pm 1,6$	13,9	20,2	7	$2,7 \pm 1,1$	11,9	16,4
D_1	8	$6,1 \pm 3,6$	22,1	17,4	17	$5,4 \pm 1,9$	19,7	16,4	10	$4,0 \pm 1,8$	17,7	13,7
D_1'	8	$4,9 \pm 1,6$	17,8	11,3	18	$5,0 \pm 1,4$	17,9	11,0	10	$3,9 \pm 1,6$	17,3	9,7
D_1''	8	$3,6 \pm 1,7$	13,0	6,4	15	$2,8 \pm 1,0$	9,3	6,0	9	$2,6 \pm 0,5$	11,5	5,8
D_1'''	8	$1,5 \pm 0,5^a$	5,4	2,8	17	$2,0 \pm 1,1^b$	7,2	3,2	8	$2,2 \pm 1,2^b$	9,7	3,2
D_2	8	$1,3 \pm 0,7$	4,7	1,3	7	$1,2 \pm 0,5$	5,0	1,2	1	$1,0 \pm 0,0$	4,4	1,0
D_3	8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
D_4	-	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

DE: Desviación estándar. Valores con letras en superíndice iguales en una fila indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$).

La ablación unilateral y bilateral no alteró significativamente los estados de postmuda AB ni el de intermuda C. En los camarones con ablación bilateral hubo disminución significativa ($p < 0,05$) de la duración del estado D en relación con los otros tratamientos (**Fig. 1**). La ablación unilateral y bilateral no afectó el inicio de la premuda (Do) ni la premuda D_3 . En cambio hubo

una reducción significativa ($p < 0,05$) en la duración del subestado D_1 en aquellos camarones con ablación bilateral. Sin embargo, la duración del subestado D_2 fue significativamente ($p < 0,05$) mayor en las hembras con ablación unilateral y bilateral en relación con el control (**Fig. 2**).

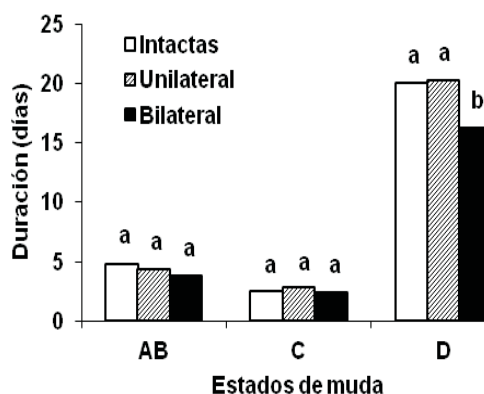


Fig. 1: Duración de los estados del ciclo de muda de hembras de *C. caementarius*, con pedúnculos oculares intactos y con ablación peduncular unilateral y bilateral.

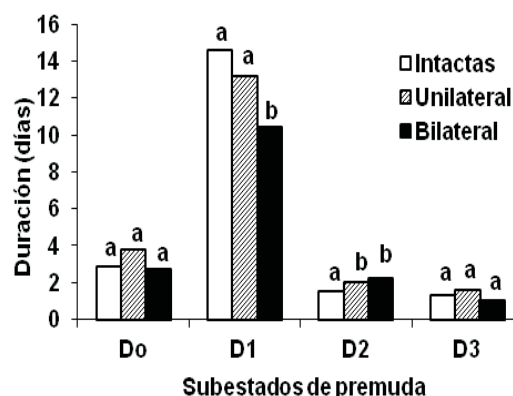


Fig. 2: Duración de los subestados de premuda de hembras de *C. caementarius*, con pedúnculos oculares intactos y con ablación peduncular unilateral y bilateral.

La duración de las divisiones del subestado D₁ fue diferente entre tratamientos. La ablación bilateral solo produjo reducción significativa ($p < 0,05$) de la división D₁'. En

cambio en las otras divisiones no hubo diferencias significativas, pero se observó tendencia a disminuir en mayor proporción con la ablación bilateral (**Fig. 3**).

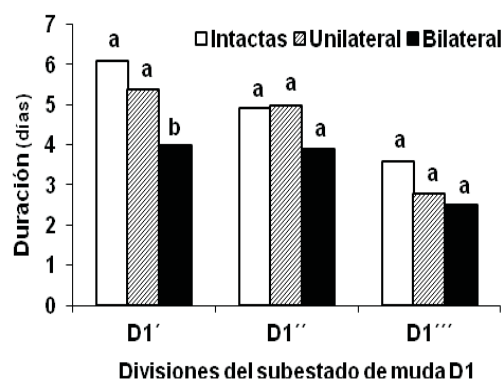


Fig. 3: Duración de las divisiones del subestado D₁ del ciclo de muda de hembras de *C. caementarius*, con pedúnculos oculares intactos y con ablación peduncular unilateral y bilateral.

No hubo mortalidad de las hembras intactas. Durante las dos primeras semanas, las hembras ablacionadas en estado D₁ murieron durante la ecdisis. A partir de la sexta semana se observó disminución significativa de la supervivencia de las hembras con ablación bilateral desde 36% hasta 0%; y las con ablación unilateral se mantuvo en 70% (**Fig. 4**). Las causas de la mortalidad de hembras con ablación bilateral fueron por muerte repentina (50%), durante la ecdisis (30%) y por canibalismo del macho (20%). La ablación

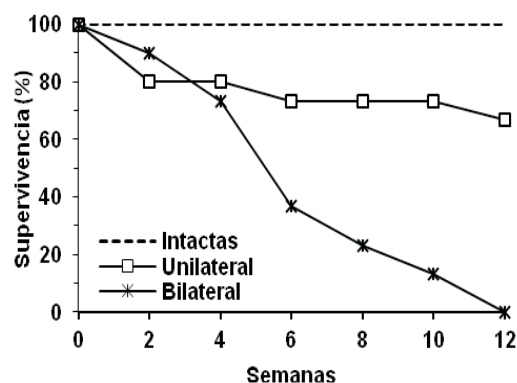


Fig. 4: Variación de la supervivencia de hembras de *C. caementarius* con pedúnculos oculares intactos y con ablación peduncular unilateral y bilateral.

unilateral ocasionó muerte durante la ecdisis (20%) y por canibalismo del macho (10%). **Crecimiento:** El crecimiento por muda de las hembras fue diferente entre tratamientos con alta significancia ($p < 0,01$). Las hembras con pedúnculos oculares intactos crecieron el 2% en LC, las con ablación unilateral el 4% en LC y las con ablación bilateral crecieron el 8% en LC (**Fig. 5**). En las hembras intactas el 50% de las ecdisis produjeron crecimiento; en las con ablación unilateral solo el 87,5% produjeron crecimiento y en aquellas con ablación bilateral el 100% crecieron luego de cada ecdisis

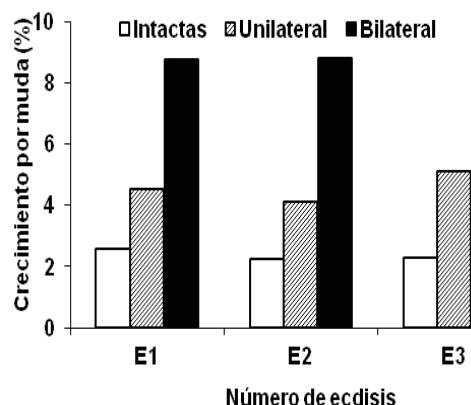


Fig. 5: Crecimiento por muda (% de incremento de la longitud del cefalotórax) en relación con las ecdisis (E) sucesivas de hembras de *C. caementarius* con pedúnculos oculares intactos y con ablación peduncular unilateral y bilateral.

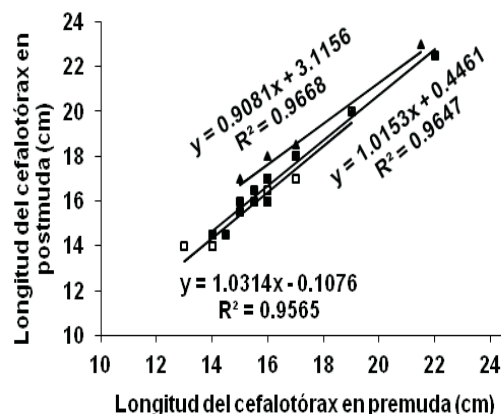


Fig. 6: Relación entre la longitud del cefalotórax en premuda y la longitud del cefalotórax en postmuda de hembras de *C. caementarius* con pedúnculos intactos (□), con ablación unilateral (■) y ablación bilateral (▲).

La relación entre la longitud del cefalotórax en premuda (LC_i) y la longitud en postmuda (LC_f) se ajustó a una regresión lineal (Fig. 6), con alta correlación para las hembras intactas ($r=0,9780$), con ablación unilateral ($r=0,9823$) y con ablación bilateral ($r=0,9833$). De igual

manera, la relación entre la LC_i y la duración del ciclo de muda, también se ajustó a una regresión lineal (Fig. 7), con bajas correlaciones en las hembras intactas ($r=0,4888$), con ablación unilateral ($r=0,6159$) y con ablación bilateral ($r=0,2616$).

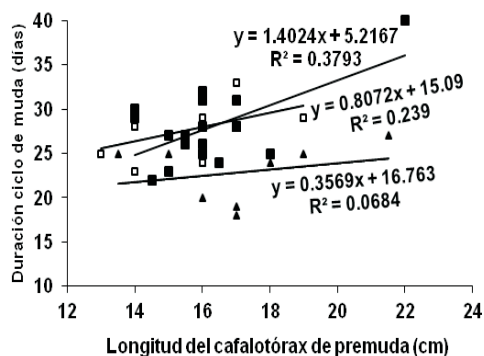


Fig. 7: Relación entre la longitud del cefalotórax en premuda y la duración del ciclo de muda de hembras de *C. caementarius* con pedúnculos intactos (□), con ablación unilateral (■) y ablación bilateral (▲).

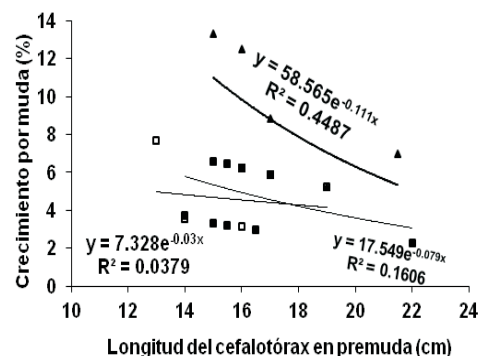


Fig. 8: Relación entre la longitud del cefalotórax en premuda y el crecimiento por muda de hembras de *C. caementarius* con pedúnculos intactos (□), con ablación unilateral (■) y ablación bilateral (▲).

La relación entre la LC_i y el crecimiento por muda, se ajustó a una regresión exponencial negativa (Fig. 8), con baja correlación para las hembras intactas ($r= -0,1948$), con ablación unilateral ($r= -0,4008$) y con ablación bilateral ($r= -0,6699$).

Los parámetros químicos del agua de los tratamientos no tuvieron variación significativa durante el período experimental, siendo el oxígeno de $6,77 \pm 0,04 \text{ mg l}^{-1}$, no hubo CO_2 , el pH fue de $7,79 \pm 0,25$ unidades y la dureza total fue de $187,9 \pm 2,9 \text{ mg l}^{-1}$.

DISCUSIÓN

En condiciones de laboratorio y en época no reproductiva las hembras de *C. caementarius* con pedúnculos oculares intactos y las con ablación unilateral no mostraron signos de maduración ovárica ni fue afectada la duración del ciclo de muda a pesar del incremento de la temperatura del agua (18° a 21°C) en los dos últimos meses, lo cual corrobora lo encontrado en la misma especie¹¹; habiéndose sugerido que el pedúnculo ocular remanente compensa la producción de hormonas que retardan la vitelogénesis y la muda¹⁵. Sin embargo, la maduración ovárica de una sola hembra con ablación unilateral fue contrario a lo reportado en la misma especie¹¹ y en *M. rosenbergii*²². Es probable que factores intrínsecos condicionaron la maduración de la hembra, pues en la época del estudio es menor la actividad reproductiva^{1,2}.

En cambio, la ablación bilateral ocasionó rápida maduración ovárica (25 días) y menor duración del ciclo de muda (22 días) en *C. caementarius*, similar a lo reportado en la misma especie¹², además la despigmentación del cuerpo, sugieren falta de control hormonal pues el pedúnculo ocular es fuente de hormonas que inhiben la vitelogénesis, la muda, y controlan la dispersión de pigmentos, entre otras¹⁵.

La ablación del pedúnculo ocular unilateral o bilateral no alteró la duración de los estados de postmuda AB ni el de intermuda C, lo que sugiere ser una estrategia fisiológica de los camarones en estas condiciones de alteración hormonal, pues ellas deben de reponerse del gasto energético producto de la ecdisis y luego acumular suficientes reservas nutricionales que les permita soportar la subsiguiente maduración o la muda. En cambio, la ablación bilateral ocasionó significativa disminución de la duración del estado D, lo que indica una inminente participación de la hormona de la muda²³.

En los camarones con ablación bilateral, la menor duración de la premuda fue en el subestado D₁ y principalmente en la división D₁' lo que indica que estos serían los principales momentos de activa participación de hormonas que aceleran los procesos metabólicos para conducir al animal hasta la ecdisis, habiéndose reportado en crustáceos la acción de una quitinasa y una fosfatasa en la endocutícula²³, de la N-acetil glusamidaasa B en la degradación de quitina durante el ciclo de muda²⁴ y de remoción de calcio para almacenamiento en el estómago²⁵, que ocasionan que el exoesqueleto sea cada vez más delgado¹⁹; de ahí que cuando los camarones alcanzaron los estados D₂, D₃ y AB ellos no se alimentaron durante siete días, lo cual puede ser de utilidad para calcular la ración

diaria a proporcionar a los camarones en cultivo²⁶.

El mayor crecimiento por muda de *C. caementarius* fue obtenido en camarones ablacionados; es decir, las hembras con ablación unilateral y bilateral crecieron dos y cuatro veces más (4 y 8% en LC, respectivamente) que las hembras con pedúnculos oculares intactos (2 % en LC). Sin embargo, en la misma especie, la ablación bilateral ocasiona el doble de crecimiento por muda¹² y de igual manera en *C. granulatus*²⁷; en cambio en adultos de *Nephrops norvegicus* es del 4% en LC y en juveniles del 9% en LC²⁸. Es probable que el mayor crecimiento obtenido con ablación bilateral en nuestra especie sea por el tipo de alimento empleado, dado la mayor actividad locomotriz que le permitió buscar e ingerir más alimento para satisfacer sus necesidades energéticas, pues como ha sido reportado en *M. rosenbergii*, la ablación produce aceleraciones hormonales y metabólicas²².

Además, la ablación bilateral ocasionó que haya una distribución equitativa de nutrientes tanto para maduración ovárica como para el crecimiento, al observarse ambos procesos en un mismo ejemplar, pero que con el tiempo estas condujeron a la muerte por causas desconocidas y durante la ecdisis, probablemente por las alteraciones fisiológicas de la ablación. En cambio, en las con ablación unilateral solo el 87,5% de las ecdisis produjeron crecimiento y solo una hembra maduró, y en las hembras intactas el 50% de las ecdisis produjeron crecimiento pero ninguna maduró. La falta de crecimiento de algunas hembras podría ser causa del cautiverio que afecta los procesos fisiológicos²⁸ aunque también existen mudas sin incremento de talla o peso²⁹.

Con fines prácticos se ha establecido valores del coeficiente b para definir el tipo de crecimiento en crustáceos decápodos²⁹ como el crecimiento geométrico progresivo ($b > 1,05$), el crecimiento geométrico regresivo ($1,05 > b > 0,95$) y el crecimiento aritmético ($b < 0,95$). El crecimiento por muda de los camarones con pedúnculos oculares intactos y con ablación unilateral fue del tipo geométrico regresivo para la relación LC_i con la LC_f ($b = 1,0314$ y $1,0153$ respectivamente), lo cual significa que el incremento de la LC_f decrece con la LC_i. Similar relación, fue encontrado en *N. norvegicus*²⁸ y en *Artemesia longinaris*³⁰.

Sin embargo, en la relación LC_i y la duración del ciclo de muda, los coeficientes b no son claros probablemente por el tamaño de muestra, aunque las tendencias de las curvas indican que la duración del ciclo de muda aumenta con la LC_f. En cambio, la ablación bilateral alteró completamente las relaciones

entre la LC_i y la LC_{i+1} y entre la LC_i y la duración del ciclo de muda, en donde la regresión fue del tipo aritmético ($b = 0,9081$ y $0,3569$, respectivamente), es decir que el crecimiento de la LC_i y la duración del ciclo de muda en estas hembras fueron independientes de la LC_i . De igual manera la relación entre la LC_i y el crecimiento por muda, que se ajusta a una regresión exponencial negativa, demuestra una pronunciada disminución del crecimiento por muda en individuos de mayor LC_i . Es conveniente ampliar el número de hembras para obtener mejores ajustes en los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

La ablación unilateral del pedúnculo ocular en hembras de *C. caementarius* no afectó la maduración ovárica (29 días) ni la duración del ciclo de muda (28 días), solo ocasionó reducido crecimiento (4% en LC) y moderada mortalidad (40%). En cambio, la ablación bilateral ocasionó maduración temprana (25 días), menor duración del ciclo de muda (22 días), mayor crecimiento (8% en LC), alta mortalidad (65%), pero alteró las relaciones morfométricas de los camarones.

La ablación unilateral y bilateral del pedúnculo ocular no alteró la duración de los estados de muda AB ni C, pero la ablación bilateral redujo la duración del estado D, principalmente la división D_1' .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Yépez V, Bandín R. Evaluación del recurso camarón de río *Cryphiops caementarius* en los ríos Ocoña, Majes-Camaná y Tambo, Octubre 1997. *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*. 1997; 77: 3-25.
- Viacava M, Aitken R, Llanos L. Estudio del camarón de río en el Perú. 1975-1976. *Bol. Inst. Mar Perú*. 1978; 3 (35): 161-232.
- Lip GB. Primera madurez sexual del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina, 1782 (Natantia, Palaemonidae) en el río Moche. Tesis Bachiller. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1976.
- Vegas M, Ruiz L, Vega A, Sánchez S. El camarón *Cryphiops caementarius* (Palaemonidae): desarrollo embriológico, contenido estomacal y reproducción controlada. Primeros resultados. *Rev. Lat. Acui*. 1981; 19: 11-23.
- Álvarez CG. Efectos de temperatura y salinidad en el desarrollo de los primeros estados larvales de *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Decapoda: Palaemonidae). Tesis. Universidad Católica del Norte. Chile. 1998.
- Yano I, Tsukimura B, Nweeney JN, Wyban JA. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. *J. World Aquaculture Soc.* 1988; 19 (4): 204-209.
- Hoang T, Lee SY, Keenam CP, Marsden GE. Effect of light intensity on maturation and spawning of ablated female *Penaeus merguensis*. *Aquaculture*. 2002; 209: 347-358.
- Díaz AC, Souza LC, Cuartas EI, Petriella AM. Growth molt and survival of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea) under different light-dark condition. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porta Alegre. 2003; 93 (3): 249-254.
- López LS, Medesani DA, Rodríguez EM. Inducción de la maduración ovárica en hembras prepúberes del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Brachyura). En II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>). 2003: 735-742.
- Oliveira PS, Correa AM. Avaliação do efeito de serotonina (5-HT) e da monoamina do pedúnculo ocular na indução da maturação avariana de *Penaeus penicillatus* (Alcock, 1905). *Rev. Brasil. Biol.* 1999; 59 (2): 351-359.
- Halder DD. Induced maturation and breeding of *Penaeus monodon* Fabricius under brackish water pond condition by eye-stalk ablation. *Aquaculture*. 1978; 15: 171-174.
- Aktas M, Kumlu M. Gonadal maturation and spawning of *Penaeus semisulcatus* (Penaeidae: Decapod). *Tr. J. of Zoology*. 1999; 23: 61-66.
- Reyes WE, Pilco M, Olórtégui K. Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular en la maduración ovárica y en el ciclo de muda de *Cryphiops caementarius* Molina 1872 (Decapoda, Palaemonidae), en laboratorio. En I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>). 2002: 681-687.
- Verástegui A, Ruiz L. Efectos de la ablación de tallos oculares en el desarrollo gonadal del camarón de río *Cryphiops caementarius*. *Anales Científicos UNALM XXIII*. 1985: 117-126.
- Huberman A. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*. 2000; 191: 191-208.
- Sardá F. La reproducción de los crustáceos. Fisiología: factores de regulación de la reproducción. Potencial reproductivo. En Espinoza J, Labarta U (Edit.). *Reproducción en acuicultura*. Edit. Industria Gráfica España, S.A. Madrid. 1987: 251-295.
- Hickman CP, Robert LS, Larson A.

- Zoología. Principios integrales*. Edit. Mc.Graw-Hill. Interamericana de España, S.A. 1994: 539-542.
18. Guerra A. Biología reproductiva de *Macrobrachium gallus* Holthuis, 1952 (Decapoda, Palaemonidae). Trabajo de Habilitación. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1974.
 19. Reyes WE, Luján H. Estados y subestados del ciclo de muda del "camarón de río" (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). En II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>). 2003: 808-817.
 20. Fukushima M, Sifuentes G, Saldaña G, Castillo G, Reyes J, Shimokawa L. Métodos limnológicos. Dpto. Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 1982.
 21. Steel RG, Torrie JH. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2da. Edic. Mc Graw-Hill. Interamericana de México, S.A. 1988.
 22. Pérez MA, Luna J. Efecto de la ablación unilateral del pedúnculo ocular sobre el balance energético de juveniles del langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea: Palaemonidae). *Universidad Ciencia y Tecnología*. 1995; 4 (1): 10-17.
 23. Van Wormhoudt A, Bellon-Humbert C. 1996. Base biológicas del cultivo de crustáceos: Muda. En Barnabé G. (Ed.). *Base biológicas y ecológicas de la acuicultura*. Edit. Acribia. p. 237-249.
 24. Peters G, Saborowski R, Buchholz F, Mentlein R. 1999. Two distinct forms of the chitin-degrading enzyme N-acetyl-β-D-glucosamidase in the Antarctic krill: specialists in digestion and moult. *Marine Biology* 134: 697-703.
 25. Wheatly M, Zhang Z, Weil JR, Rogers JV, Stiner LM. 2001. Novel subcellular and molecular tools to study Ca²⁺ transport mechanisms during the elusive moulting stage of crustaceans: Flow cytometry and polyclonal antibodies. *J. Exp. Biol.* 204: 959-966.
 26. Vega-Villasante F, Nolasco-Soria H, Civera-Cerecedo R, González-Valdés R, Oliva-Suárez M. Alternativa para la alimentación del camarón en cultivo: El manejo de la muda. En Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olivera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R. (Eds.) *Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
 27. Zapata V, López L, Rodríguez E. Inducción de crecimiento en juveniles del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Brachyura). En II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>). 2003: 971-977.
 28. Sardá F. Estudio de la edad, crecimiento y frecuencia de muda, en cautividad, de *Nephrops norvegicus* (L.) del mar de Cataluña. *Inv. Pesq.* 1985; 49 (2): 139-154.
 29. Petriella AM. Estudio sobre la fisiología de la muda del camarón *Artemesia longinaris* Bate. II. Crecimiento y frecuencia de muda. *Rev. Lat. Acui.* 1986; 29: 11-21.
 30. Petriella AM, Boschi EE. Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Invest. Mar. Valparaíso*. 1997; 25: 135-157.

Correspondencia:

Walter E. ReyesAvalos

Dirección:

Ca. Chiclayo 256 Urb. Aranjuez. Trujillo. Perú.

Cel.

989993299

Email:

wreyes_avalos@yahoo.com

Nuevos registros de Pteridophyta en la región San Martín - Perú

New records of Pteridophyta from the region San Martin - Peru

**Peláez-Peláez, Freddy¹; Alarcón-Rojas, Narda²;
Vergara-Medrano, Segundo³; Torres-Delgado, Jorge⁴.**

RESUMEN

Se reportan 25 especies y una variedad de Pteridophyta como nuevos registros para la región San Martín, con lo que suman 611 especies, lo que permitiría indicar que es la región con mayor riqueza en estas plantas en Perú. *Oleandra* se reporta por primera vez para esta Región con dos especies; *Asplenium*, *Hymenophyllum*, *Lindsaea*, *Pteris* y *Trichomanes*, tienen 2 especies cada uno; *Adiantum*, *Alsophila*, *Ceradenia*, *Cheiroglossa*, *Dicranoglossum*, *Elaphoglossum*, *Grammitis*, *Huperzia*, *Ophioglossum*, *Polybotrya*, *Schizaea*, *Tectaria* y *Thelypteris* tienen 1 especie. *Grammitis longipinnata*, es considerada endémica para el Perú.

Palabras clave: Pteridophyta, San Martín.

ABSTRACT

25 species and a variety of Pteridophyta are reported as new records to the San Martín Region, bringing the total to 611 species, which would indicate that the region is richer in these plants in Peru. *Oleandra* is first reported for this Region with two species; *Asplenium*, *Hymenophyllum*, *Lindsaea*, *Pteris* and *Trichomanes* present two species, *Adiantum*, *Alsophila*, *Ceradenia*, *Cheiroglossa*, *Dicranoglossum*, *Elaphoglossum*, *Grammitis*, *Huperzia*, *Ophioglossum*, *Polybotrya*, *Schizaea*, *Tectaria* and *Thelypteris* present one specie. *Grammitis longipinnata*, is endemic to Peru.

Key words: Pteridophyta, San Martín.

¹ Facultad de ciencias Biologicas Universidad Nacional de Trujillo.

² Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo - Cajamarca.

³ Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia, Pucallpa. Perú.

⁴ Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto. Perú.

Presentado el 05.07.2011, aprobado el 13.10.2011.

Las Pteridophyta o helechos y plantas afines, como se les denominaba tradicionalmente, ahora están clasificadas en dos grandes grupos monofiléticos: Lycophyta y Monilophyta. Las Lycophyta (Licopodiofitas), presentan micrófilas, esporangios axilares en las hojas y con dehiscencia distal y completa y Monilophyta (monilofitas) con megáfilas y esporangios variados, pero nunca axilares.^{1,2,3,4}

En la actualidad se calcula que existen de 10 000 a 12 000 especies de Pteridofitos reunidos en 232 géneros y 38 familias.^{5,6,7,8} Estas plantas se distribuyen desde las selvas tropicales hasta los círculos polares, pero son más diversas y abundantes en los bosques tropicales húmedos de las zonas montañosas, entre los 1500 y 2500 metros, aunque pueden crecer en hábitats secos y soleados.^{5,9,10,11,12,13} El Perú tiene 1195 especies de Pteridophyta entre nativas y adventicias⁸, abarcando a la mayoría de géneros de América y alrededor de un tercio de las especies del Neotrópico.¹⁴

El material biológico se colectó durante los años 2008, 2009 y 2010, en el bosque Pablo Yacu, Provincia de Moyobamba, (UTM 18 284646 – 9329315); con altitudes comprendidas entre 800 y 1700 m.s.n.m. y un área de 200 hectáreas.¹⁵

La determinación del material se hizo con las claves taxonómicas y descripciones presentadas en “*Pteridophyta of Peru*”^{6,14,16,17,18,19}. El arreglo de Ordenes y Familias se hace de acuerdo con “*A classification for extant ferns*” y “*Fern classification*”^{2,3} para helechos (Monilofita) y “*Flora Mesoamericana*”²⁰ para Licofita. Las muestras de respaldo se encuentran depositadas en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo, Herbarium Truxillense (HUT). Adicionalmente, se presentan fotografías de sólo 19 especies consideradas, por considerarlas más llamativas y con detalles conspicuos.

Se considera la distribución de las especies en las regiones de Perú, indicando el rango altitudinal. Las abreviaturas de las regiones corresponden a: AM: Amazonas, AP: Apurímac, AY: Ayacucho, CA: Cajamarca, CU: Cusco, HU: Huánuco, HV: Huancavelica, JU: Junín, LL: La Libertad, LO: Loreto, MD: Madre de Dios, PA: Pasco, PU: Puno, SM: San Martín, UC: Ucayali.

Las 25 especies (20 géneros) y una variedad de Pteridophyta considerados nuevos registros para la Región San Martín son:

CLASE LYCOPODIOPSIDA

ORDEN LYCOPODIALES

Familia Lycopodiaceae

1. *Huperzia myrsinites* (Lam.) Trev.
CA, LL, SM. 2500 m.s.n.m.¹⁴
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 563.
(Fig. 1B)

CLASE PSILOTOPSIDA

ORDEN OPHIOGLOSSALES

Familia Ophioglossaceae

2. *Ophioglossum palmatum* L.
AM, CU, HU, PA, SM. 1000-2450
m.s.n.m.⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 571.
(Fig. 1A)

CLASE POLYPODIOPSIDA

ORDEN HYMENOPHYLLALES

Familia Hymenophyllaceae

3. *Hymenophyllum lobatoalatum* Klotzsch
HU, LO, SM. 600-1300 m.s.n.m.⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 581.
(Fig. 1C)
4. *Hymenophyllum undulatum* (Sw.) Sw.
AM, HU, JU, PU, SM. 1250-4100
m.s.n.m.⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 561.
(Fig. 1D)
5. *Trichomanes polypodioides* L.
CU, HU, JU, LO, MD, PA, SM. 350-2300
m.s.n.m.⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 549.
(Fig. 1E)
6. *Trichomanes vandenboschii* Windisch
CU, SM. 750- 1800 m.⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 550

ORDEN SCHIZAEALES

Familia Schizaeaceae

7. *Schizaea poeppigiana* J. W. Sturm
HU, UC, SM. 1300 m.s.n.m.²¹
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 524.
(Fig. 1F)

ORDEN CYATHEALES

Familia Cyatheaceae

8. *Alsophyla cuspidata* (Kunze) Conant
AM, AY, CU, HU, JU, LO, MD, PU, SM,
UC. 150-900 (2200) m.s.n.m.⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 494

ORDEN POLYPODIALES

Familia Lindsaeaceae

9. *Lindsaea lancea* (L.) Bedd.
AM, CU, HU, JU, LO, MD, PA, SM, UC,
100-1600 m.s.n.m.¹⁷
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 435.
(Fig. 1 G)
10. *Lindsaea ulei* Christ.
LO, SM. 150 m.s.n.m.¹⁷
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 514.
(Fig. 1 H)

Familia Pteridaceae

11. *Adiantum pulverulentum* L.
CU, HU, JU, MD, LO, PA, SM. 100-1800
m.s.n.m.¹⁷
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 393, 400.
12. *Pteris muricata* Hooker
AP, CA, CU, HV, HU, JU, PA, PU, SM.
1700-4000 m.s.n.m.¹⁷
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 399.
13. *Pteris tripartita* Sw.
LO, SM, UC. 200-1000 m.s.n.m.¹⁷
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 500.
(Fig. 1 I)

Familia Aspleniaceae

14. *Asplenium tricholepis* Rosenst.
AM, CU, HU, JU, PA, SM. 800-2100
m.s.n.m.¹⁹
Ejemplar: F. Peláez P. et al. 2226.
15. *Asplenium tuerckheimii* Maxon
CU, JU, SM. 600 a 1 500 m.s.n.m.¹⁹
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 541.
(Fig. 2 A)

Familia Thelypteridaceae

16. *Thelypteris tetragona* (Sw.) Small
SM, Departamento desconocido.¹⁶
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 403.
(Fig. 2 B)

Familia Dryopteridaceae

17. *Elaphoglossum glabellum* John Sm.
CU, HU, JU, LO, MD, SM. 130-1800
m.s.n.m.¹⁸
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 535.
(Fig. 2 C)
18. *Polybotrya altescandens* C. Chr.
HU, LO, SM. 800-2500 m.s.n.m.¹⁸
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 474.
(Fig. 2 D)
19. *Polybotrya apressa* R. C. Morán
CA, SM. 100-1600 m.s.n.m.¹⁸
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 599

Familia Tectariaceae

20. *Tectaria lizarzaburui* (Sodiño) C. Chr.
AM, AY, CA, JU, PA, SM. 1000-2000
m.s.n.m.¹⁸

Ejemplar: F. Peláez P. et al. 2235.

Familia Oleandraceae

21. *Oleandra articulata* (Sw.) Presl
HU, JU, PA. 1330-1700 m.s.n.m.¹⁸
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 552; 572.
(Fig. 2 E)
22. *Oleandra lehmanii* Maxon
HU, PA, SM. 1480-2500 m.s.n.m.¹⁸
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 554; 575.
(Fig. 2 F)

Familia Polypodiaceae

23. *Ceradenia meridensis* (Klotzsch)
Copel.
HU, JU, PA, SM. 1500-3600 m.s.n.m.¹⁹
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 576.
(Fig. 3 A)
24. *Dicranoglossum subnudum* (C. Chr.)
Stolze
AM, HU, JU, SM. 700-1550 m.s.n.m.¹⁹
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 521.
(Fig. 3 B)
25. *Grammitis longipinnata* (Copel.) Lell.
CU, SM. 2750-3250 m.s.n.m.¹⁹
Ejemplar: N. Alarcón R. et al. 589.
(Fig. 3 C)
26. *Pecluma camptophyllaria* var.
lachnifera (Hieron.) Lell.
AM, AY, CA, CU, HU, JU, PU, SM. 1000-
2900 m.s.n.m.¹⁹
Ejemplares: N. Alarcón R. et al. 544-
545. (Fig. 3 D) La presente
investigación incrementa la cifra de
especies de Pteridophyta para la región
San Martín en 25 especies y una
variedad, las cuales están reunidas en
20 géneros y 13 familias. Con este
aporte la Región San Martín posee un
total de 611 especies, incluyendo a
*Elaphoglossum molle*²² y 71 especies
registradas en el Parque Nacional Río
Abiseo²³, que viene a ser más del 50 %
del total de especies reportadas para el
Perú⁸, ubicándose como la región más
diversa del país, por lo que debe ser
considerado como área protegida
como propone León.²⁴

Oleandra es reportado por primera vez para la Región de San Martín con dos especies (*O. articulata*, *O. lehmanii*); *Grammitis longipinnata* es considerada endémica de Perú. Además se amplía el rango de distribución en Perú de 5 especies, como es el caso de *Lindsaea ulei*, *Polybotrya apressa*, *Grammitis longipinnata*, *Trichomanes vandebooschii*; que eran citadas para un departamento. De *Thelypteris tetragona*, indican su presencia pero sin indicar el departamento.^{6,16,17,18,19.}

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Øllgaard, B. Los helechos del sur de Ecuador. En *Botánica Austroecuatorial*. Edic. Abya Yala. Ecuador. 2002
2. Smith, A.; K. Pryer; E. Schuettpelz; P. Korall; H. Schneider & P. Wolf. A. Classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705–731. 2006.
3. Smith, A.; K. Pryer; E. Schuettpelz; P. Korall; H. Schneider & P. Wolf. Fern Classification. In Ranker, T.A. & Haufler, C. *Biología and Evolution of Ferns and Licophytes* Cambridge University Press. New York. U.S.A. pp. 417-467. 2008.
4. Salino, A. & T.E. Almeida. Diversidade e conservação das pteridófitas na Cadeia do Espinhaco, Brasil. *Megadiversidade*. 4(1-2): 50-70. 2008.
5. Tryon R. & A. Tryon. *Ferns and allied plants*. New York Heidelberg Berlin, 1982
6. Tryon R. & R. Stolze. *Pteridophyta of Perú Part I. 1. Ophioglossaceae – 12. Cyatheaceae*. *Fieldiana Bot. N.S.* 20:1–145. 1989^a.
7. Navarrete H. *Helechos Comunes de la Amazonía Ecuatorial*. Editorial Simbioe. Quito. Ecuador. 2001.
8. Smith, A.; B. León; H. Tuomisto; H. van der Werff; R. Morán; M. Lehnert & M. Kessler. New records of Pteridophytes for the flora of Perú. *SIDA* 21(4):2321 – 2342. 2005.
9. Morán R. Los géneros de helechos neotropicales. Guía para estudiantes. Depto. de Botánica Sistemática, Univ. De Aarhus, Dinamarca. La Paz, Bolivia. 1994.
10. Cárdenas G.; C. Aramburu; L. Castro; A. García; A. Zegarra & M. Flores. Evaluación de Pteridofitos en bosques de la zona reservada Allpahuayo-Mishana y Santa Rosa, LO. *Folia Amazónica*. 14(1) -111.116. 2003.
11. Soria-Auza, R & M. Kessler. Estado del conocimiento y conservación de los helechos y plantas afines en Bolivia. *Ecología en Bolivia*. 42(2): 136-147. 2007.
12. Pérez, B.; R. Riba & I. Reyes. Helechos mexicanos: formas de crecimiento, hábitat y variantes edáficas. *Contactos* 11:22-27. 1995.
13. Riba, R. & B. Pérez-García. *Morfología de gametofitos de helechos*. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico. 2002.
14. Tryon, R.M y R. G. Stolze. *Pteridophyta of Perú Part VI. 22. Marsileaceae – 28. Isoetaceae*. *Fieldiana Bot. N.S.* 34:1 – 123. 1994.
15. Tuesta, T. Valoración de ecosistema natural y su impacto en bosque secundario fundo “Pablo Yacu”. Tesis Ingeniero Ambiental UNSM-FE. 2007.
16. Tryon, R. & R. Stolze. *Pteridophyta of Perú Part III. 16. Thelypteridaceae*. *Fieldiana Bot. N.S.* 29:1 – 80. 1992.
17. Tryon, R. & R. Stolze. *Pteridophyta of Perú Part II. 13. Pteridaceae – 15. Dennstaedtiaceae*. *Fieldiana Bot. N.S.* 22:1 128. 1989b.
18. Tryon, R. & R. Stolze. *Pteridophyta of Perú Part IV. 17. Dryopteridaceae*. *Fieldiana Bot. N.S.* 27:1 – 176. 1991.
19. Tryon, R. & R. Stolze. *Pteridophyta of Perú Part V. 18. Aspleniaceae – 21. Polypodiaceae*. *Fieldiana Bot. N.S.* 32:1 – 190. 1993.
20. Moran R. & Riva R. *Flora Mesoamericana. Psilotaceae a Salviniaceae. Volumen 1*. Universidad Autónoma de Mexico. Mexico 1995.
21. León, B., Beltrán, H., Fine, P. Sobre el género *Schizaea* en el Perú. *Rev. Peru. Biol.* 12(1): 97-102. 2005.
22. Mellado, L. & B. León. Nuevos registros y observaciones de algunas especies de *Elaphoglossum* (*Elaphoglossaceae*) del Perú. *Rev. Peru. Biol.* 14(1): 21-23. 2007.
23. León, B.; K. Young; J. Roque & A. Cano. Nuevos Registros de plantas de la zona alta del Parque Nacional Río Abiseo, Peru. *Arnaldia* 17(1):51-83. 2010.
24. León B. Propuesta de áreas importantes para la conservación de la diversidad de Pteridofitos en el Perú. En: Rodríguez, L. *Diversidad Biológica del Perú, zonas prioritarias para su conservación*. MINAG. INRENA. Lima. Perú. 1995.

Correspondencia:

Freddy Peláez Peláez

Dirección:C-7 urb. Las Capullanas
Trujillo-Perú**Teléfono:**

Rpm: #990 288 454

Email:

fppelaez@unitru.edu.pe

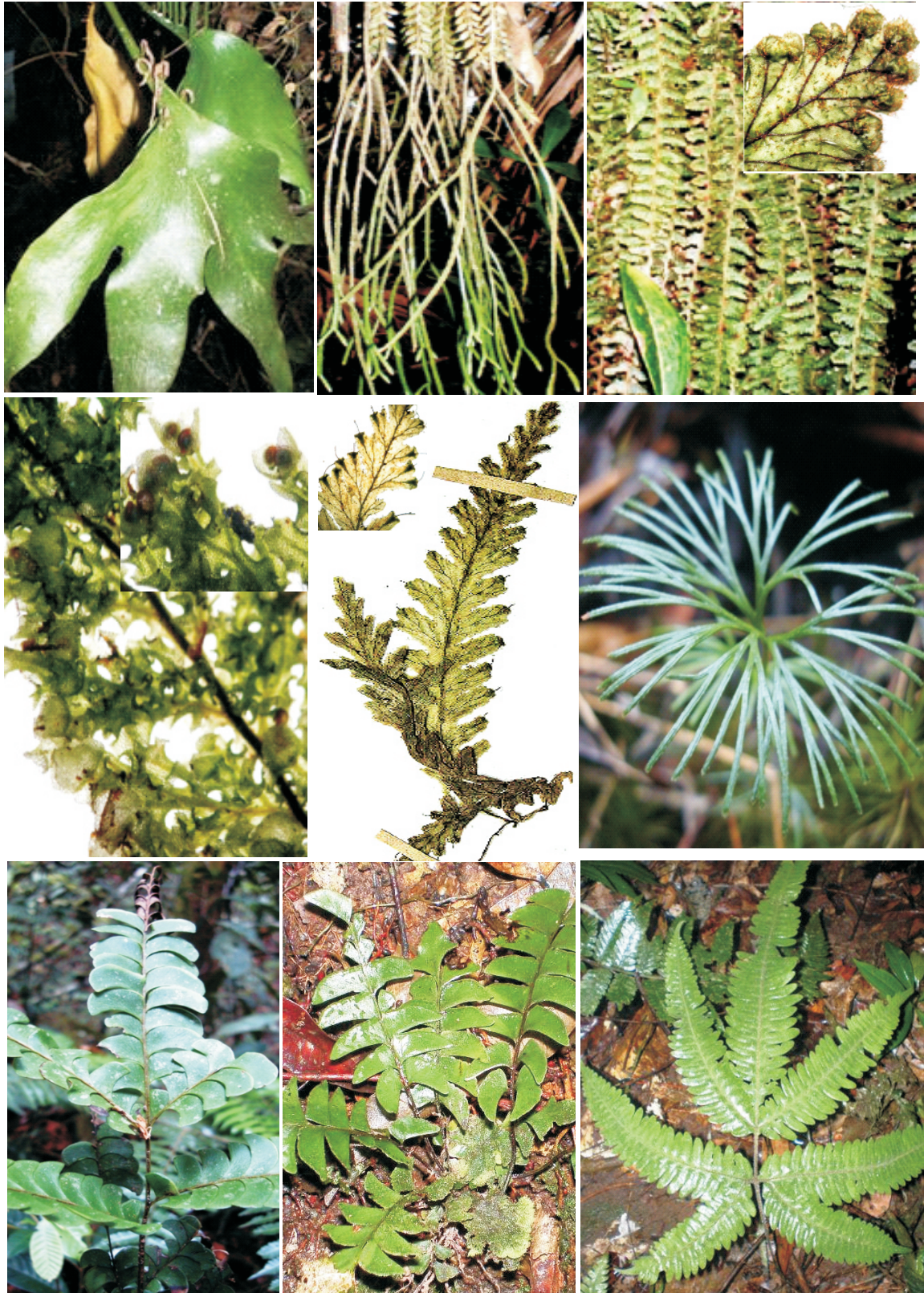


Fig. 1: A. *Ophioglossum palmatum* L. B. *Huperzia myrsinites* (Lam.) Trev. C. *Hymenophyllum lobatoalatum* Klotzsch D. *Hymenophyllum undulatum* (Sw.) Sw. E. *Trichomanes polypodioides* L. F. *Schizaea poeppigiana* J. W. Sturm G. *Lindsaea lancea* (L.) Bedd. H. *Lindsaea ulei* Christ. I. *Pteris tripartita* Sw.



Fig. 2: A. *Asplenium tuerckheimii* Maxon. B. *Thelypteris tetragona* (Sw.) Small C. *Elaphoglossum glabellum* John Sm. D. *Polybotrya altescandens* C. Chr. E. *Oleandra articulata* (Sw.) Presl F. *Oleandra lehmanii* Maxon



Fig. 3: **A.** *Ceradenia meridensis* (Klotzsch) Copel. **B.** *Dicranoglossum subnudum* (C. Chr.) Stolze **C.** *Grammitis longipinnata* (Copel.) Lell. **D.** *Pecluma camptophyllaria* var. *lachnifera* (Hieron.) Lell.

Atención Farmacéutica: elemento clave en el diseño de la carrera de Licenciatura en Farmacia en Cuba (I).

Pharmaceutical Care: key element to the Pharmacy curriculum designing in Cuba (I).

Martínez-Sánchez, Alina de las Mercedes¹;

Piminchumo- Carranza, Ramón².

RESUMEN

Este primer artículo de una serie de tres, presenta la experiencia de la Educación Superior Cubana en el proceso de implementación de la Atención Farmacéutica en la enseñanza de Farmacia, como resultado de una investigación pedagógica desarrollada en el Centro de Estudios de Educación Superior "Manuel F. Gran" de la Universidad de Oriente, con la aprobación del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba, como respuesta a la necesidad de fortalecer la formación del profesional farmacéutico para su desempeño como parte activa del equipo de salud responsable por la atención del paciente, dado el constante perfeccionamiento del Sistema de Salud Cubano. Se presenta una visión panorámica del marco histórico-lógico que caracteriza la investigación, al determinar las principales tendencias de la formación del profesional farmacéutico en la Educación Superior Cubana, con énfasis en la formación clínica como corresponde al campo de acción de la investigación. Se realiza una caracterización gnoseológica y pedagógica del perfil clínico de la profesión farmacéutica, al tiempo que se caracteriza el llamado tercer período de desarrollo de la profesión farmacéutica, donde se define la responsabilidad sobre el paciente y su farmacoterapia, conformando de este modo las bases teóricas para el desarrollo de este trabajo.

Palabras clave: Atención farmacéutica, currículo, educación en farmacia.

ABSTRACT

This first article of a series of three presents the experience of the Cuban Higher Education in the process of implementation of pharmaceutical care in Pharmacy curriculum, as a result of an educational research developed at the Center for the Study of Higher Education "Manuel F. Great" at the University of Oriente with the approval of the Ministry of Science, Technology and Environment of the Republic of Cuba. This first part presents an overview of the historical and logical framework that characterizes the research, identifying the main trends in the Cuban pharmacy education, with emphasis on clinical training for the scope of the investigation. A characterization of the epistemological and pedagogical clinical profile is developed and Pharmaceutical Care philosophy is described to structure the theoretical background for this work.

Key words: Pharmaceutical Care, curriculum, pharmacy education.

¹ Docente de la Universidad San Jorge. España.

² Docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNT. Perú.

Presentado el 05.10.2010, Aprobado el 25.08.2011.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la evolución de la práctica farmacéutica, que con la creciente producción industrial de los medicamentos, se ha dejado cada vez menos funciones de formulación magistral al farmacéutico, al mismo tiempo que identifica cada vez más su función social en la industria, en los análisis clínicos y sanitarios, en la farmacia hospitalaria y en la comunitaria; y es en esta última práctica donde se reconoce la necesidad de impulsar la práctica profesional farmacéutica como un servicio profesional único, pero igualmente complementario dentro de un equipo sanitario, donde el paciente es el principal beneficiario de las acciones del farmacéutico; de aquí surge la idea de impulsar la denominada Atención Farmacéutica (Pharmaceutical Care), que permite asegurar resultados terapéuticos óptimos en el uso de los medicamentos mediante la participación farmacéutica activa como miembro del equipo de salud, colaborando en un mismo nivel con médicos, odontólogos, enfermeros y otros prestadores de atención sanitaria profesional¹.

La Atención Farmacéutica (AF) fue definida por Hepler y Strand² como «la provisión responsable de farmacoterapia, con el propósito de conseguir unos determinados resultados que mejoren la calidad de vida del paciente». A partir de 1993, este nuevo concepto aplicado a la práctica farmacéutica se extendió fuera de EEUU y, de hecho, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Federación Internacional Farmacéutica (FIP), han publicado sendos documentos en los que consideran el modelo de AF como aquel que permitiría desarrollar mejor las funciones sanitarias hoy exigidas a los farmacéuticos³. La actividad de atención es una relación de búsqueda y respuesta a las necesidades del paciente, todas las funciones contenidas dentro de esta concepción, a diferencia de las definiciones anteriores, están centradas en el paciente. Para la ejecución de las mismas, la educación farmacéutica debe facilitar la adquisición de conocimientos, habilidades y actitudes inherentes a esa actividad⁴.

Los farmacéuticos están en la interfaz entre la investigación y el desarrollo, el fabricante, el prescriptor, el paciente y el medicamento mismo. La OMS ha exigido una mayor participación del farmacéutico en el sistema general de asistencia sanitaria y un uso más amplio de su extensa experiencia académica. En su declaración política, la FIP indica que los cambios en el papel del farmacéutico se deben reflejar en la formación básica y continua del mismo, y con mayor enfoque en el aprendizaje del estudiante. El nuevo paradigma de la

farmacia requiere que los farmacéuticos sean más que expertos en química y tecnología farmacéuticas. Tienen que entender y aplicar los principios que hay detrás de todas las actividades necesarias para manejar la farmacoterapia⁵. El impacto de la Atención Farmacéutica se ha visto también reflejado en la educación farmacéutica en América Latina, manifiesto en las modificaciones realizadas en los programas de estudio de países como Chile y Brasil, a través de la introducción de materias que contribuyen a la formación del farmacéutico para este ejercicio^{6,7}.

A pesar de la actualidad del concepto atención farmacéutica, y de los ingentes esfuerzos por generalizar su práctica, aún sigue siendo una interrogante cómo llevar esta filosofía a la enseñanza universitaria y producir un farmacéutico capaz de proveer este nivel de atención con el grado de competencia y compromiso social que demandan nuestros pacientes.

Esta serie de tres artículos presenta la experiencia de la Educación Superior cubana en el proceso de implementación de la Atención Farmacéutica en la enseñanza de Farmacia, como resultado de una investigación pedagógica desarrollada en el Centro de Estudios de Educación Superior "Manuel F. Gran" de la Universidad de Oriente, con la aprobación del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba, como respuesta a la necesidad de fortalecer la formación del profesional farmacéutico para su desempeño como parte activa del equipo de salud responsable por la atención del paciente, dado el constante perfeccionamiento del Sistema de Salud Cubano.

Esta primera parte, presenta una visión panorámica del marco histórico-lógico que caracteriza la investigación, al caracterizar las principales tendencias de la formación del profesional farmacéutico en la Educación Superior Cubana, con énfasis en la formación clínica como corresponde al campo de acción de la investigación. Se presenta una caracterización gnoseológica y pedagógica del perfil clínico de la profesión farmacéutica, para evidenciar la excelencia con la que se exhibe a través de este ejercicio, el valor social de la profesión farmacéutica. Se hace énfasis en lo que se ha dado en llamar la tercera etapa de desarrollo de la profesión farmacéutica, donde se define la responsabilidad sobre el paciente y su farmacoterapia, conformando de este modo las bases teóricas para el desarrollo de este trabajo.

Elementos de diseño y metodología aplicados en la investigación

Conviene aclarar que los términos Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica son distintos, y aunque sus definiciones están evolucionando en varios sentidos; por ejemplo en Europa, no pueden ser equiparadas. Como materias de nivel de pregrado no son partes intercambiables del vocabulario farmacéutico. No es posible re-etiquetar una asignatura o disciplina de Farmacia Clínica con el término Atención Farmacéutica y producir un currículo coherente académica y profesionalmente⁸.

Dada la importancia de la atención farmacéutica en el futuro de la farmacia numerosas publicaciones señalan que "desde muy al principio, los estudiantes de farmacia deberían estar al tanto de esto por su inclusión en el currículo. Cuando se plantea la interrogante de quiénes tienen que asumir la responsabilidad del nuevo paradigma de la farmacia, se señala: "la Universidad, a través de las facultades de farmacia, siempre en el primer envite, porque no existe otra alternativa. Es una responsabilidad inherente a la esencia universitaria, en tanto que representa y es la base de cualquier futuro farmacéutico"⁹.

Este trabajo aborda la problemática del perfeccionamiento del currículo de farmacia en dirección al fortalecimiento del perfil clínico en aras de lograr un mejor desempeño del profesional farmacéutico en la solución de los problemas de su competencia que se presentan en el sector asistencial.

Para enunciar dicho problema se entrevistaron profesionales farmacéuticos ubicados en el sector asistencial, miembros de la Comisión Nacional de Carreras de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas y estudiantes de 4to, y 5to años de dicha carrera en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana y en la Universidad de Oriente, respectivamente. Se precisa como **objeto** de investigación el proceso de formación clínica en la carrera de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas, y como **objetivo**, el diseño de una disciplina que garantice la formación del modo de actuación profesional en atención farmacéutica, sobre la base de un modelo que tenga en cuenta este concepto como paradigma de práctica profesional. Ello permite precisar como el **campo de acción**, el diseño curricular de una disciplina que forme el perfil clínico.

La **idea a defender**, se enuncia de la siguiente forma:

El diseño de la disciplina Atención Farmacéutica Integral de la carrera de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas responde a las exigencias de este nuevo modelo de práctica entendido como un modo de actuación profesional, en tanto:

Parte de reconocer y evidenciar las

características propias de la profesión que tienen que ver con el perfil clínico.

☒ Incorpora al proceso de diseño curricular de dicha disciplina el método profesional, entendido como el proceso de atención farmacéutica.

☒ Introduce los aspectos profesionales relacionados con las actitudes, las conductas y la ética profesional, sintetizados en el valor profesional esencial.

Todo ello permite elaborar el programa de la disciplina en correspondencia con el encargo social expresado en el nuevo modelo y contribuir a superar las insuficiencias actuales en la formación de este profesional.

En tal sentido, la presente investigación se desarrolla en los momentos en que la farmacia como profesión, se encuentra inmersa en una lucha tenaz por lograr su re-profesionalización. En correspondencia con esto, la formación del profesional farmacéutico para su desempeño en el sector asistencial a través del ejercicio de las funciones clínicas de la profesión, se convierte en los momentos actuales en una demanda social, en tanto que responde a los actuales planes de desarrollo de la Farmacia, concretados en el Proyecto de la Farmacia Principal Municipal, en el cual se contempla la existencia de un farmacéutico clínico como parte de los recursos humanos destinados al servicio a la población¹⁰; ello evidencia un acercamiento al reconocimiento, por parte de las autoridades sanitarias, del papel que al profesional farmacéutico corresponde en el mantenimiento de la salud humana, en concordancia con su formación para el ejercicio de funciones que tributan a este objetivo y que lo califican como experto en medicamentos, imposible de ser suplantado por especialidades médicas (Médico Especialista en Farmacología) cuyos objetivos responden a una formación para la docencia.

Es importante considerar que la universidad en su objetivo de contribuir a la solución de los problemas sociales, ha de tener en cuenta las particularidades de su entorno. En tal sentido, la presente investigación se desarrolla en la zona oriental del país, donde el eslabón de base de la profesión está mayormente representado por el sector asistencial (Oficina de Farmacia, Servicio Farmacéutico de Hospital). Todo lo anterior evidencia la **actualidad y novedad científica** de la investigación.

El método fundamental empleado es el **teórico** y dentro de éste, el análisis y la síntesis en el diagnóstico realizado, el método histórico-lógico en la determinación de las tendencias históricas en el objeto de estudio y los métodos sistémico-estructural y dialéctico desde la elaboración de la concepción general para el

diseño, hasta su aplicación práctica en el diseño de la disciplina revelando la contradicción esencial que se da en la profesión entre la actividad productiva-administrativa generadora de lo que se comercializa (el medicamento); y los servicios que se dispensan, como expresión verdadera de la materialización del fin que caracteriza e identifica a la Farmacia, como una profesión de sanidad.

En la realización de este trabajo se ha aplicado la investigación empírica para la toma de opiniones y el análisis de la documentación para elaborar los diagnósticos y validar el programa propuesto, así como el método matemático y los respectivos procesamiento estadísticos del diagnóstico y las encuestas aplicadas a los expertos.

El Aporte Teórico Fundamental está en elaborar un modelo de estructuración didáctica del perfil clínico de la profesión farmacéutica, sustentado en la concepción de la atención farmacéutica. La significación práctica estará dada en el programa de la disciplina, bajo un nuevo concepto profesional con la precisión de su sistema de problemas, objetivos y contenidos.

La formación clínica en el contexto de los programas de la Carrera de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas

En Cuba la enseñanza farmacéutica data de 1734, seis años después de la fundación de la Universidad de la Habana, sin que se lograra nunca un reconocido prestigio de la profesión farmacéutica en el país, ni una válida tradición en la enseñanza farmacéutica universitaria, obvio en el hecho de que los planes de estudio no vinculaban el ejercicio docente con las formas didácticas de la enseñanza práctica como elemento fundamental de la educación universitaria, la introducción de novedosas temáticas y disciplinas diferenciadas o especializadas, no se abordaban en los diferentes planes de estudios propuestos y ensayados¹¹.

La base científica necesaria para desarrollar un profesional con habilidades e inquietudes creadoras, no constituía el centro estructural de los estudios farmacéuticos en el país. De hecho, la investigación farmacéutica no existía y el egresado universitario respondía a una formación acorde con las escasas posibilidades socio-profesionales de la época.

En la etapa revolucionaria iniciada en 1959, la carrera se adscribe a la Facultad de Química, en virtud de los nuevos lineamientos de la dirección del país y el movimiento educacional que se produce.

Producto del análisis de una comisión integrada por representantes de organismos y de la propia Universidad de la Habana se consolidó el criterio de conformar un nuevo

profesional, el Licenciado en Bioquímica Farmacéutica, lo que dio lugar a la fundación de la escuela que llevó este mismo nombre. La preparación de este profesional se estructuró sobre la base de un plan de estudios que contemplaba una formación básica en materia bioquímica y físico-química común, y una enseñanza especializada en los últimos dos años, que convergía a una especialización en Tecnología Farmacéutica, para cumplir de esta forma los requerimientos nacionales de consolidar una industria farmacéutica.

Posteriormente, en 1976, producto de la estructura adoptada por la Universidad de la Habana, y en atención a criterios de racionalización organizativa, la enseñanza farmacéutica se adscribió a la Facultad de Biología.

Al valorar las tendencias mundiales, la masividad de los servicios médicos en el país y la jerarquización que se le ofrecía al profesional farmacéutico basándose en los planes de desarrollo en toda la nación, se crea en 1984 la Facultad de Farmacia de la Universidad de la Habana, ampliándose posteriormente la educación farmacéutica a la Universidad de las Villas y a la Universidad de Oriente.

El estudio que se realiza divide a la educación farmacéutica cubana en 3 planes que los denominamos PLANA (1976-1985), PLAN B (1986-1989) y PLAN C (1990 al presente), que están delimitados sólo en la temporalidad.

Tanto los planes A como los B fueron la resultante de un enfoque verticalizado hacia la práctica industrial, obviándose la formación específica en las actividades propias del servicio farmacéutico, aspecto éste en reclamo para el fortalecimiento de los servicios médicos nacionales.

La caracterización del tratamiento de la formación clínica en los planes de estudio de la Carrera de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas en Cuba, se realiza sobre la base de los aspectos siguientes:

- Organización y estructuración de los planes de estudios
- Lugar y enfoque de la actividad clínico farmacéutica en el currículo
- Balance de la actividad práctica en lo referente a la práctica clínico farmacéutica
- Tratamiento a la práctica clínico farmacéutica en el contexto de la Disciplina Principal Integradora.

Plan B: Desde 1986 hasta 1989

La primera característica que debe señalarse es la no existencia de una organización o estructuración disciplinaria en el diseño de la carrera, por lo que se hará referencia al sistema de objetivos y contenidos de las asignaturas que tributan directamente a la

formación clínica del profesional farmacéutico, esto es, Biología Celular, Fisiología, Farmacología, Toxicología, Bioquímica General I y II.

Del análisis de estos programas es posible resumir las características siguientes:

- Imprecisión en el diseño de los objetivos, con omisión de la declaración de su nivel de profundidad.
- Solapamiento de los objetivos y contenidos de las asignaturas, lo que denota insuficiencias en el dominio de las ciencias que las sustentan y los elementos que de éstas deben ser llevados al proceso de enseñanza-aprendizaje.
- No se aprecia en estos programas una orientación hacia la explicación y comprensión por parte del estudiante del fundamento molecular de las acciones farmacológicas de los medicamentos.

En términos generales estas asignaturas se caracterizan por un elevado número de temas, de los cuales se destaca el enfoque que debe ser biológico, en ningún caso se señala el farmacéutico.

Otro rasgo distintivo de estos programas es la precisión de las horas dedicadas a los distintos tipos de clases, así como, de las que el estudiante dedica al estudio independiente y la bibliografía para el estudio de la asignatura.

En estos programas la mayor parte del tiempo se dedica a las actividades teóricas.

En las horas dedicadas a prácticas sólo se precisa la práctica de laboratorio, excepto en Biofarmacia donde se contempla la realización de clases prácticas y seminarios.

En esta etapa, la práctica de producción no garantizaba una adecuada rotación del estudiante por todas las esferas de su actuación profesional.

Plan C. Desde 1990 hasta la actualidad

El diseño curricular de la carrera de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas se sustenta en el Modelo de Procesos Conscientes, en el cual se establece como documento rector del Plan de Estudios el modelo del profesional; se parte de los problemas profesionales, los campos de acción, las esferas de actuación y los modos de actuación, como elementos que permiten precisar el perfil del futuro profesional¹².

En correspondencia con esta concepción en el Anteproyecto de Plan "C" se precisan los elementos anteriores, con excepción de los modos de actuación, lo que evidencia que los mismos no fueron tenidos en cuenta en el proceso de diseño de la carrera.

La primera característica a señalar en esta etapa es la organización disciplinar, como muestra de un mayor carácter de sistema. Dado

el campo de acción de esta investigación, se hará referencia solamente a aquellas disciplinas que por sus objetivos y contenidos contribuyen a la formación clínica del farmacéutico de manera directa: Biofarmacia y Ciencias Biomédicas.

Es distintivo en esta etapa el surgimiento de una disciplina integradora: Práctica Laboral Farmacéutica (PRALAFAR), la cual contiene asignaturas que contribuyen a la formación clínica del farmacéutico. (PRALAFAR II y V).

Se destaca en estos programas la orientación de los objetivos y contenidos hacia su vinculación y posterior aplicación en el campo de la clínica, en respuesta a las demandas de los servicios nacionales de salud.

En esta etapa se pone de manifiesto en el sistema de objetivos, contenidos y habilidades la comprensión de la importancia del paciente como el factor determinante en la calidad del medicamento.

Se incrementa el número de asignaturas, entre las cuales se encuentran Anatomía, y Bioquímica Clínica, que contribuyen directamente a la formación del perfil que se trata en esta investigación. En esta etapa se pone de manifiesto mayor dominio por parte de la Comisión Nacional de Carreras de Farmacia de la categoría objetivo, aunque aún presentan imprecisiones. Igualmente se manifiesta el principio de la derivación gradual de objetivos al señalarse los generales (Programa de las disciplinas) y a partir de éstos los particulares (Programa de asignaturas).

A partir del Plan de Estudios "C" se aprecia la tendencia al incremento de la actividad práctica donde existe, una diferencia notable con el plan anterior, donde dicha actividad era deficiente. Se dirige la formación del profesional hacia aquellas actividades que redunden en un incremento de la efectividad y potencialidad de los servicios de salud, lo que demuestra la comprensión de la importancia de esta actividad y de la responsabilidad del farmacéutico en la realización de las mismas. Aumentan las actividades encaminadas a lograr un dominio integral de los servicios de farmacia comunitaria, hospitalaria y clínica.

No obstante, aunque este modelo representa una concepción más amplia de la actividad farmacéutica, aún predominan las tareas relacionadas con la dirección y administración de Farmacia, así como las relacionadas con la actividad industrial.

Modelos y Metodologías de Diseño Curricular aplicadas en la Educación Superior Cubana

La concepción de los planes de estudios de las carreras en la Educación Superior Cubana se sustentan en el Modelo de los Procesos

Conscientes que se desarrolló sobre la Teoría Didáctica de Álvarez de Zayas en la cual, a partir de los problemas profesionales y con determinada generalización de los mismos, se prevé la determinación del objeto de la profesión que precisa los campos de acción y las esferas de actuación¹³.

Los campos de acción los aspectos esenciales de los conocimientos, la lógica y los métodos de la ciencia que son llevados al proceso docente; y las esferas de actuación las que precisan dónde se manifiesta el objeto, o sea, dónde se requiere la acción de este profesional. Con la ayuda del sistema de leyes y categorías del propio autor, se explica el proceso de formación de profesionales, desde la aplicación de los enfoques sistémico - estructural, dialéctico y genérico, y apoyado en las teorías de la actividad y la comunicación. Dentro de este modelo de diseño curricular, también se identifica el modo de actuación como generalización de los métodos de trabajo del profesional, caracterizando la actuación del profesional independientemente del objeto sobre el cual desarrolla su actividad.

En síntesis, el sujeto, al apropiarse de los modos de actuación es capaz de actuar independientemente de las manifestaciones del objeto de trabajo de su profesión. Sin embargo, en dicho modelo no quedó bien precisa la importancia de los modos de actuación ni su relación con el resto de los componentes del diseño y, en consecuencia, no formaron parte del modelo del profesional. De manera que no se usaron los modos de actuación ni en la concepción del proyecto curricular como tal, ni en su aplicación práctica.

El Modelo de Actuación Profesional pretende superar esta insuficiencia a través de una concepción que descansa en la articulación entre el conocimiento de la ciencia y los problemas propios de la profesión, expresada en la lógica de los Modos de Actuación Profesional y los problemas más generales y frecuentes de la misma. De allí que al conocer estos problemas, se deba, por la misma vía de las encuestas, precisar los métodos de solución profesionales a dichos problemas, lo que permitirá conformar los modos de actuación profesional.

De una parte se determinan los Campos de Acción y las Esferas de Actuación en una generalización de problemas que se corresponda con los problemas más generales y frecuentes que se dan en el eslabón de base de la profesión.

De forma paralela y a partir de los propios Problemas Profesionales, se determinan los métodos de solución de estos problemas, los que se generalizan al conformar los Modos de Actuación. Queda, por otra parte, el objeto de

trabajo de la profesión y por otra, aún, los Modos de Actuación; estableciéndose la relación entre el objeto y el método, sin la cual no se daría solución al problema.

Este análisis está en el plano de la profesión, o sea, externo al proceso de enseñanza-aprendizaje, dado que lo que se considera es el Objeto de Trabajo de la profesión y los Modos de Actuación sobre dicho objeto. La interrelación entre el objeto de trabajo de la profesión y los modos de actuación conforma el objeto de la profesión¹⁴.

A partir de los modos de actuación y como expresión didáctica de éstos, se elabora la lógica esencial de la profesión. La lógica esencial de la profesión está concebida a partir de la definición de invariante de habilidad dada por Fuentes y Col.¹⁵; elemento tomado del modelo de diseño propuesto por el mismo autor como una alternativa ante el Modelo de Procesos Conscientes, donde se define el invariante de habilidad como la integración, según determinada lógica de habilidades con un alto nivel de generalización, a partir de las cuales se pueden enfrentar múltiples problemas particulares. Esta lógica está sustentada en un sistema de habilidades lógicas y un conjunto de valores y motivaciones profesionales.

Este modelo demuestra el significado del tratamiento a los modos de actuación profesional en el plano didáctico, ello implica determinar cuáles son las habilidades y conocimientos más generales de los que debe apropiarse el estudiante, la lógica con que debe actuar al interaccionar con el objeto y las motivaciones y valores que como profesional debe tener al desarrollar su actividad, todo lo cual ha de adquirir en un proceso consciente en el que, de manera participativa se relacione con su colectivo y con la sociedad.

CONCLUSIONES

En el análisis del desarrollo histórico de las tendencias en la formación del profesional farmacéutico cubano, se manifiesta el énfasis en aquellos aspectos que garantizan, dentro del currículo, la formación de conocimientos y habilidades necesarios para el ejercicio de las funciones clínicas de la profesión, lo cual evidencia una influencia del desarrollo alcanzado por las ciencias y la práctica de farmacia contemporáneas.

Los farmacéuticos continúan desempeñándose ampliamente en funciones técnicas y administrativas, y existe una pobre identificación con los problemas relacionados con el objeto de su profesión, presentes en el sector asistencial.

La enseñanza de la Farmacia ha estado

influida por los adelantos y cambios que se han producido en la práctica de la profesión. La formación clínica del profesional continúa sustentado en el concepto de Farmacia Clínica, en el cual se aprecia la tendencia a centrar las actividades profesionales en el medicamento

El currículum de Farmacia, sin perder de vista la formación en materia de Farmacia Industrial, en consonancia con las necesidades económicas, deberá reforzar la formación en el campo de la clínica si en realidad se pretende formar un profesional capaz de insertarse de manera exitosa en un equipo de salud y desempeñarse con éxito en este medio.

El estudiante tendrá que formarse en el contexto de un currículo que atienda los principales problemas que se presentan en el campo de la clínica y la responsabilidad del profesional con el paciente y su calidad de vida, contemplando la comunicación con éste y el resto de los profesionales de equipo de salud en un proceso estrechamente vinculado con su contexto, acorde con la demanda social de garantizar una utilización segura y adecuada de los medicamentos.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Pedro Manuel Horruitner Silva y Silvia Sofía Cruz Baranda por la orientación científica y metodológica en la realización de este trabajo. Especial agradecimiento al Dr. Ramón Piminchumo Carranza Profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú por su colaboración en la preparación de este manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quirino-Barreda C, Del Castillo B. Los Retos de la Armonización Curricular en Farmacia. *Ars Pharmaceutica* 2003; 44(1): 23-42.
2. Hepler CH. Oportunidades y responsabilidades en atención farmacéutica. *Pharm Care Esp* 1999; 1: 35-47.
3. Álvarez de Toledo F, Arcos P, Eyaralar T. Atención farmacéutica en personas que han sufrido episodios coronarios agudos (Estudio TOMCOR). *Rev Esp Salud Pública* 2001; 75: 375-388.
4. Waleed M, Al-Shaqha S, Mohamed Z. Pharmaceutical care management: a modern approach to providing seamless and integrated health care. In *J Health Care Qual Ass* 2001; 14 (7):282-301.
5. Ruiz I, Jirón M, Pinilla E. Pharmaceutical Care Education at the University of Chile. *Am J Pharm Educ* 2002; 66: 144-147.
6. Silveira de Castro M. Pharmaceutical Care in Community Pharmacies: Practice and Research in Brazil. *Ann Pharmacother* 2007; 41 (9): 1486-1493.
7. Wiedenmayer K. **Desarrollo de la práctica de farmacia** centrada en la atención del paciente. 2006. (visita: 28 de junio de 2010).
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14094s/s14094s.pdf>
8. Dick TH. Informe del Grupo de Trabajo para implementar la Atención Farmacéutica en el currículum. *Pharm Care Esp* 1999; 1.
9. Herrera J. El nuevo paradigma ético de la nueva farmacia. *Farm Clin* 1989; 14 (8): 506.
10. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Manual de Normas y Procedimientos en Farmacia Comunitaria. La Habana, Cuba; Emisión de Junio de 2005; AE-16: 1-17. (visita: 08 de julio de 2010)
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/revfarmacia/manual_normas_y_procedimientos_farmacia_comunitaria_2005.pdf.
11. Martínez AM. Clinical Pharmacy in Cuba. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 1513.
12. Benitez O. Aprendizaje del Inglés. (visita: 16 de abril de 2010)
<http://www.monografias.com/trabajos44/aprendizaje-ingles/aprendizaje-ingles2.shtml>.
13. Horruitner P. Fundamentos del proceso de formación en la Educación Superior: La experiencia cubana. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque - Perú. Fondo Editorial FACHSE. 2005.
14. Amaro A, Cruz S, Ramos A. Propuesta de objetivos por años para la Carrera de Estomatología. *MEDISAN* 2003; 7(2):129-139
15. Fuentes H. Conferencias de Diseño Curricular para la Maestría en Educación Superior. Centro de Estudios de Educación Superior "Manuel F. Gran". Universidad de Oriente. 1995.

Correspondencia:

Alina de las Mercedes Martínez Sánchez

Dirección:

Av. del Concejal Francisco JJ. Martín 152

Teléfono:

28047 Madrid. España

Email:

saudade680227@yahoo.com



Universidad Nacional de Trujillo

Vicerrectorado Académico

Gerencia de Investigación Científica Proyección Social y Extensión
Universitaria

CUPON DE SUSCRIPCIÓN DE LA REVISTA SCIÉENDO

SUBSCRIPTION AND EXCHANGE PROGRAMS

La revista SCIÉENDO Ciencia para el desarrollo es de edición semestral y publica trabajos de investigaciones originales e inéditas.

Magazine SCIÉENDO Science for the development is of semester edition and Publishes Works of original and unpublished investigations.

SCIÉENDO
REVISTA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
Magazine of investigation scientist of the National University of Trujillo

LA SUSCRIPCIÓN ANUAL INCLUYE UN VOLUMEN CON DOS NÚMEROS MÁS COSTO DE ENVÍO.

The annual subscription includes a volume with two numbers more cost of shipment.

PARA CUALQUIER PARTE DEL PERÚ: S/. 25.00
OTHER COUNTRIES: \$ 20.00

NOMBRES COMPLETOS/Complete Name:.....

DIRECCIÓN POSTAL/FULL POSTAL ADDRESS.....
.....

EXTENDER CHEQUE CERTIFICADO Y ORDEN DE PAGO A NOMBRE DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Make Check or money order payable to University National of Trujillo.

ASIMISMO ES ACEPTABLE EL CANJE CON REVISTAS DE IGUAL NIVEL.

In like manner the exchange with magazines of equal level is acceptable.

Enviar a: Universidad Nacional de Trujillo. Jr. Diego de Almagro N° 344 Trujillo-Perú.

Send to: National Trujillo's University. Jr. Diego de Almagro N° 344 Trujillo-Perú.

E-mail: pro_inves_unt@hotmail.com

Para mayor información dirigirse a:

For further information contact:

Director: Dr. JULIO CHICO RUIZ

Teléfono: 044-581670

E-mail: jchico22@gmail.com



Universidad Nacional de Trujillo Vicerrectorado Académico

Gerencia de Investigación Científica Proyección Social y Extensión Universitaria

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES DE REVISTA SCIENDO

La revista científica SCIENDO publica semestralmente estudios inéditos provenientes de investigaciones originales, artículos de revisión o notas científicas, que aporten al conocimiento existente, contribuyan al desarrollo preferentemente regional, y que no estén publicados parcial ni totalmente o sometidos a revisión en otro medio de publicación. Una vez aprobado para su publicación, todos los derechos de reproducción pasan a SCIENDO. La recepción de los impresos es permanente y la prioridad de publicación se hará de acuerdo al orden en el que fueron aceptados y aprobados, luego de ser sometidos al arbitraje. SCIENDO no se responsabiliza de los contenidos expresados por los autores.

Ética

Cuando se trate de trabajos realizados en personas y animales, se debe declarar que se ha cumplido con las normas éticas internacionales para la investigación en seres humanos y animales.

Arbitraje: todos los artículos que se presenten serán sometidos al arbitraje (revisión y evaluación) anónimo, por árbitros internos y externos (no menos de dos) especialistas en el tema, y cuyos resultados deben estar totalmente documentados. Un ejemplar del artículo y el resumen no deben contener ninguna identificación del autor(es). En base a los informes de los árbitros el Comité Editor establece la decisión de publicar o no el trabajo, pudiendo solicitar la aclaración o modificación de diferentes aspectos del manuscrito.

Presentación: El texto principal debe estar bien integrado, aunque dividido en secciones, mediante encabezamientos de carácter informativo. Deben evitarse las notas al pie de página y la separación innecesaria de partes del texto en forma de anexos o apéndices. En trabajos realizados en personas y animales se debe declarar el cumplimiento de las normas éticas internacionales respectivas. Todos los textos y figuras deben ser definitivos, por lo que su ortografía y lenguaje han de ser correctos. Asimismo, deben leerse cuidadosamente para asegurarse de que son coherentes en todos sus detalles. En las ilustraciones se indicará, por lo menos, el nombre del autor y su número de referencia en el texto. Una preparación poco cuidadosa de los manuscritos entraña una pérdida de tiempo para los responsables de redacción. Además hace dudar del valor científico de los trabajos expuestos.

Cuando el autor redacte su artículo en una lengua que no domina perfectamente, debe consultar a colegas que la conozcan a fondo para presentar el trabajo en una forma aceptable. No es razonable esperar que los responsables de redacción se encarguen de escribir de nuevo un artículo para corregir las definiciones lingüísticas.

Adicionalmente se incluirá una **hoja de reseña bibliográfica** del autor(es) indicando su filiación profesional (Título), académica (Grado), su tema o interés de investigación y sus publicaciones más recientes y la **Declaración Jurada**.

Digitación: Los trabajos deberán estar impresos a dos espacios, en una sola cara, en papel Bond tamaño A4 (21x29.7cm), con márgenes de 2,5 cm. por lado, con estilo Times New Roman, tamaño 12, en no más de **20 páginas para los artículos originales, 35 para las revisiones y 12 para las notas científicas** incluyendo las referencias bibliográficas. Se

entregará en original y dos copias debidamente compaginadas, en la parte inferior central; los dibujos y fotografías tendrán un tamaño máximo de 15x15 cm. (con artes finales), adjuntando una solicitud dirigida al Gerente de la GICPSEU, y el Texto computarizado en Disco Compacto en Word, Excel y Corel Draw, identificado con: Nombre del primer autor, título del trabajo, nombre del documento y procesador de texto, e-mail.

La redacción: deberá hacerse de modo impersonal y todas las unidades de medida deben ser expresadas según el Sistema Internacional de Unidades, evitándose escribir palabras completamente con mayúsculas, salvo las siglas, y usando cursivas sólo para los nombres científicos (género y especie). En base a la revisión integral (contenido, forma, redacción, palabras clave, estructura de los resúmenes, adecuación del lenguaje utilizado, etc.), se valora el artículo de acuerdo con su categoría: **Artículos científicos originales**, presentan resultados de una investigación necesariamente en base a datos empíricos, las informaciones nuevas comprenden hechos observados, las conclusiones de una experiencia o de un razonamiento, las características principales de un nuevo método o aparato, etc. Se mencionarán los nuevos materiales (compuestos, etc.) y los nuevos datos, numéricos o verbales. Es aún más importante evitar abreviaturas, símbolos, etc. **Artículos de revisión** investigación bibliográfica que compara los métodos, resultados y conclusiones de trabajos originales sobre un mismo tema presentados en forma lógica e integrada. El autor debe tener en cuenta todos los trabajos publicados que han hecho avanzar el tema, o que lo habrían hecho avanzar si se hubiesen tomado en consideración. **Notas científicas** informes de resultados de una investigación.

../vienen Instrucciones para autores SCIÉND

Si no se cumple con los requisitos formales o la calidad, el artículo podrá ser rechazado.

ESTRUCTURA:

Los artículos científicos originales deberán estructurarse con el orden siguiente:

Título, debe ser conciso, preposición corta, objetiva y descriptiva que facilite su registro en un índice de materias; no más de 15 palabras. Su objeto es dar a conocer al lector el contenido esencial del artículo. No debe sobrecargarse con información expuesta en forma de abreviaturas, paréntesis, fórmulas o caracteres desconocidos en el idioma español, no usar verbos en presente. No añadir un subtítulo, porque todo ello se suple con el resumen analítico y las palabras clave. Presentar en español e inglés.

Autor(es) e institución(es) y afiliación, escribir el Primer nombre, inicial del segundo, cuando se consideran dos apellidos, deben estar unidos por un guión y estar referenciados con superíndice numerales. La presentación se hará, en orden de aporte real, al final del artículo consignar la dirección del autor para fines de correspondencia. No consignar cargos, grados ni títulos, sólo la especialidad. Incluir reseña bibliográfica del autor(s).

Resumen y Abstract: Sección corta con un máximo de 200 palabras, pero no menor de 100 palabras. Debe estar redactado en forma de oraciones conexas, debe ser selectivo e indicativo, que dé al lector

una información global del trabajo. Al redactar el resumen, los autores no deben olvidar que, probablemente, será esa la única parte del artículo que leerá la mayoría de los lectores. Tiene una doble finalidad: a) Proporcionar a determinados lectores, tanto al especialista en el tema como al científico que lee ("hojea") una publicación, una información suficiente que les permita juzgar si les conviene profundizar en el texto. b) Acelerar el trabajo de los servicios de resúmenes analíticos de manera que puedan reproducir inmediatamente el resumen en cuestión. Un resumen bien formulado, que guarde relación con

un título adecuado y con un conjunto de palabras clave, constituye una gran ayuda para el mejoramiento general de los servicios de información en el campo científico. El resumen debe incluir, de manera detallada pero sucinta, los resultados y conclusiones del artículo, ajustándose al espacio a ello destinado, e indicar, dentro de estos límites, todo tipo de información nueva que contenga el artículo. No deberá contener datos o consideraciones que no figuren en el texto ni detalles de interés secundario. Deben evitarse las citas del texto "aisladas" o las referencias a figuras que aparezcan en el mismo (ya que el resumen no incluye referencias ni ilustraciones). Por razones similares, el texto del resumen no debe estar redactado en primera persona. Calificar la manera en que han sido tratados los diversos aspectos de la materia con adjetivos como "sucinto", "detallado", "teórico", "experimental", etc. Debe evitarse el empleo de fórmulas gráficas, símbolos y caracteres en otros alfabetos.

Incluye lista de **palabras clave** del trabajo (de 2 a 6), palabras que se usan para la indización del trabajo y la búsqueda de información en las bibliotecas, permite adoptar un enfoque más informativo. **El abstract** es la traducción del resumen y debe ser redactado en un solo párrafo, siguiendo el estilo del idioma inglés. Debe ser colocado luego del resumen.

Introducción: Presentación del trabajo, considerando sus antecedentes, significado, problema e hipótesis, en el caso de las investigaciones explicativas. La introducción debe explicar la finalidad del

artículo. Si en un artículo de investigación se incluye una reseña crítica o histórica de los conocimientos existentes, ésta debe limitarse estrictamente al tema tratado en el artículo. Debe exponerse el tema de la manera más concisa posible, utilizar un vocabulario sencillo y directo. La terminología y la nomenclatura, aunque forman parte del lenguaje científico, han de usarse con sentido crítico y con mesura; debe ir acompañada de una explicación sobre la derivación y construcción del término o nombre en cuestión. Los nuevos términos deben introducirse sólo para fenómenos que se mencionan con frecuencia y que no pueden describirse recurriendo a breves expresiones de uso común. Los términos deben elaborarse teniendo debidamente en cuenta su etimología y contenido semántico.

Deberán procurar que sus artículos contengan todos los datos que contribuyan a la comprensión del artículo y con ese fin, darán las explicaciones necesarias sobre el sentido de los símbolos y abreviaturas empleados. Los autores no deben utilizar demasiadas abreviaturas poco corrientes y sobre todo, las que designen términos de escasa utilización, ya que esa práctica dificulta considerablemente la lectura de los artículos. Deben aclarar qué partes del artículo representan contribuciones propias y cuáles corresponden a aportes de otros investigadores, para poner de manifiesto el progreso que suponen los nuevos trabajos y resultados para el conocimiento del tema. Deben especificar cuidadosamente en el texto las limitaciones del trabajo realizado, el grado de validez de sus conclusiones, las fuentes de error y los errores probables en los datos presentados. No deben adoptar una actitud excesivamente optimista respecto de la precisión de su trabajo, la universalidad de sus conclusiones o la aplicabilidad de los resultados obtenidos. Si por consideraciones de propiedad industrial o de seguridad nacional el autor se ve obligado a limitar sensiblemente la información científica que ha de contener el artículo, esto debe quedar señalado en el texto, que en cuyo caso suele convertirse en una "publicación provisional". Las citas bibliográficas se ajustarán a la norma internacional Vancouver: números arábigos exponenciales (superíndices) al final del párrafo en orden ascendente. En esas referencias se expresará el debido reconocimiento de los trabajos que hayan permitido realizar la nueva aportación. Debe evitarse, dentro de lo posible, toda referencia a comunicaciones y documentos privados de difusión limitada y que corresponda a una referencia completa en la lista de referencias que figura al final del trabajo.

Material y Métodos: Descritos en forma concisa y precisa, para facilitar la réplica del trabajo para otros investigadores. A menos que sean procedimientos nuevos deberán ser descritos en detalle.

../vienen Instrucciones para autores SCIENDO

Procedimientos y técnicas ya publicados deben ser citados. Los materiales poco usuales y los procedimientos nuevos deben referirse en detalle.

Resultados: Deben referirse en forma clara y concreta a lo observado ya que es el nuevo conocimiento que se comunica. Serán expuestos en una secuencia lógica, primero método, luego resultados con ayuda de cuadros, figuras o gráficos que, objetivamente, aclaren el texto o reemplacen, en forma concreta y directa, lo que podría expresarse en palabras. No debe ser una repetición de la sección Material y Métodos o figuras; en la parte final indicar las observaciones contrapuestas, debe tener numeración y títulos adecuados. Incluye los gráficos, las Tablas y Figuras (Fig.) evitándose toda duplicidad.

Discusión: Diseñada para decir qué significan los resultados obtenidos, en forma clara y precisa, estableciendo razones de causa y efecto y relación con principios, teorías y leyes, con citas de autores consultados igual que la introducción (súper índices). Se debe buscar generalizaciones y establecer las posibles implicancias de los nuevos conocimientos, evitando: (i) repetir los datos presentados en Resultados, y (ii) plantear hipótesis que no se apoyen en los resultados del trabajo.

Conclusiones: Sección opcional que se incluye usualmente en artículos que tienen una discusión larga. Presenta y resume los aportes más importantes de la investigación, en base a los objetivos propuestos en la introducción, consigna si se logró contestar las preguntas formuladas o no. Indica las perspectivas consecuentes al trabajo desarrollado.

Agradecimiento: Siempre que se brinde a personas y/o instituciones que hayan contribuido significativamente a la investigación o a la calidad del manuscrito, indicando motivo del agradecimiento, identificación del beneficio recibido, nombres y direcciones.

Referencias bibliográficas: Sólo los citados en el texto y que constituyen un selecto grupo de artículos o teorías estrechamente relacionadas con la investigación. Estructurarlos siguiendo el estilo Vancouver, con números arábigos exponenciales (súper índices) en orden de aparición. La lista de referencias debe elaborarse con especial cuidado, considerando cada uno de los elementos y prestando atención a los detalles de puntuación, no hay límite para su inclusión en los temas científicos a publicar. Si la referencia es de Internet usar las reglas acordadas a nivel internacional. Las referencias de congresos, resúmenes, informes, datos no publicados no deben ser incorporadas, en todo caso irá entre paréntesis en el texto.

Para el caso de textos electrónicos, base de datos y programas informáticos, según la estructura establecida en la ISO 690-2

Apellido (s), nombre. Título [tipo de soporte]. Edición. Lugar de Edición: editor, fecha de edición, fecha de actualización o revisión. [Fecha de consulta]. Descripción física. (Serie). Notas.

Disponibilidad y acceso, número normalizado.

Ejemplo: World cat [en línea]. [Dublín, Ohio]: OCLC. [Consulta: 6 mayo 1997]. Base de datos bibliográfica disponible en el distribuidor OCLC First search por la red IPSS vía IBERPAC. También disponible en: <http://www.ref.uk.oclc.org:2000>.

Para el caso de textos bibliográficos, según ISO 690

Apellido (s), Nombre. Título [Subtítulo] [Traducción]. Responsabilidad subordinada: Editor, traductor. Edición. Indicación de fascículos, volumen, número. Editorial, año de publicación.

Número de páginas o volúmenes.

Ejemplo: Largaia AM. Factores antiinfecciosos en la leche humana. En: O'Donnell AM. Nutrición infantil. Buenos Aires: Editorial Celsius; 1986: 357-380.

Tablas: Conjuntos ordenados y sistemáticos de valores agrupados en renglones y columnas, sólo 3 líneas horizontales y ninguna vertical. Cada cuadro debe tener un título, precedido de un número arábigo, los títulos deben ser claros y entendibles por sí mismos, sin necesidad de referirse al texto. Deben ir acompañados de una leyenda explicativa y no un simple título o referencia a una explicación que figura en el cuerpo del texto. Las llamadas o notas al pie de tablas se harán mediante letras colocadas como exponentes (voladitos) en orden alfabético, no se debe usar asteriscos. Los números en una tabla van alineados por el decimal representado por una coma. Los cuadros que contienen elementos gráficos distintos de caracteres normales y de líneas horizontales (líneas irregulares, fórmulas y símbolos pocos comunes, etc.) deben dibujarse, para ser reproducidos como "figuras".

Si se presentan en las tablas, datos de otras fuentes, publicadas o no, se deben obtener los correspondientes permisos y reconocer públicamente las fuentes en cuestión.

Ilustraciones: Las ilustraciones deben planearse de tal forma que abarquen todo el espacio que ocupa el texto o el de una columna. Si se utiliza un ancho intermedio, debe preverse un espacio suficiente para colocar la leyenda al lado de la figura dentro del área destinada al texto. El costo de reproducción de una ilustración se basa en el marco rectangular más pequeño dentro del cual puede acomodarse la figura. No deben dejarse ángulos abiertos o espacios innecesarios entre los elementos de figuras múltiples. Todas las ilustraciones deben ir acompañadas de una leyenda explicativa y no solamente de títulos o referencias que figuran en el texto. La explicación de los símbolos se dará inmediatamente después del símbolo

../vienen Instrucciones para autores SCIÉENDO

correspondiente de la leyenda y no mediante una llamada incluida en la misma. Comprende: **Dibujos**, con tinta china en papel canson. Los dibujos lineales deben realizarse con trazados de igual espesor y ennegrecimiento. Para las partes sombreadas, no deben emplearse tramas dibujadas o adheridas con líneas demasiado próximas. Las líneas deben interrumpirse, sobre todo, cuando interfieren con elementos del texto. Las tramas demasiado densas, los ángulos entre cuadrículas y las partes sobrecargadas de detalles tienden a ennegrecerse demasiado al utilizarse todos los métodos de reproducción comunes, en particular cuando se efectúan reducciones. Además, suelen hacerse más visibles las irregularidades y otras imperfecciones de las líneas. **Fotografías**, y reproducciones digitales, originales, calidad profesional, nítidas y buen contraste y resolución, en formato JPG, incluye datos de autor, año, lugar y pequeña descripción del contenido. Las fotografías destinadas a ilustraciones de medio tono deben revelarse sobre papel blanco brillante.

Gráficos, los títulos y explicaciones deben incluirse en la leyenda ubicada en la parte inferior. Si se utiliza una figura previamente publicada, se debe identificar la fuente original y enviar junto con el manuscrito la autorización por escrito del propietario de los derechos de autor para reproducir el material.

Para el caso de las Notas Científicas, el orden debe ser: título, autor (es), institución (es) resumen con palabras claves al final, abstract con key words al final, cuerpo (donde en forma continua y resumida se redactará la introducción, material y métodos, resultados (se puede incluir Tablas y Figuras), discusión, agradecimientos (si lo hubiera) y referencias bibliográficas.

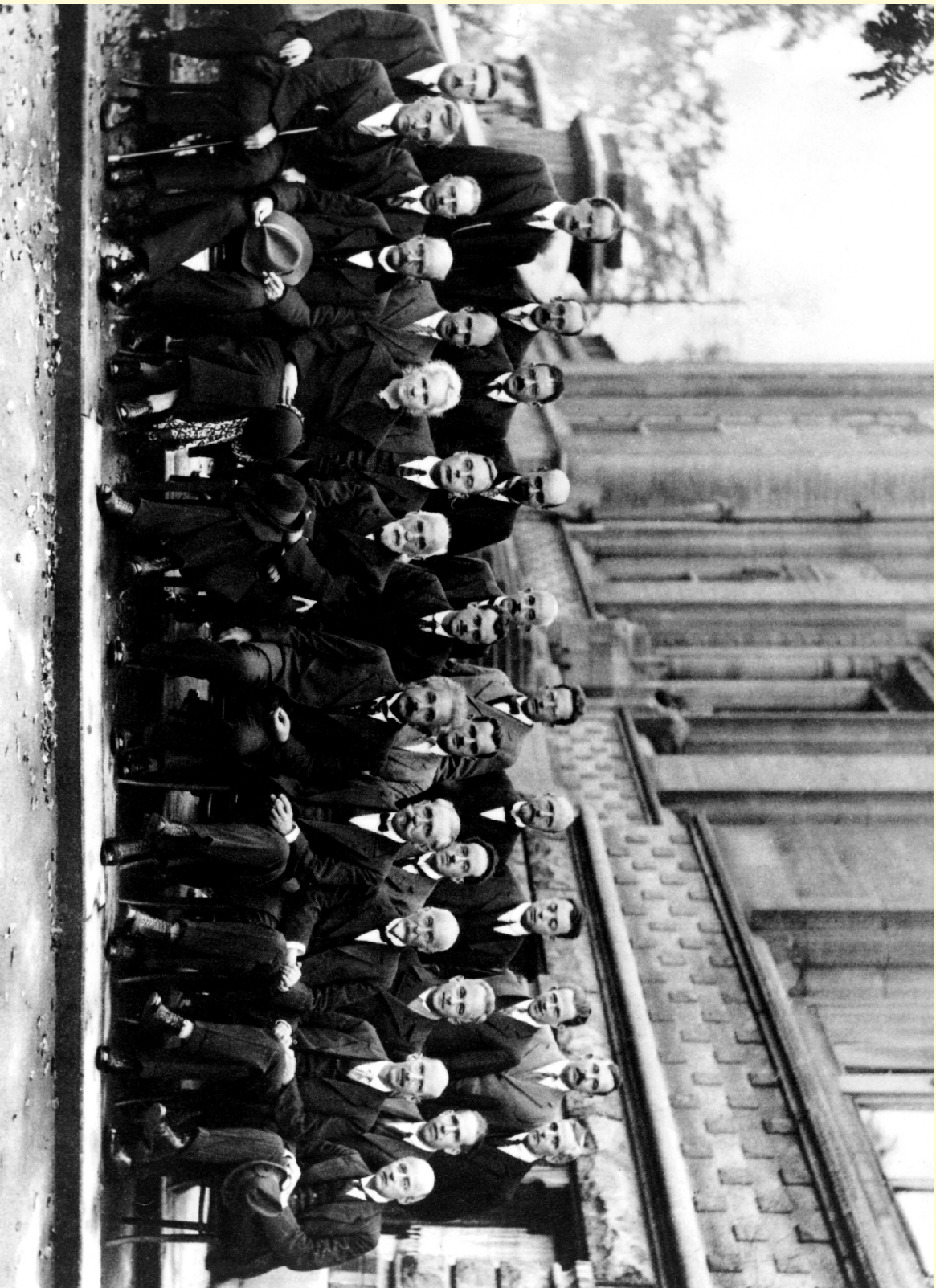
Para el caso de las Revisiones: Título, autor (es), institución (es), contenido (con títulos y subtítulos), introducción (a modo de presentación), desarrollo de los temas propuestos en el contenido, conclusiones, agradecimientos (si los hubiera) y referencias bibliográficas.

El costo de la publicación según lo establecido en el TUPA 2010 procedimiento N° 52 de Servicios Exclusivos- Revisión de Informes Finales de Investigación para publicación en Revista SCIÉENDO es de DIEZ Y 00/100 NUEVOS SOLES (S/. 10.00) derecho cancelado en Tesorería de la UNT y presentado juntamente con la solicitud en la GICPSEU.

El Comité Editor de la Revista está conformado por los docentes Julio Chico Ruiz – Director, Manuel Rodríguez Lacherre – Editor y 7 integrantes del Comité Editorial.

Contactos: Gerencia de Investigación Científica, Proyección Social y Extensión Universitaria – GICPSEU-UNT sito en
Jr. Diego de Almagro N° 344 – Teléfono 044 224505 –
E-mail: PRO_INVES_UNT@hotmail.com.

Editorial Imprenta Líder Gráfico S.r.l.
Se terminó de imprimir
en sus Talleres
en Marzo del 2012.
Dirección Jr. Junín 308 - Telefax.: 044 292403
Email: lidergraficosrl@yahoo.es
Trujillo - Perú



A inicios del siglo XX, en las Conferencias de Solvay, (1927) estuvieron reunidos: Einstein, Plank, Schrödinger, Bohr, Heisenberg, Compton, Born, Lorentz, Curie, entre otros. Todos ellos que ahora conocemos por que llevan sus nombres muchas ecuaciones y teorías de la física que manejamos o estudiamos en el colegio o la universidad.