
NEREIS
Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación

Les presento la revista de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir: *Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*.

Tiene como objetivo promocionar y difundir la investigación interdisciplinar basada en nuevos métodos, modelización matemática, el análisis de datos y las simulaciones numérico-computacionales en dos áreas generales del conocimiento: ciencias de la vida y ciencias técnicas.

Pretendemos que los artículos en esta revista, escritos en inglés o en español, tengan rigor y precisión y lleguen a toda la comunidad científica y tecnológica, especialmente al ámbito iberoamericano. La revista tendrá una periodicidad anual.

GLORIA CASTELLANO ESTORNELL

*Esta publicación no puede ser reproducida, ni total ni parcialmente,
ni registrada en, o transmitida por, un sistema de recuperación de información,
en ninguna forma ni por ningún medio, ya sea fotomecánico, fotoquímico,
electrónico, por fotocopia o por cualquier otro, sin el permiso previo de la editorial.*

SERVICIO DE PUBLICACIONES

Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Servicio de Publicaciones
Plaza San Agustín, 3, esc. B-1, pta. C. 46002 Valencia. España
Teléfono: +34 963 637 412. Fax: +34 963 153 655
www.ucv.es

SERVICIO DE INTERCAMBIO

Biblioteca de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir
Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España
Teléfono: +34 96 363 74 12. Fax: + 34 96 391 98 27
intercambio.pub@ucv.es

INDEXACIÓN DE DATOS

Dialnet (Universidad de la Rioja)
ICYT (CSIC)
Latindex (México)
WorldCat

EDITA

Vicerrectorado de Relaciones Institucionales
Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir
Servicio de Publicaciones
Plaza San Agustín, 3, esc. B-1, pta. C. 46002 Valencia. España
Tel. +34 963 637 412
publicaciones@ucv.es
www.ucv.es

DISEÑO DE LA PORTADA: Vicente Ortuño

MAQUETACIÓN: Communico. Letras y Píxeles, S. L.

IMPRESIÓN: Grafo Impresores, S. L.

Depósito legal: V-2858-2008

ISSN: 1888-8550

ISSNe: 2531-2545

PERIODICIDAD ANUAL

Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation

Please allow me to introduce the journal of the Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir: *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation*.

The aim of the journal is to promote and disseminate interdisciplinary research based on new methods, mathematical modelling and data analysis and computational numeric simulations in two general areas of knowledge: Life Sciences and Technical Sciences.

We anticipate that the articles in this journal, written in English or Spanish, will be rigorous and accurate and will reach all the scientific and technological community, especially in the Ibero-American sphere. The journal will be published yearly.

GLORIA CASTELLANO ESTORNELL

*This publication may not be reproduced totally or partially,
nor recorded in or transmitted through an information retrieval system,
in any form or by any means, whether photomechanical, photochemical, electronic,
photocopying or otherwise, without the prior permission of the publisher.*

PUBLISHING SERVICE

Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Servicio de Publicaciones
Plaza San Agustín, 3, esc. B-1, pta. C. 46002 Valencia. España
Teléfono: +34 963 637 412. Fax: +34 963 153 655
www.ucv.es

EXCHANGE SERVICE

Biblioteca de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir
Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España
Teléfono: +34 96 363 74 12. Fax: + 34 96 391 98 27
intercambio.pub@ucv.es

DATA INDEXING

Dialnet (Universidad de la Rioja)
ICYT (CSIC)
Latindex (México)
WorldCat

EDITOR

Vicerrectorado de Relaciones Institucionales
Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir
Servicio de Publicaciones
Plaza San Agustín, 3, esc. B-1, pta. C. 46002 Valencia. España
Tel. +34 963 637 412
publicaciones@ucv.es
www.ucv.es

COVER DESIGN: Vicente Ortuño

LAYOUT: Communico. Letras y Píxeles, S. L.

PRINTING: Grafo Impresores, S. L.

Legal deposit: V-2858-2008

ISSN: 1888-8550

ISSNe: 2531-2545

ANNUAL PUBLICATION

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación

La revista *Nereis* se dirige y se coordina desde la Facultad de Ciencias Experimentales
de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (UCV)
Campus de Santa Úrsula. C/ Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España.
Teléfono: 963 637 412. Extensión: 20000
www.ucv.es

DIRECTORA DE LA REVISTA

Gloria M.^a Castellano Estornell
(Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)

COMITÉ CIENTÍFICO

Eduardo Alberto Castro (Universidad Nacional de La Plata)
Pedro José Fernández de Córdoba Castellá (Universidad Politécnica de Valencia)
Ramón García-Doménech (Universidad de Valencia)
Gretel Geada López (Universidad de Pinar del Río)
José María Isidro San Juan (Universidad Politécnica de Valencia)
Yovani Marrero Ponce (Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas)
Ramón Martínez Máñez (Universidad Politécnica de Valencia)
Guillermo Ramis Ramos (Universidad de Valencia)
Francisco Torrens Zaragoza (Universidad de Valencia)
Javier F. Urchueguía Schölzel (Universidad Politécnica de Valencia)

COMITÉ EDITORIAL

Ysaías J. Alvarado (La Universidad del Zulia (LUZ))
M.^a José Aurell Piquer (Universidad de Valencia)
María Amparo Blázquez Ferrer (Universidad de Valencia)
Juan Alberto Castillo-Garit (Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz”)
Juan Carlos Castro Palacio (Universidad de Pinar del Río)
Wilfredo Falcón Urquiaga (Universidad de Pinar del Río)
Albert Ferrando Cogollos (Universidad de Valencia)
Humberto González-Díaz (Universidad de Santiago de Compostela)
Germán Martín González (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
Carmen Moret Tatay (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
Luz Hicela Mosquera Mosquera (Universidad Tecnológica del Chocó)
Jesús Ángel Prieto Ruíz (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
Mario Zacarés González (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)

Nereis is directed and coordinated by the Faculty of Experimental Sciences
of Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (UCV)
Campus de Santa Úrsula. C/ Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España.
Teléfono: 963 637 412. Extensión: 20000
www.ucv.es

JOURNAL DIRECTOR

Gloria M.^a Castellano Estornell
(Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)

SCIENTIFIC BOARD

Eduardo Alberto Castro (Universidad Nacional de La Plata)
Pedro José Fernández de Córdoba Castellá (Universidad Politécnica de Valencia)
Ramón García-Doménech (Universidad de Valencia)
Gretel Geada López (Universidad de Pinar del Río)
José María Isidro San Juan (Universidad Politécnica de Valencia)
Yovani Marrero Ponce (Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas)
Ramón Martínez Máñez (Universidad Politécnica de Valencia)
Guillermo Ramis Ramos (Universidad de Valencia)
Francisco Torrens Zaragoza (Universidad de Valencia)
Javier F. Urchueguía Schölzel (Universidad Politécnica de Valencia)

PUBLISHING BOARD

Ysaías J. Alvarado (La Universidad del Zulia (LUZ))
M.^a José Aurell Piquer (Universidad de Valencia)
María Amparo Blázquez Ferrer (Universidad de Valencia)
Juan Alberto Castillo-Garit (Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz”)
Juan Carlos Castro Palacio (Universidad de Pinar del Río)
Wilfredo Falcón Urquiaga (Universidad de Pinar del Río)
Albert Ferrando Cogollos (Universidad de Valencia)
Humberto González-Díaz (Universidad de Santiago de Compostela)
Germán Martín González (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
Carmen Moret Tatay (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
Luz Hicela Mosquera Mosquera (Universidad Tecnológica del Chocó)
Jesús Ángel Prieto Ruíz (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
Mario Zacarés González (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)

ÍNDICE

IGNACIO ROSA PARDO, LORENA ANDRÉS OLMOS, ALEX BARRERAS PEÑALVER, JORGE GÁLVEZ ÁLVAREZ Y RAMÓN GARCÍA-DOMENECH Aplicación de la topología molecular a la búsqueda de análogos del E- β -farneseno para el control de plagas de pulgones	13
MARÍA DOLORES IBÁÑEZ JAIME Y MARÍA AMPARO BLÁZQUEZ FERRER Post-emergent herbicidal activity of <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. essential oil	25
FRANCISCO TORRENS ZARAGOZÁ Stability of Colloids in Negatively Co-operative Melittin-Phospholipid.....	37
JUAN LUIS GONZÁLEZ-SANTANDER One-dimensional mesh generation for critical points in an interval	57
NIEVES BAENAS NAVARRO, DIEGO A. MORENO FERNÁNDEZ Y CRISTINA GARCÍA VIGUERA Estudio de la bioactividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de brotes de brócoli ricos en glucosinolatos/isotiocianatos	69
ARIAGNA L. RIVERA-BRISO Y ÁNGEL SERRANO-AROCA Métodos de refuerzo mecánico del poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para aplicaciones industriales avanzadas	79
CARMEN MORET-TATAY, DANIEL GAMERMANN Y PEDRO FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA Tables for cumulative probability of the ex-Gaussian distribution.....	95
CARLOS CASANOVA SORNÍ, MARÍA LUZ MORENO SANCHO, MARÍA MIRANDA SANZ, INMACULADA ALMANSA FRÍAS, ANTONIO FALCÓ MONTESINOS, MARÍA ÁNGELES NAVARRO MORENO, SANTOS FUSTERO LARDÍES, SALVADOR MÉRIDA DONOSO Y VICENTE M. VILLAR AMIGÓ Antioxidant capacity of 5-Fluorouracile and new fluorinated uracil derivates.....	99
CARLA IBÁÑEZ SANCHIS, BORJA MARTÍ PEIRÓ Y ANTONIO CALVO CAPILLA Caracterización sanitaria de las explotaciones ganaderas en el sur del Líbano	107



JOSÉ SALVADOR BLASCO MAGRANER, GLORIA BERNABÉ VALERO Y CARMEN MORET-TATAY Influencia de la música en la estimación del tiempo: un análisis de componentes de respuesta en estudiantes universitarios	121
EDUARDO A. KHOURI, ADRIANA ELIAS, SILVIA N. GONZÁLEZ Y MARIO E. ARENA Local levels of carbon monoxide in the urban air of San Miguel de Tucumán, Argentina	127
RAMIRO SOLER CASTILLO Y JOEL BUESO RÓDENAS Análisis de las alteraciones de la cáscara del huevo de gallina	137
CARLA IBÁÑEZ SANCHIS, MARTA PARRA ESCRIBANO Y ANTONIO CALVO CAPILLA Principales patologías causantes de decomisos en ganado equino destinado a consumo humano.....	149
PAULA IZQUIERDO SESA, MÓNICA DíEZ-DÍAZ Y PER BRUHEIM Identificación de cultivos de levaduras noruegas y estudio de sus propiedades de fermentación.....	161
ENRIQUE CARBONELL BALDOVÍ Y RAMIRO SOLER CASTILLO Diccionario etimológico de protistología.....	177
NORMAS DE ADMISIÓN Y PRESENTACIÓN DE LAS COLABORACIONES.....	197



INDEX

IGNACIO ROSA PARDO, LORENA ANDRÉS OLMOS, ALEX BARRERAS PEÑALVER, JORGE GÁLVEZ ÁLVAREZ AND RAMÓN GARCÍA-DOMENECH Application of molecular topology to the research of analogues to the E- β -Farnesene for plant louse pest control.....	13
MARÍA DOLORES IBÁÑEZ JAIME AND MARÍA AMPARO BLÁZQUEZ FERRER Actividad herbicida post-emergente del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill	25
FRANCISCO TORRENS ZARAGOZÁ Estabilidad de los coloides en la cooperación negativa melitina-fosfolípido	37
JUAN LUIS GONZÁLEZ-SANTANDER Generación de red unidimensional para puntos críticos en un intervalo	57
NIEVES BAENAS NAVARRO, DIEGO A. MORENO FERNÁNDEZ AND CRISTINA GARCÍA VIGUERA Study of the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> bioactivity of glucosinolates/isothiocyanates-rich broccoli sprouts.....	69
ARIAGNA L. RIVERA-BRISO AND ÁNGEL SERRANO-AROCA Mechanical reinforcement methods of poli(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) for advanced industrial applications	79
CARMEN MORET-TATAY, DANIEL GAMERMANN AND PEDRO FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA Tablas de probabilidad acumulada para la distribución ex-Gaussiana	95
CARLOS CASANOVA SORNÍ, MARÍA LUZ MORENO SANCHO, MARÍA MIRANDA SANZ, INMACULADA ALMANSA FRÍAS, ANTONIO FALCÓ MONTESINOS, MARÍA ÁNGELES NAVARRO MORENO, SANTOS FUSTERO LARDÍES, SALVADOR MÉRIDA DONOSO Y VICENTE M. VILLAR AMIGÓ Capacidad antioxidante del 5-fluorouracilo y nuevos derivados uracilofluorados	99
CARLA IBÁÑEZ SANCHIS, BORJA MARTÍ PEIRÓ AND ANTONIO CALVO CAPILLA Sanitary portrayal of the animal husbandry in the south of Lebanon	107



JOSÉ SALVADOR BLASCO MAGRANER, GLORIA BERNABÉ VALERO AND CARMEN MORET-TATAY Influence of music in time estimation: an analysis of answer components in university students.....	121
EDUARDO A. KHOURI, ADRIANA ELIAS, SILVIA N. GONZÁLEZ AND MARIO E. ARENA Niveles de monóxido de carbono en el aire urbano de San Miguel de Tucumán, Argentina	127
RAMIRO SOLER CASTILLO AND JOEL BUESO RÓDENAS Analysis of the alterations of the hen's egg shell.....	137
CARLA IBÁÑEZ SANCHIS, MARTA PARRA ESCRIBANO AND ANTONIO CALVO CAPILLA Main pathologies causing confiscation of equine livestock intended for human consumption.....	149
PAULA IZQUIERDO SESA, MÓNICA DíEZ-DÍAZ AND PER BRUHEIM Identification of Norwegian yeast cultures and study of their fermentation properties.....	161
ENRIQUE CARBONELL BALDOVÍ AND RAMIRO SOLER CASTILLO Etymological dictionary of protistology	177
ADMISSION AND PRESENTATION STANDARDS FOR CONTRIBUTIONS	197



Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	13-23	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	-------	--	----------------------	----------------

Aplicación de la topología molecular a la búsqueda de análogos del E- β -farneseno para el control de plagas de pulgones

Application of molecular topology to the research of analogues to the E- β -Farnesene
for plant louse pest control

Fecha de recepción y aceptación: 14 de octubre de 2017, 18 de enero de 2018

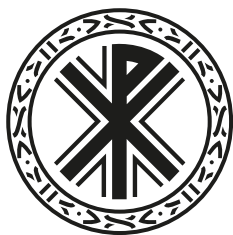
I. Rosa-Pardo¹, L. Andrés-Olmos¹, A. Barreras-Peñalver², J. Gálvez³ y R. García-Domenech^{3*}

¹ Institute of Molecular Science (ICMOL). Universitat de València.

² Instituto de Tecnología Química (ITQ). Universidad Politécnica de Valencia.

³ Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia. Universitat de València.

* Correspondencia: Universitat de València. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Física. Avenida V. A. Estellés, s/n. 46100 (Burjassot) Valencia. España. E-mail: ramon.garcia@uv.es



RESUMEN

El control de plagas de pulgones es muy importante para la agricultura debido al gran impacto económico que representa su acción colonizadora. Actualmente se buscan plaguicidas más sostenibles y con menor impacto, y por ello en este trabajo se ha estudiado la actividad de los análogos del E- β -farneseno (E β F) aplicando la topología molecular y el análisis de regresión multilíneal en la búsqueda de un modelo QSAR que sea capaz de predecir tanto la actividad biocida (logM) como la repelente (logRP) de dichos análogos del E β F. Se utilizaron estos dos valores como variables dependientes y los descriptores topológicos como variables independientes. Se obtuvo una ecuación con cuatro variables y coeficientes de correlación y predicción $R^2 = 0,929$ $Q^2 = 0,886$ (para el log RP) y $R^2 = 0,803$ $Q^2 = 0,670$ (para logM). El modelo fue validado mediante una validación interna y un test de aleatoriedad que presentaron resultados satisfactorios, mostrando así altas capacidades de predicción para la actividad repelente y una buena pero menor predicción para la actividad biocida de los compuestos análogos al E β F. Finalmente, los modelos seleccionados se aplicaron para la búsqueda de nuevos compuestos con teórica actividad biocida y repelente.

PALABRAS CLAVE: *análisis QSAR, áfidos, actividad repelente y biocida, E- β -farneseno, análisis de regresión multilíneal, topología molecular.*

ABSTRACT

The control of plant louse pests is very important for agriculture due to the great economic impact of its colonizing action. Currently, more sustainable pesticides with less impact are being sought and, therefore, in this work we have studied the activity of E- β -Farnesene (E β F) analogs by applying molecular topology and multilinear regression analysis for the search for a QSAR model effective to predict both the biocidal (logM) and the repellent (logRP) activities of said E β F analogues. These two values were used as dependent variables and the topological descriptors as independent variables. An equation was obtained with 4 variables and correlation

coefficients and prediction of $R^2 = 0.929$ $Q^2 = 0.886$ for the log RP and $R^2 = 0.803$ $Q^2 = 0.670$ for logM. The model was validated by an internal validation and a randomness test that showed satisfactory results. It was found a high predictive capability for the repellent activity and a good but lower predictivity for the biocidal activity. Finally, the selected models were applied to search for new compounds with theoretical biocide and repellent activity.

KEYWORDS: *Analysis QSAR, Aphids, Repellent and mortality activity, E-β-Farnesene, Regression multilinear analysis, Molecular topology.*

INTRODUCCIÓN

La protección del cultivo de malezas, patógenos y plagas animales es esencial para la producción agrícola. Los áfidos son un problema serio para la agricultura, a pesar de ser un grupo de insectos relativamente pequeño (4.000 especies en el mundo) comparado con el de otras especies. Viven principalmente en regiones templadas donde colonizan alrededor del 25 % de plantas existentes [1]. Los áfidos, más comúnmente conocidos como pulgones, causan graves problemas en las plantas [2]. Estos insectos son capaces de penetrar en ellas, llegar hasta el floema y succionar su savia, causando así un crecimiento irregular de la planta. De este modo, esta crece más lentamente o incluso llega a morir [3].

Como se ha dicho anteriormente, existen miles de especies diferentes de este insecto, lo que dificulta aún más su posible tratamiento y eliminación, debido asimismo a que han creado resistencias cruzadas frente a los plaguicidas que conocemos. Por ello se están estudiando nuevos métodos para el control de plagas que solucionen estas resistencias. Una de las estrategias con mayor proyección consiste en utilizar las feromonas de alarma de los áfidos. Estos insectos, en especial, segregan una sustancia llamada (E)-β-farneseno ((E)-7,11-dimetil-3-metilendodeca-1,6,10-trieno) (feromona de alarma). En dosis altas esta sustancia tiene capacidad insecticida, por ello se piensa que podría ser una buena sustancia para controlar la población de este tipo de insectos de manera ecológica [4]. Dicha sustancia está producida y es utilizada por la mayoría de especies de áfidos para advertirse entre ellos [5].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el (E)-β-farneseno tiene un doble enlace conjugado muy poco estable y fácilmente oxidable por ello; en este trabajo se estudiarán análogos del (E)-β-farneseno que solucionen este inconveniente [6].

En la actualidad se conocen diversos heterociclos (oxadiazina, piridina, pirazol, etc.) que juegan un papel muy importante en el desarrollo de productos agroquímicos, entre ellos el 2-nitroimino-hexahidro-1,3,5-triazina (NHT), que tiene un bajo coste, una estructura simple y además es un grupo activo muy importante en este campo, ya que se ha descubierto que los compuestos que lo contienen presentan importantes propiedades insecticidas [7]. Por tanto, para mejorar la estabilidad y obtener una mayor actividad se ha sustituido el doble enlace del EβF por el grupo efectivo NHT. Este estudio se ha realizado a partir de datos experimentales obtenidos del trabajo de Qin *et al.* [8] con el objetivo de comprobar si los resultados obtenidos experimentalmente se asemejan al modelo QSAR (relaciones cuantitativas estructura-actividad) de predicción propuesto.

La metodología QSAR se ha convertido en una herramienta indispensable para predecir de forma rápida, precisa y efectiva las propiedades físico-químicas y biológicas de una molécula. La topología molecular se ha utilizado exitosamente en el campo de la química sostenible [9-11] para predecir los



rendimientos de diferentes tipos de reacciones [12, 13], para estudiar la biodegradabilidad de compuestos tóxicos [14] y para el diseño dirigido de fármacos [15-18], entre otras muchas aplicaciones.

El modelo QSAR es, en este caso, una ecuación lineal que relaciona las variaciones de las actividades biocida y repelente con las variaciones en los valores de las propiedades medidas (o calculadas) para una serie de moléculas. La actividad repelente representa la capacidad de dichas moléculas para alejar a los pulgones de las plantas, mientras que la actividad biocida hace referencia a su capacidad para matar a los insectos.

Para que este tipo de análisis sea válido las moléculas de prueba han de ser diferentes estructuralmente, siempre manteniendo una base común entre todas ellas. Gracias a la topología molecular y el uso de técnicas de predicción QSAR se ha podido realizar este estudio, en el cual se analiza la utilidad de los análogos del E β F, a través de la actividad repelente (RP) y la actividad biocida (M).

Por tanto, el objetivo de este trabajo es construir un modelo topológico-matemático basado en el análisis de regresión multilíneal para predecir las actividades biocidas y repelentes de un grupo de análogos del E β F.

MATERIAL Y MÉTODOS

Compuestos analizados

Como se observa en la tabla 1, en este estudio se han analizado un conjunto de 20 moléculas análogas al (E)- β -farneseno tras sustituir su doble enlace conjugado por anillos NHT que contienen una ramificación (R) diferente en función del compuesto.

Descriptores topológicos

Para caracterizar cada una de las estructuras de los compuestos estudiados se ha utilizado un conjunto de 62 descriptores. Entre ellos encontramos: constitucionales (n.º de ramificaciones R, n.º de vértices del grafo N, longitud del grafo L, etc.) [19], índices de conectividad de Randic, Kier y Hall ($^m\chi_i$) [20], índices topológicos de carga (J_m , G_m , J_m^v , G_m^v) [21], cocientes y diferencias entre los índices de conectividad de valencia y no valencia (mC_v , mD_v) [15], índice de Wiener [22], etc.

Los descriptores usados han sido obtenidos mediante el programa DESMOL2 [23], que permite la obtención de un gran número de variables topológicas de forma automática e inmediata.

Análisis de regresión multilíneal

El análisis de regresión multilíneal, ARML, tiene como objetivo encontrar la ecuación de regresión que permite correlacionar los valores de las dos propiedades estudiadas (variables dependientes) con los descriptores topológicos (variables independientes). Para este fin se utilizó el software STATISTICA versión 8.0, que calcula el coeficiente de correlación (R^2) para diferentes combinaciones

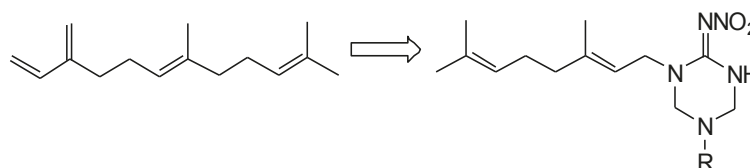


de n variables independientes, seleccionando así aquella que contiene menor n .º de variables y permite obtener un R^2 lo suficientemente significativo ($R^2 > 0,8$) para evitar el sobreajuste.

Para verificar y validar la función de predicción seleccionada se pueden realizar varios tipos de validación: (A) validación tipo *leave-one-out*, (B) validación tipo *leave-some-out*, (C) validación externa aplicando el modelo a un conjunto de compuestos reservados y mediante (D) un test de aleatoriedad. Concretamente, como criterios de validación en el presente trabajo se han utilizado dos de estos métodos (A y D).

La validación tipo *leave-one-out* consiste en reservar un compuesto, buscar la mejor ecuación usando los descriptores seleccionados y predecir con ella el valor del compuesto reservado. El proceso se repite tantas veces como compuestos forman parte del grupo de trabajo. Mientras que el *test de aleatoriedad* consiste en intercambiar aleatoriamente entre los compuestos el valor de las propiedades estudiadas y regresar utilizando los mismos descriptores del modelo. El proceso se repite varias veces, calculando el coeficiente de correlación R^2 y el coeficiente de predicción Q^2 .

Tabla 1. Estructura química de los análogos del (E)- β -farneseno y los valores experimentales de la actividad biocida (M) y repelente (RP) de los compuestos analizados en función de su ramificación (R)



COMPUESTO	R	M %	RP %
4A	CH ₃	73,2	52,2
4B	CH ₂ CH ₃	78,3	56,7
4C	(CH ₂) ₂ CH ₃	86,4	60,9
4D	(CH ₂) ₃ CH ₃	83,1	63,9
4E	(CH ₂) ₄ CH ₃	80,1	55,9
4F	CH(CH ₃) ₂	73,7	61,3
4G	CHCH ₂ (CH ₃) ₂	70,6	63,8
4H	C(CH ₃) ₃	63,2	62,9
4I	Cyclohexyl	61,5	67,1
4J	Phenyl	60,8	62,5
4K	Benzyl	59,7	61,9
4L	(4-Cl)-benzyl	72,4	67,6
4M	(2-CH ₃)-phenyl	42,8	75,6
4N	(3-CH ₃)-phenyl	44,8	67,2
4O	(4-CH ₃)-phenyl	79,0	69,5
4P	(4-CH ₂ CH ₃)-phenyl	80,9	67,7
4Q	(4-F)-phenyl	88,9	74,1
4R	(4-Cl)-phenyl	82,0	78,3
4S	(4-CH ₃)-phenyl	80,9	67,9
4T	(2,4-(CH ₃) ₂)-phenyl	74,1	79,9

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente, existen algunos estudios publicados para la obtención de compuestos con actividad biocida mediante análisis QSAR, pero ninguno de ellos estudia conjuntamente las actividades repelente y biocida de un conjunto de moléculas análogas al (E)-β-farneseno.

En este trabajo se ha seleccionado una función de cuatro variables para cada una de las dos propiedades. Los índices, coeficientes y parámetros estadísticos quedan recogidos en la tabla 2.

Tabla 2. Funciones de cuatro variables seleccionadas para las propiedades Log M* y Log RP* en el ARML y parámetros estadísticos

A)						
Log M = 2,406 + 0,483*DXO -1,900*CX4PC -0,00091* W +0,217*L						
N = 20	R ² = 0,803	Q ² = 0,670	EEE: 0,043	p < ,00004	F = 15,346	
B)						
Log RP = 1,109 + 0,047*G2 -0,115*G4V -0,208* DX1 +0,544*DX4P						
N = 20	R ² = 0,929	Q ² = 0,886	EEE: 0,014	p < ,000001	F = 48,933	

* Los datos se trataron usando la transformación logarítmica de la propiedad.

Tras evaluar individualmente los resultados obtenidos se observa que todos los descriptores moleculares son estadísticamente significativos (p-valor < 0,05). Estos datos nos indican que la información topológica y estructural es suficiente para cuantificar la actividad repelente y biocida de cada uno de los compuestos estudiados. Además, al estudiar la función en su conjunto observamos que ambas son altamente significativas, y permiten explicar, en el primer caso, el 80 % de la varianza correlacionada, y en el segundo caso hasta un 92 % de esta, con valores del error estándar de estimación (EEE) de 0,043 y 0,014, que se corresponden con porcentajes de variabilidad de la propiedad del 13,6 y 7,6 %, respectivamente.

La tabla 3 y la figura 1 ilustran los resultados experimentales y los predichos por los modelos QSAR seleccionados.

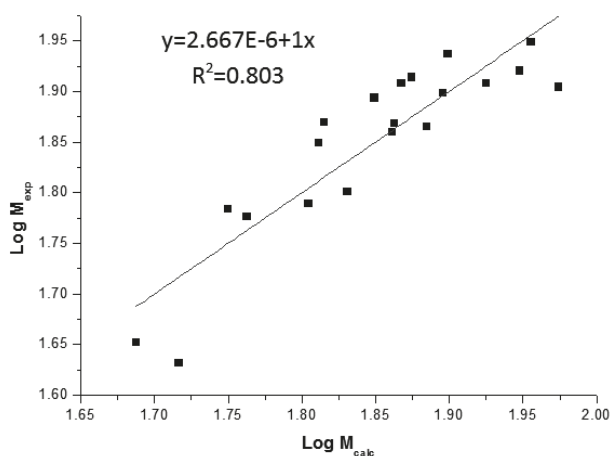
Tabla 3. Resultados predichos de Log M y Log RP para cada una de las moléculas a partir del modelo QSAR seleccionado

COMPUESTO	LogM _{EXP}	LogM _{CALC}	LogM _{CALC(ev)}	LogRP _{EXP}	LogRP _{CALC}	LogRP _{CALC(ev)}
4A	1,865	1,885	1,893	1,718	1,724	1,732
4B	1,894	1,849	1,839	1,754	1,758	1,758
4C	1,937	1,899	1,892	1,785	1,782	1,782
4D	1,920	1,948	1,955	1,806	1,779	1,775
4E	1,904	1,974	2,005	1,748	1,771	1,774



COMPUESTO	LogM _{EXP}	LogM _{CALC}	LogM _{CALC(ev)}	LogRP _{EXP}	LogRP _{CALC}	LogRP _{CALC(ev)}
4F	1,868	1,863	1,861	1,788	1,783	1,782
4G	1,849	1,812	1,807	1,805	1,803	1,802
4H	1,801	1,831	1,854	1,799	1,799	1,799
4I	1,789	1,805	1,806	1,827	1,836	1,842
4J	1,784	1,750	1,742	1,796	1,811	1,813
4K	1,776	1,763	1,759	1,792	1,782	1,780
4L	1,860	1,861	1,862	1,830	1,838	1,839
4M	1,632	1,717	1,739	1,879	1,887	1,890
4N	1,652	1,688	1,702	1,828	1,824	1,822
4O	1,898	1,896	1,895	1,842	1,848	1,849
4P	1,908	1,925	1,930	1,831	1,831	1,831
4Q	1,949	1,956	1,975	1,870	1,858	1,851
4R	1,914	1,875	1,863	1,894	1,865	1,856
4S	1,908	1,867	1,851	1,832	1,835	1,841
4T	1,870	1,815	1,804	1,903	1,913	1,918

A)



B)

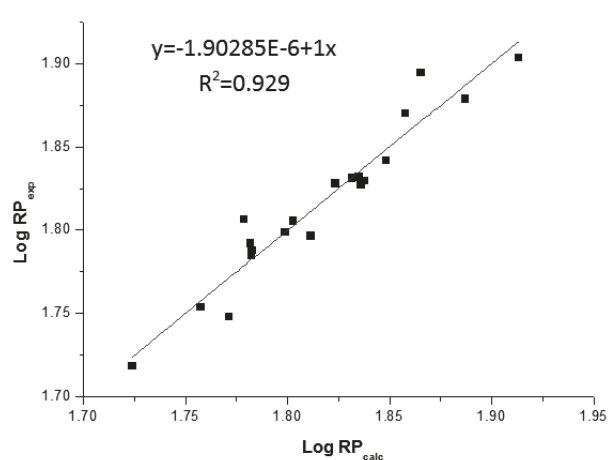


Figura 1. Representación de los datos experimentales A) Log M y B) Log RP frente a los calculados con el modelo QSAR.

Concretamente, las figuras 2 y 3 permiten confirmar que los resultados obtenidos para los compuestos se acomodan adecuadamente al modelo propuesto, ya que no se observa la presencia de ningún *outlier* y no existe ningún residual con un valor superior al doble del EEE.



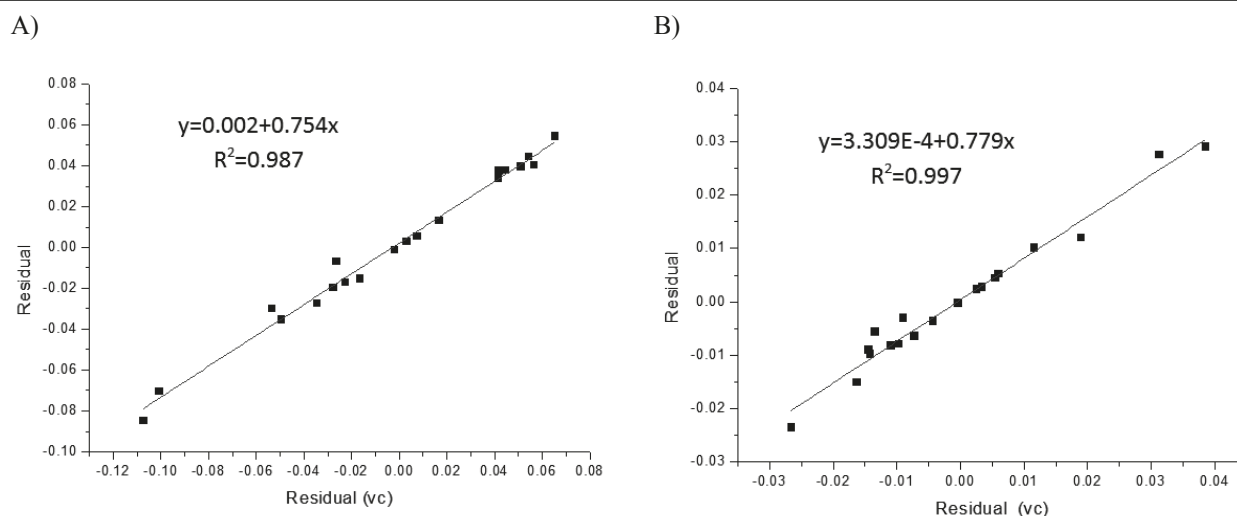


Figura 2. Representación de los valores residuales A) Log M y B) Log RP frente a los calculados al realizar la cros-validación tipo *leave-one-out*.

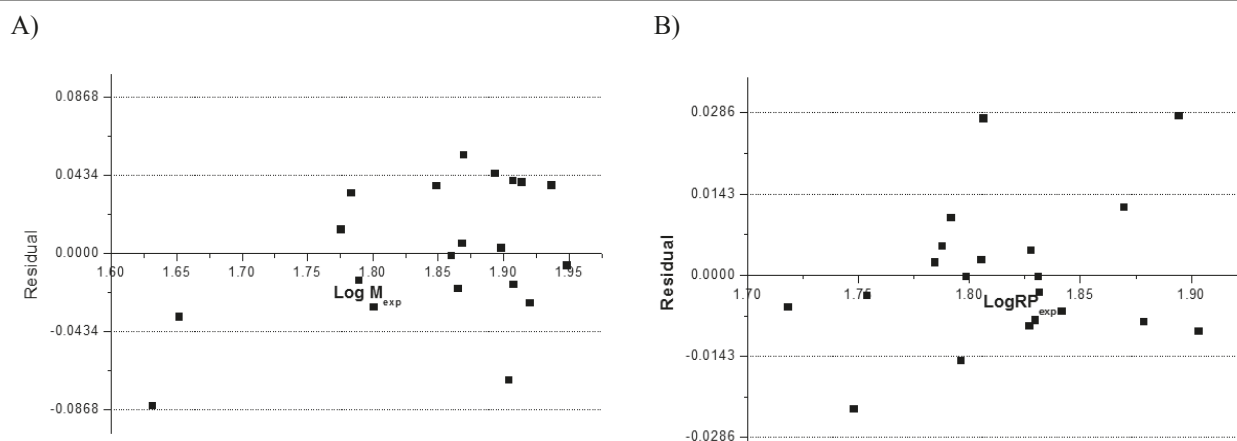


Figura 3. Representación de los valores residuales A) Log M y B) Log RP frente a los calculados al realizar la cros-validación tipo *leave-one-out*.

Por lo que respecta a la validación del modelo topológico seleccionado, en primer lugar se realizó una cros-validación tipo *leave-one-out*, que permite obtener el coeficiente de predicción (Q^2), informándonos de la calidad de la función seleccionada. En nuestro caso, el resultado permite considerar las funciones como predictivas, ya que este valor fue superior en ambos casos a 0,500, siendo para la actividad biocida de 0,670 y para la repelente de 0,886.

En segundo lugar, también se realizó un test de aleatoriedad para validar el modelo, debido a que el intervalo de la propiedad que se debe correlacionar es pequeño. La figura 4 muestra la representación de Q^2 frente a R^2 para las diez regresiones realizadas. Estas gráficas señalan que las regresiones



obtenidas son malas, exceptuando aquella que corresponde con los valores reales de la propiedad para cada compuesto, demostrando así que el modelo es estable y no aleatorio.

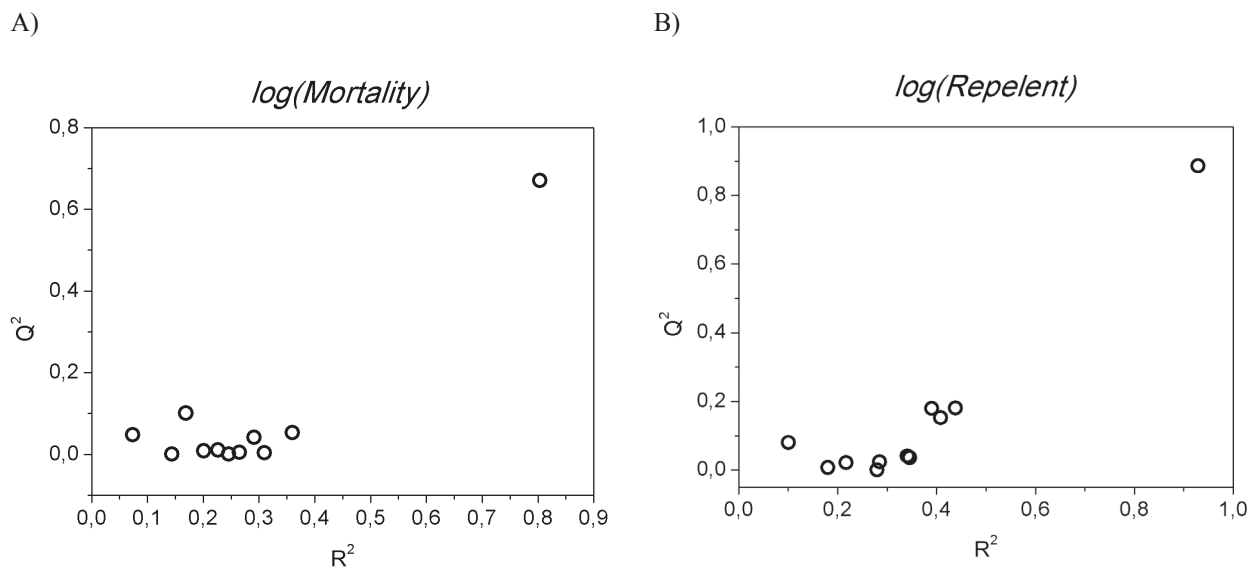


Figura 4. Representación de Q^2 frente a R^2 al realizar el test de aleatoriedad.

Una vez que se obtuvieron los modelos topológicos que definen las actividades biocida y repelente frente a pulgones, se realizó una búsqueda de nuevas moléculas, no estudiadas por Qin *et al.* [8] en su trabajo, para comprobar si era posible diseñar compuestos análogos al (E)- β -farneseno con carácter repelente y biocida como los ya encontrados.

Los autores del trabajo mencionado concluían que la molécula tenía propiedades repelentes cuando el grupo R era una cadena alquílica de hasta cuatro carbonos de longitud máxima o anillos fenilos. Además, si estos anillos contenían sustituyentes electrón-atrayentes en posición orto, la repelencia aún era mayor. En el caso de la actividad biocida, defendían que esta era mayor cuando la R de la molécula era una cadena alquílica con un anillo fenilo, aunque era posible encontrar niveles de actividad destacables en moléculas con anillos fenilos, si este contenía un sustituyente en la posición para. Por este motivo, la cantidad de moléculas con actividad tanto repelente como biocida es reducida debido a las características estructurales que definen cada una de las propiedades, siendo algunas de estas características favorables para una propiedad, pero contraproducentes para la otra.

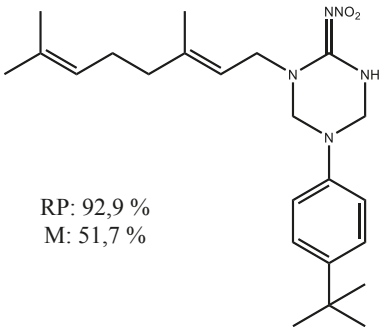
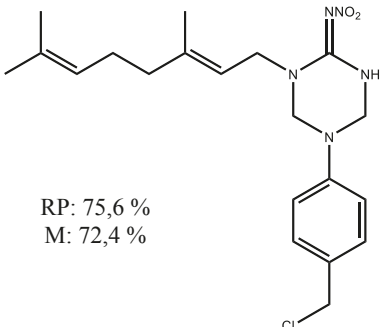
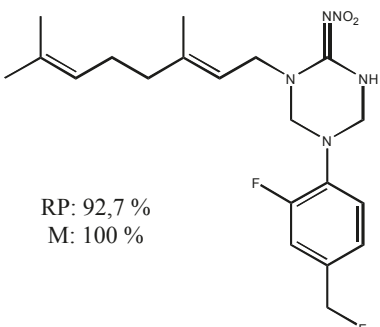
Debido a las restricciones estructurales para encontrar nuevas moléculas, los primeros diseños consistieron en variaciones de las mejores moléculas encontradas por Qin *et al.* El primer diseño que se realizó fue una variante de la molécula **4T**. Esta molécula contiene en R un anillo fenilo sustituido en orto y para por un grupo metilo, mientras que nuestro diseño contiene un grupo metilo en la otra posición orto. La cuantificación de las dos propiedades da valores notablemente buenos; 80,1 % de repelencia y un 74,1 % de mortalidad para **4T**. Según los autores del trabajo, una molécula con una actividad por encima del 80 % significa que tiene una actividad similar a la de los insecticidas co-

merciales. En el caso de nuestra molécula **U** (tabla 4), la actividad repelente se vio aumentada, hasta alcanzar un porcentaje del 92,9 %, aunque con una actividad insecticida (mortalidad) del 51,7 %.

El segundo diseño, **molécula V** (tabla 4), se realizó a partir de la mejor molécula encontrada en el trabajo, la **4R**. En esta molécula, su grupo R contiene un grupo fenilo con un cloro en la posición para. Esta estructura le da una actividad repelente del 78,4 % e insecticida del 82,1 %. En nuestro caso, sustituimos el cloro por un clorometano. Los resultados obtenidos con el modelo QSAR fueron de un 75,6 % para la actividad repelente y de un 72,4 % para la insecticida.

Muchas otras moléculas fueron diseñadas con diferentes grupos funcionales y en distintas posiciones. La mayoría de estos diseños presentaban, según el modelo QSAR, buena actividad repelente, pero una baja actividad insecticida. Por tanto, la dificultad del diseño se encontraba en la tarea de buscar una molécula que presentara una actividad biocida mayor del 80 %. Finalmente, se encontró un patrón en el diseño de moléculas que presentaba valores notorios, tanto de repelencia como insecticida. El patrón consistía en situar en posición orto del fenilo un grupo flúor e ir modificando la posición para con un sustituyente, preferiblemente una cadena alquílica corta. La mejor molécula encontrada, **molécula W** (tabla 4), presentaba un valor de repelencia del 92,7 % y un valor de actividad insecticida del 100 %, igualando el valor del E- β -farneseno.

Tabla 4. Moléculas diseñadas a partir de los resultados de predicción obtenidos por el modelo QSAR

U	V	W
 RP: 92,9 % M: 51,7 %	 RP: 75,6 % M: 72,4 %	 RP: 92,7 % M: 100 %

CONCLUSIONES

La topología molecular ha demostrado ser una herramienta útil y de elevado potencial para construir un modelo QSAR con buena capacidad predictiva para la búsqueda de compuestos que actúen como plaguicidas; en nuestro caso, para evitar las plagas de pulgones. Además, a la luz de los resultados positivos, esta metodología resulta imprescindible y necesaria para lograr un diseño dirigido que permita la síntesis de moléculas con actividades y propiedades más elevadas que las descritas hasta el momento, sin necesidad de procedimientos experimentales. Si bien el modelo utilizado presenta una aplicabilidad restringida al dominio estructural de los análogos al (E)- β -farneseno, el descubrimiento



de un patrón que permite diseñar compuestos, como el **W**, con elevada actividad repelente y biocida, podría suponer una nueva alternativa limpia, sostenible, estable y eficaz a los problemas generados por las plagas de pulgones o áfidos, y que por similitud anatómico-fisiológica sería aplicable a otras especies de insectos hemípteros.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Máster en Química Sostenible de la Facultad de Química de la Universitat de València los medios y la ayuda prestados en el desarrollo y preparación del trabajo. Igualmente, damos las gracias al MINECO (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) por el proyecto «Desarrollo de nuevas herramientas para el control de oidios» (AGL2016-76216-C2-2-R.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dedryver C-A, Le Ralec A, Fabre F. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*. 2010;333(6):539-53.
- [2] Bonnemain J-L. Aphids as biological models and agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*. 2010;333(6):461-3.
- [3] Pickett JA, Allemann RK, Birkett MA. The semiochemistry of aphids. *Natural Product Reports*. 2013;30(10):1277-83.
- [4] Sun Y, Qiao H, Ling Y, Yang S, Rui C, Pelosi P, et al. New Analogues of (E)- β -Farnesene with Insecticidal Activity and Binding Affinity to Aphid Odorant-Binding Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(6):2456-61.
- [5] Vandermoten S, Mescher MC, Francis F, Haubruge E, Verheggen FJ. Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2012;42(3):155-63.
- [6] Sun YF, De Biasio F, Qiao HL, Iovinella I, Yang SX, Ling Y, et al. Two Odorant-Binding Proteins Mediate the Behavioural Response of Aphids to the Alarm Pheromone (E)- β -farnesene and Structural Analogues. *PLOS ONE*. 2012;7(3):e32759.
- [7] Lv C, Yu L, Wang J, Tang X. A dumbbell molecular beacon for the specific recognition of nucleic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010;20(22):6547-50.
- [8] Qin Y, Zhang J, Song D, Duan H, Li W, Yang X. Novel (E)- β -Farnesene Analogues Containing 2-Nitroimino-hexahydro-1,3,5-triazine: Synthesis and Biological Activity Evaluation. *Molecules*. 2016;21(7):825.
- [9] Jastorff B, Stormann R, Ranke J, Molter K, Stock F, Oberheitmann B *et al.* How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chemistry*. 2003;5(2):136-42.



- [10] Gramatica P, Cassani S, Sangion A. Aquatic ecotoxicity of personal care products: QSAR models and ranking for prioritization and safer alternatives' design. *Green Chemistry*. 2016;18(16):4393-406.
- [11] Rusyn I, Greene N. The Impact of Novel Assessment Methodologies in Toxicology on Green Chemistry and Chemical Alternatives. *Toxicological Sciences*. 2018;161(2):276-84.
- [12] Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García-Doménech R. Application of molecular topology for the prediction of the reaction times and yields under solvent-free conditions. *Green Chemistry*. 2010;12(6):1056-61.
- [13] Pla-Franco J, Gálvez-Llompарт M, Gálvez J, García-Doménech R. Application of Molecular Topology for the Prediction of Reaction Yields and Anti-Inflammatory Activity of Heterocyclic Amidine Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(2):1281.
- [14] Satpathy R. Quantitative Structure-Activity Modelling of Toxic Compounds. In: KM. Gothandam, S. Ranjan, N. Dasgupta, C. Ramalingam, E. Lichtfouse (eds.). *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*. Cham: Springer International Publishing. 2018:313-31.
- [15] Gálvez J, García-Doménech R, de Julián-Ortiz JV, Soler R. Topological Approach to Drug Design. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 1995;35(2):272-84.
- [16] Qi-Shi D, Ri-Bo H, Kuo-Chen C. Recent Advances in QSAR and Their Applications in Predicting the Activities of Chemical Molecules, Peptides and Proteins for Drug Design. *Current Protein & Peptide Science*. 2008;9(3):248-59.
- [17] Danishuddin KAU. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discovery Today*. 2016;21(8):1291-302.
- [18] Martínez JRB, Ovando CDT, Ovando NT, Llompарт MG, Álvarez JG. Aplicación de topología molecular a la predicción de la actividad frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense* de compuestos bicíclicos derivados de la 4-metilpiperazina. *Nereis: revista iberoamericana interdisciplinar de métodos, modelización y simulación*. 2015;(7):27-38.
- [19] Moliner R, García F, Gálvez J, García-Doménech R, Serrano C. Nuevos Índices Topológicos en Conectividad Molecular. Su Aplicación a algunas Propiedades Físico Químicas de un Grupo de Hidrocarburos Alifáticos. *An R Acad Farm*. 1991;57:287-98.
- [20] Kier LB, Hall LH. General definition of valence delta-values for molecular connectivity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1983;72(10):1170-3.
- [21] Gálvez J, García R, Salabert MT, Soler R. Charge Indexes. New Topological Descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 1994;34(3):520-5.
- [22] Wiener H. Structural determination of paraffin boiling points. *Journal of the American Chemical Society*. 1947;69(1):17-20.
- [23] Desmol2 software. Molecular Connectivity and Drug Design Research Unit. Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia. 2000.



Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	25-36	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	-------	---	-------------------	----------------

Post-emergent herbicidal activity of *Eucalyptus globulus* Labill. essential oil

Actividad herbicida post-emergente del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill

Fecha de recepción y aceptación: 9 de septiembre de 2017, 12 de diciembre de 2017

M. Dolores Ibáñez Jaime¹ and M. Amparo Blázquez Ferrer^{1*}

¹ Departament de Farmacologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de València.

* Correspondencia: Universitat de València. Facultat de Farmàcia. Departament de Farmacologia. Avenida V. A. Estellés, s/n. 46100 (Burjassot) Valencia. España. E- mail: mijai@alumni.uv.es; amparo.blazquez@uv.es



ABSTRACT

Weed resistances to synthetic herbicides, as well as consequent health and environmental problems, are important items to find more eco-friendly natural alternatives to weed control. *Eucalyptus globulus* Labill. essential oil has been traditionally used against respiratory troubles as well as an insect repellent due to 1,8-cineole content. Chemical composition of commercial *E. globulus* essential oil and its phytotoxic activity against three common annual weeds (*Portulaca oleracea* L., *Echinochloa crus-galli* (L) Beau. and *Lolium multiflorum* Lam.) has been studied. 28 compounds reaching 99.83% of the total essential oil were identified by gas chromatography-mass spectrometry analysis. The oxygenated monoterpene 1,8-cineole (76.43±0.35%), followed by the monoterpene hydrocarbon α -pinene (14.64±0.27%) were the main compounds. *E. globulus* essential oil lacks of phytotoxicity against the seed germination of the tested weed, showing significant effect on hypocotyl and radicle elongation of *E. crus-galli* at the highest dose (1 μ L/mL) assayed and radicle inhibitory effects at all concentrations applied (0.125, 0.25, 0.50 and 1 μ L/mL) against *L. multiflorum*. *E. globulus* essential oil could be used in the management of *E. crus-galli* due to its post-emergent herbicidal activity.

KEYWORDS: *Eucalyptus globulus*, essential oil, GC-MS, phytotoxic activity.

RESUMEN

La aparición de resistencias debido al uso de herbicidas sintéticos, así como los consiguientes problemas de salud y medioambientales, son factores importantes en la búsqueda de alternativas naturales respetuosas con el medio ambiente en el control de malas hierbas. El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill se ha empleado tradicionalmente en problemas respiratorios y como repelente de insectos por su contenido en 1,8-cineol. Se ha determinado la composición química del aceite esencial comercial de *E. globulus* y su actividad fitotóxica en tres conocidas malas hierbas anuales (*Portulaca oleracea* L., *Echinochloa crus-galli* (L) Beau y *Lolium multiflorum* Lam.). Se identificaron veintiocho compuestos que representan el 99,83 % de la composición total de este, mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas. Los componentes mayoritarios fueron el monoterpeneo oxigenado 1,8-cineol (76,43 ± 0,35 %) y el monoterpeneo hidrocarbonado α -pineno (14,64 ± 0,27 %). El aceite esencial de *E. globulus* carece de actividad frente a la germinación de semillas de las malas hierbas ensayadas, mostrando efecto inhibitorio signi-

ficativo sobre la elongación del hipocotilo y radícula de *E. crus-galli* a la dosis más alta (1 $\mu\text{L/mL}$) empleada y sobre el crecimiento de la radícula de *L. multiflorum* a todas las concentraciones (0,125, 0,25, 0,50 y 1 $\mu\text{L/mL}$) aplicadas. El aceite esencial de *E. globulus* puede utilizarse en el manejo de *E. crus-galli* debido a su actividad herbicida postemergente.

PALABRAS CLAVE: *Eucalyptus globulus*, aceite esencial, CG-EM, actividad fitotóxica.

INTRODUCTION

Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) is a tree belonging to the Myrtaceae family which leaves are traditionally used in cough and flu disorders by its antitarrhal, expectorant and antipneumonic properties [1,2]. Its essential oil has been included in a mixture with other volatile oils to relieve muscular aches, arthritis and respiratory troubles [3], being recently corroborated the mucolytic effect of the fluid extract obtained from the leaves of *E. globulus* together with *Borago officinalis* L. and *Sambucus nigra* L. [4]. In addition, its essential oil is also a recognized insecticidal agent commonly used not only as an alternative pediculicide with a 100 % of effectiveness in humans [5] but also as insect repellent against harmful creatures in agriculture, such as housefly (*Musca domestica*) and *Acanthoscelides obtectus* [6-8]. In this sense, *E. globulus* essential oil is being studied for pest control in food production, due to its wide-spectrum antimicrobial activity against storage foodstuff pathogens, like certain bacteria including *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [9], fungal strains with a dose-dependent fungicidal effect against *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and their aflatoxin production [10] and also against the normal development of *Fusarium verticillioides* by delaying spore germination causing a reduction in fumonisin production, too [11], as well as against other food spoilage microorganisms, such as yeasts strains (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*) [9]. Regarding this, there is an increased interest in the research of the industrial application of these properties, for instance *E. globulus* essential oil is incorporated as a natural antimicrobial ingredient in edible films exhibiting its antimicrobial and antioxidant properties and consequently enhancing microbial safety and shelf-life of food [12].

It is interesting to note the pesticide activity of natural compounds and their potential applications, particularly for a sustainable agriculture [13,14] due to the rising agrochemical problematic: the World Health Organization (WHO) warns about synthetic pesticides that have been seen to cause serious public health effects along years as consequence of the presence of considerable levels of pesticide residues in ground and surface water, as well as in food with their subsequently cause of human acute poisonings and even more cancer and other chronic illnesses [15,16]. Furthermore, it is of indispensable consideration the constant emergence of resistances by practically every type of organisms after the extensive use of pesticides making this fact one of the top four environmental problems in the world [15].

According to this, it is popularly known the case of glyphosate, the world's best known herbicide, whose resulting resistances have been described in many worldwide species, like common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in several row crops of the south-eastern USA following other still unknown mechanisms of action [17], annual ryegrass (*Lolium rigidum* L.) in Australia [18] or barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) in cotton fields of the midsouthern United States [19].



Consequently, the phytotoxic effect of several essential oils continues to be studied against seed germination and seedling growth of some weeds [20]. For instance, *Citrus aurantiifolia* essential oil has demonstrated herbicidal effect against three agricultural weeds, *Avena fatua*, *Echinochloa crus-galli* and *Phalaris minor*, reducing their germination at ≥ 0.25 -0.50 mg/mL as well as the coleoptile and root growth at ≥ 0.10 -0.50 mg/mL [21]. Thyme (*Thymus vulgaris*), summer savory (*Satureja hortensis*), clove (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils have provided phytotoxic results causing electrolyte leakage and cell death of dandelion leaf (*Taraxacum officinale* Weber in Wiggers) [22], showing also *S. hortensis* essential oil nanoemulsion changes on germination, growth and morphophysiological features of *Amaranthus retroflexus* L. and *Chenopodium album* L. [23].

In relation to *E. globulus* essential oil, it is able to exert strong deleterious effects on the germination of *A. retroflexus* and *Portulaca oleracea* L. [24], seed germination and seedling growth of *Parthenium hysterophorus* L. [25] as well as on germination percentage and germination rate, radicle length, plumule length, primary root and pedicle length, and seedling height of *A. blitoides* and *Cynodos dactylon* (L.) Pers., at increasing concentrations [26].

Together the phytotoxic effects it is important to find selective herbicides that only disturb the seed germination and seedling development of weeds, without toxic effects on food crops.

So, the aims of this work are firstly to standardize through gas chromatography-mass spectrometry analysis the chemical composition of the commercial *E. globulus* essential oil in order to assure its main compounds and secondly, to determine their *in vitro* phytotoxic activity against seed germination and seedling growth of *P. oleracea*, a cosmopolitan annual weed of tropical and subtropical climates, *L. multiflorum*, a grass distributed along temperate climates affecting mostly cereals and *E. crus-galli*, an annual plant seriously influencing irrigation crops, especially rice, in order to obtain eco-friendly herbicides.

MATERIALS AND METHODS

Essential Oil

Commercial sample of eucalyptus (*E. globulus* Labill.) (Batch 0065901) essential oil purchased from Guinama Lab. (Valencia, Spain), was stored at 4 °C until chemical analysis and phytotoxic studies were carried out.

Seeds

Mature seeds of annual weeds of common purslane (*Portulaca oleracea* L.), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.), were purchased from Herbiseed, UK (website: www.herbiseed.com).



Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis

GC-MS analysis was carried out with a 5973N Agilent apparatus, equipped with a capillary column (95 dimethylpolysiloxane- 5 % diphenyl), HP-5MS UI (30 m long and 0.25 mm i.d. with 0.25 μm film thickness). The column temperature program was 60 °C during 5 min, with 3 °C/min increases to 180 °C, then 20 °C/min increases to 280 °C, which was maintained for 10 min. The carrier gas was helium at a flow-rate of 1 mL/min. Split mode injection (ratio 1:30) was employed. Mass spectra were taken over the m/z 30-500 range with an ionizing voltage of 70 eV.

Identification

The individual compounds were identified by mass spectra and their identity was confirmed by comparison of their Kovat's retention index calculated using standard hydrocarbons relative to C_8 - C_{32} *n*-alkanes, and mass spectra with reference samples or with data already available in the NIST 2005 Mass Spectral library and in the literature [27].

Herbicidal Activity

Sets of 20 seeds each with five replicates per treatment were homogenously distributed in Petri dishes (9 cm diameter) between two layers of filter paper (Whatman No.1) moistened with 4 mL of distilled water and with 0 (control), 0.125, 0.250, 0.5, and 1 $\mu\text{L/mL}$ of *E. globulus* essential oil. Petri dishes were sealed with parafilm and incubated in a germination chamber Equitec EGCS 301 3SHR model, according to previous assays [28] alternating 30.0 ± 0.1 °C 16 h in light and 20.0 ± 0.1 °C 8 h in dark and with (*E. crus-galli*) and without (*P. oleracea*, *L. multiflorum*) humidity. To evaluate the herbicidal activity of the essential oil, the number of germinated seeds was counted and compared with those of untreated seedlings. Emergence of the radicle (≥ 1 mm) was used as an index of germination and seedling length (hypocotyl and/or radicle) data was recorder after 3, 5, 7, 10 and 14 days in each replicate.

Statistical Analysis

Experiments were made with five replicates. Resulting data were subjected to one-way analysis of variance with IBM SPSS statistics 22 software. Tukey's *post hoc* test was used when variances remained homogeneous (Levene's test) and T3 Dunnett's *post hoc* one was employed if not, assuming equal variances. Differences were considered to be significant at $p \leq 0.05$.



RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Composition of *E. globulus* Essential Oil

Twenty-eight compounds reaching 99.83 % of the total commercial *E. globulus* essential oil were identified by gas chromatography-mass spectrometry analysis. Compounds are clustered (Table 1) in homologous series of monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, and oxygenated sesquiterpenes and listed according to Kovat's retention index calculated in GC on apolar HP-5MS column.

Highest quantities of monoterpene compounds (98.78 %) were found in *E. globulus* essential oil. Twelve monoterpene hydrocarbons (21.93 ± 0.08 %) and seven oxygenated monoterpenes (76.85 ± 0.13 %) constituted the monoterpene fraction. The oxygenated monoterpene 1,8-cineole (76.43 ± 0.35 %) followed by the monoterpene hydrocarbon α -pinene (14.64 ± 0.27 %) were the main compounds. Among the monoterpene hydrocarbons, also large quantities of β -pinene (3.26 ± 0.03 %) and γ -terpinene (2.00 ± 0.02 %) were found.

β -Caryophyllene and longifolene with 0.51 ± 0.01 % and 0.30 ± 0.00 %, respectively, were the principal components among the sesquiterpene hydrocarbons. No higher percentages than 0.1 % were found among the other sesquiterpene hydrocarbons identified.

Finally, caryophyllene oxide (0.04 ± 0.00 %) was the only oxygenated sesquiterpene found in *E. globulus* essential oil here analyzed (Table 1).

The results obtained were similar to recent research [29] with 1,8-cineole (76.6 %) and α -pinene (12.9 %) as the main compounds of *E. globulus* essential oil and different from those obtained from samples of Algeria [30] in which 1,8-cineole is the main compound (55.3 %) followed by spathulenol (7.4 %) and α -terpineol (5.5 %).

Eucalyptus spp. are characterized by a great variability of the main compounds in their essential oils. Thus, in samples collected in Pakistan, large amount of citronellal (22.3 %) and citronellol (20.0 %) have been found in *E. citriodora* essential oil. Limonene (14.3 %) and terpinen-4-ol (10.2 %) were the main compounds in *E. crebra* essential oil; 1,8-cineole (15.2 %) and α -pinene (12.1 %) in *E. tereticornis* essential oil, while linalool (17.0 %), followed by 1,8-cineole (16.1 %), were the principal components in *E. camaldulensis* [31]. However, *E. camaldulensis* is also characterized by a high content of spathulenol (41.46 %) and *p*-cymene (21.92 %) in samples collected in Valencia (Spain) [32]. The different chemical composition may be attributed to geographical, environmental and climatic differences [31].



Table 1. Chemical composition of commercial *E. globulus* essential oil

RT	RI	Compound	<i>E. globulus</i> Peak area (%)
Monoterpene hydrocarbons			21.93±0.08
6.58	925	α -Thujene	0.01±0.00
6.88	933	α -Pinene	14.64±0.27
7.36	936	Camphene	0.18±0.00
7.58	952	Thuja-2,4(10)-diene	0.01±0.00
8.48	973	β -Pinene	3.26±0.03
9.11	987	Myrcene	0.77±0.01
9.65	998	α -Phellandrene	0.58±0.01
10.20	1012	α -Terpinene	0.14±0.01
11.25	1037	(Z)- β -Ocimene	0.11±0.01
11.68	1047	(E)- β -Ocimene	0.03±0.00
12.13	1056	γ -Terpinene	2.00±0.02
13.46	1083	Terpinolene	0.22±0.01
Oxygenated monoterpenes			76.85±0.13
11.10	1033	1,8-Cineole	76.43±0.35
13.87	1091	Linalool	0.02±0.01
14.04	1094	α -Pinene oxide	0.01±0.00
17.59	1171	Terpinen-4-ol	0.04±0.01
18.01	1479	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0.01±0.01
18.24	1184	α -Terpineol	0.31±0.02
22.62	1278	Bornyl acetate	0.03±0.00
Sesquiterpene hydrocarbons			1.01±0.00
25.38	1341	α -Cubebene	0.05±0.00
26.21	1360	Longicyclene	0.01±0.00
27.71	1393	Longifolene	0.30±0.00
28.34	1408	β -Caryophyllene	0.51±0.01
29.74	1443	α -Humulene	0.06±0.00
30.72	1467	γ -Muurolene	0.01±0.01
31.68	1490	α -Muurolene	0.01±0.00
32.60	1513	δ -Cadinene	0.06±0.00
Oxygenated sesquiterpenes			0.04±0.00
34.85	1571	Caryophyllene oxide	0.04±0.00
TOTAL			99.83±0.21

RI, retention index relative to C₈-C₃₂ *n*-alkane on HP-5MS column; values are mean ± standard deviation of three samples.

1,8-Cineole, the main constituent of the essential oil from *E. globulus* and other species, is a well-known wide-spectrum antibacterial agent [7]. Synergic effects against antibiotic-resistant pathogens have been observed when combined with the sesquiterpene hydrocarbon aromadendrene, the main



compound of the essential oil from the fruits of *E. globulus* [33], and also with chlorhexidine digluconate, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic and biofilm cultures [34,35].

On the other hand, its combination with α -pinene, the second main component of *E. globulus* essential oil analysed here, provides beneficial effects against cellular oxidative stress, preventing reactive oxygen species-induced damage involved in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease [36].

Seed Germination and Seedling Growth Inhibition of *P. oleracea*, *L. multiflorum* and *E. crus-galli*, by *E. globulus* Essential Oil

The phytotoxic effect of *E. globulus* essential oil against seed germination and seedling growth of three well-known weeds, *P. oleracea*, *E. crus-galli* and *L. multiflorum*, is shown in Table 2 and Figures 1-3.

E. globulus essential oil had no effect against *P. oleracea*, *E. crus-galli* and *L. multiflorum* seed germination. No significant differences were found between control and all doses (0.125, 0.25, 0.5 and 1 $\mu\text{L/mL}$) assayed (Table 2).

Table 2. *In vitro* effects of *E. globulus* essential oil against *P. oleracea*, *L. multiflorum* and *E. crus-galli* seed germination and seedling growth

Concentration ($\mu\text{L/mL}$)	<i>P. oleracea</i>		
	Germination	Hypocotyl growth	Radicle growth
Control	67.00 $\pm$ 4.06 a	2.40 $\pm$ 0.34 a	1.50 $\pm$ 0.28 a
0.125	70.00 $\pm$ 6.12 a	2.33 $\pm$ 0.43 a	1.29 $\pm$ 0.16 a
0.25	64.00 $\pm$ 2.45 a	2.08 $\pm$ 0.13 a	1.32 $\pm$ 0.19 a
0.5	66.00 $\pm$ 4.85 a	1.83 $\pm$ 0.35 a	1.50 $\pm$ 0.33 a
1	70.00 $\pm$ 1.58 a	1.83 $\pm$ 0.19 a	1.81 $\pm$ 0.22 a
Concentration ($\mu\text{L/mL}$)	<i>E. crus-galli</i>		
	Germination	Hypocotyl growth	Radicle growth
Control	74.00 $\pm$ 3.32 a	22.97 $\pm$ 1.75 a	18.92 $\pm$ 1.26 a
0.125	87.00 $\pm$ 2.55 a	22.95 $\pm$ 1.20 a	18.34 $\pm$ 1.09 a,b
0.25	73.00 $\pm$ 2.55 a	17.76 $\pm$ 1.09 a,b	17.70 $\pm$ 0.73 a,b
0.5	74.00 $\pm$ 3.32 a	17.92 $\pm$ 1.83 a,b	13.45 $\pm$ 0.82 a,b
1	78.00 $\pm$ 5.39 a	15.81 $\pm$ 2.14 b	15.38 $\pm$ 1.78 b
Concentration ($\mu\text{L/mL}$)	<i>L. multiflorum</i>		
	Germination	Hypocotyl growth	Radicle growth
Control	67.00 $\pm$ 2.00 a	29.18 $\pm$ 1.26 a	32.92 $\pm$ 2.63 a
0.125	55.00 $\pm$ 2.74 a	24.46 $\pm$ 0.55 a	19.35 $\pm$ 1.22 b
0.25	63.00 $\pm$ 3.39 a	25.08 $\pm$ 1.55 a	18.01 $\pm$ 0.78 b
0.5	63.00 $\pm$ 5.39 a	24.77 $\pm$ 1.97 a	13.95 $\pm$ 1.68 b
1	63.00 $\pm$ 3.00 a	24.60 $\pm$ 0.61 a	15.49 $\pm$ 1.19 b

^a Values are mean of five replications $\pm$ error deviation after 14 days of incubation. Means followed by different letters in the same column indicate that are significantly different at $p>0.05$ according to T3 Dunnet and Tukey tests.



According to seedling growth, no significant differences in the seedling development (hypocotyl and radicle) of *P. oleracea* were observed after the application of *E. globulus* essential oil at all the concentrations assayed in comparison to control (Table 2, Figure 1).

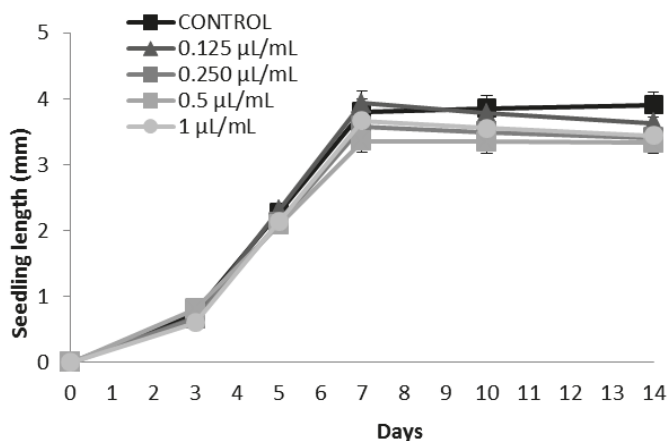


Figure 1. *P. oleracea* seedling growth with *E. globulus* essential oil. Control and treated with *E. globulus* essential oil at 0.125, 0.25, 0.5 and 1 µL/mL.

However, both hypocotyl and radicle of *E. crus-galli* were significantly inhibited at the highest dose tried (1 µL/mL) reaching 31.17 and 18.71 % of growth reduction with respect to control (Table 2, Figure 2).

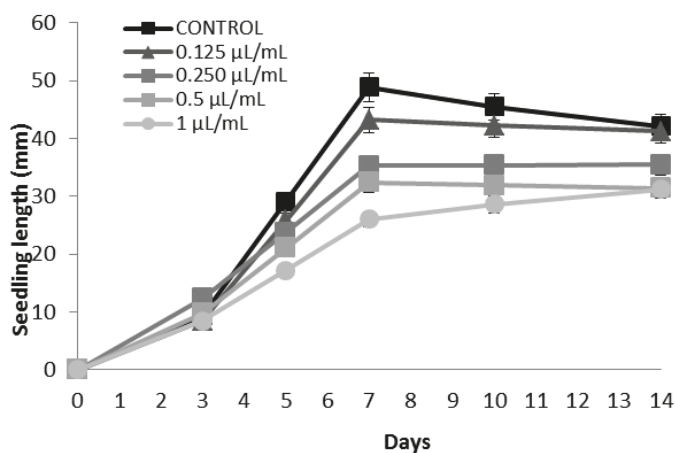


Figure 2. *E. crus-galli* growth with *E. globulus* essential oil. Control and treated with *E. globulus* essential oil at 0.125, 0.25, 0.5 and 1 µL/mL.

Regarding *L. multiflorum* evolution, although no significant differences were observed in its hypocotyl growth (Table 2), the radicle development was considerably reduced between 41.22-52.95 % without differences between all concentrations (0.125, 0.25, 0.50 and 1 $\mu\text{L/mL}$) applied (Table 2, Figure 3).

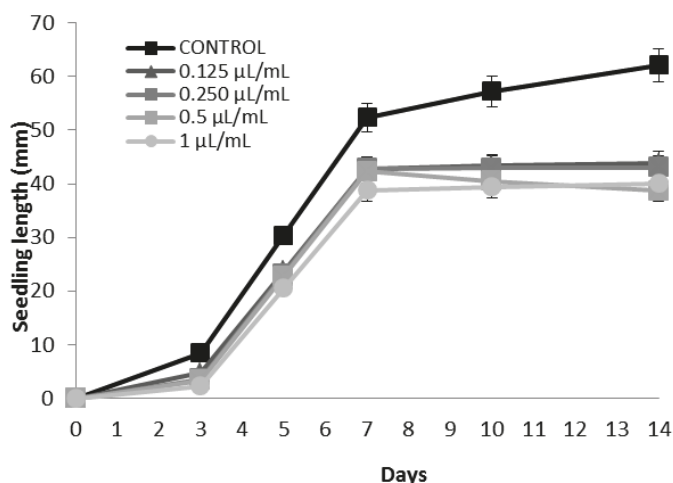


Figure 3. *L. multiflorum* seedling growth with *E. globulus* essential oil. Control and treated with *E. globulus* essential oil at 0.125, 0.25, 0.5 and 1 $\mu\text{L/mL}$.

The herbicidal potential is closely related with the essential oil composition, weeds and doses applied. In this way, at the same doses and weed, *E. globulus* essential oil with 1,8-cineole (76.43 %) has no phytotoxic effect against *P. oleracea* seed germination and seedling growth whereas *E. camadulensis* essential oil with spathulenol (41.46 %) as main compound was able to completely inhibit the seed germination of this cosmopolitan weed [32].

Regarding the weed, *E. globulus* essential oil showed at the doses employed significant effect on *E. crus-galli* seedling growth without phytotoxic effects against *E. crus-galli* seed germination while at higher doses (100 and 250 $\mu\text{g/m}$) *E. tereticornis* essential oil with α -pinene, 1,8-cineole and β -pinene as the main compounds significantly affected both seed germination and seedling growth of *E. crus-galli* [37]. Finally, lower doses of *E. globulus* essential oil showed significant effects on seed germination and seedling development of other weeds such as *A. blitoides* and *C. dactylon* [26].

CONCLUSION

E. globulus essential oil with 1,8-cineole (76.43 %) and α -pinene (14.64 %) as the main compounds represents a potentially effective bioherbicide in the management of *E. crus-galli*. Further



studies are needed with higher doses of *E. globulus* essential oil in order to corroborate a potential use also as a pre-emergent herbicide as well as its phytotoxic effects against food crops, mainly rice and other cereals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Central Service for Experimental Research of the University of Valencia (SCSIE) for providing the Gas Chromatography–Mass Spectrometry equipment.

REFERENCES

- [1] Castro JA, Brasileiro BP, Lyra DH, De Almeida D. Ethnobotanical study of traditional uses of medicinal plants : The flora of caatinga in the community of Cravolândia-BA. Brazil. 2011;5(10):1905-17.
- [2] Rigat M, Vallès J, Iglésias J, Garnatje T. Traditional and alternative natural therapeutic products used in the treatment of respiratory tract infectious diseases in the eastern Catalan Pyrenees (Iberian Peninsula). J Ethnopharmacol. 2013;148(2):411-22.
- [3] Quezada RS. Therapeutic oil composition. United States Patent. Patent No.: 6,582,736 B2. 2003; June 24:1-5.
- [4] López AJ, Miranda M, Bello A, García G. Expectorant and toxicological activity of a formulation made from *Eucalyptus globulus* Labill, *Borago officinalis* L., and *Sambucus nigra* L. Rev Cuba Plantas Med. 2016;21(4):1-9.
- [5] Avello M, Fernández P, Fernández M, Schulz B, de Diego M, Mennickent S *et al.* Efecto pediculicida de una formulación en base a *Eucalyptus globulus* L. Rev Chil Infectol. 2016;33(4):433-7.
- [6] Papachristos DP, Stamopoulos DC. Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). J Stored Prod Res. 2002;38(4):365-73.
- [7] Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. For Ecol Manage. 2008;256(12):2166-74.
- [8] Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). Acta Trop. 2012;122(2):212-8.
- [9] Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chem. 2011;126(1):228-35.
- [10] Vilela GR, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MF das GF *et al.* Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. J Stored Prod Res. 2009;45(2):108-11.



- [11] López-Meneses AK, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Rosas-Burgos EC, Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. Food Sci Technol. 2015;35(4):664-71.
- [12] Hafsa J, Ali Smach M, Ben Khedher MR, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H *et al*. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. LWT - Food Sci Technol. 2016;68:356-64.
- [13] Isman MB, Miresmailli S, MacHial C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochem Rev. 2011;10(2):197-204.
- [14] FAO. AGP - Pest and Pesticide Management [Internet]. 2018 [cited 2018 Jan 7]. Available from: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/en/>.
- [15] Abrol DP, Burgess M, Chandran RS, Clark B, Culliney TW, Feola G, *et al*. Integrated Pest Management. Pimentel D, Peshin R, editors. Springer; 2014. 474.
- [16] World Health Organization. Pesticide residues in food [Internet]. 2018 [cited 2018 Jan 7]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/pesticide-residues-food/en/>.
- [17] Nandula VK, Tehranchian P, Bond JA, Norsworthy JK, Eubank TW. Glyphosate resistance in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) from Mississippi, USA. Weed Biol Manag. 2017;17(1):45-53.
- [18] Powles SB, Lorraine-Colwill DF, Dellow JJ, Preston C. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. Weed Sci. 1998;46(5):604-7.
- [19] Bagavathiannan MV, Norsworthy JK, Smith KL, Neve P. Modeling the evolution of glyphosate resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in cotton-based production systems of the midsouthern United States. Weed Technol. 2013;27(3):475-87.
- [20] Synowiec A, Kalemba D, Drozdek E, Bocianowski J. Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. J Pest Sci. 2017;90(1):407-19.
- [21] Fagodia SK, Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Citrus aurantii-folia* essential oil and its major constituents: Limonene and citral. Ind Crops Prod. 2017;108:708-15.
- [22] Tworokski T. Herbicide effects of essential oils. Weed Sci. 2002;50(4):425-31.
- [23] Hazrati H, Saharkhiz MJ, Niakousari M, Moein M. Natural herbicide activity of *Satureja hortensis* L. essential oil nanoemulsion on the seed germination and morphophysiological features of two important weed species. Ecotoxicol Environ Saf. 2017;142:423-30.
- [24] Azizi M, Fuji Y. Allelopathic effect of some medicinal plant substances on seed germination of *Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleraceae*. Acta Hort. 2006;699:61-7.
- [25] Kohli RK, Batish DR, Singh HP. Eucalypt oils for the control of *Parthenium* (*Parthenium hysterophorus* L.). Crop Prot. 1998;17(2):119-22.
- [26] Rassaeifar M, Hosseini N, Haji Hasani Asl N, Zandi P, Moradi Aghdam A. Allelopathic effect of *Eucalyptus globulus* essential oil on seed germination and seedling establishment of *Amaranthus blitoides* and *Cydon dactylon*. Trakia J Sci. 2013;11(1):73-81.



- [27] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 2007.
- [28] Blázquez MA, Carbó E. Control of *Portulaca oleracea* by boldo and lemon essential oils in different soils. *Ind Crops Prod*. 2015;76:515-21.
- [29] Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes Â *et al*. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chem Biodivers*. 2017;14(6):1-12.
- [30] Harkat-Madouri L, Asma B, Madani K, Bey-Ould Z, Rigou P, Grenier D *et al*. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Ind Crops Prod*. 2015;78:148-53.
- [31] Ghaffar A, Yameen M, Kiran S, Kamal S, Jalal F, Munir B *et al*. Chemical composition and *in-vitro* evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils extracted from seven *Eucalyptus* species. *Molecules*. 2015;20(11):20487-98.
- [32] Verdeguer M, Blázquez MA, Boira H. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochem Syst Ecol*. 2009;37(4):362-9.
- [33] Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*. 2010;17(13):1061-6.
- [34] Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(6):1219-25.
- [35] Simsek M, Duman R. Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate. *Pharmacognosy Res*. 2017;9(3):234-7.
- [36] Porres-Martínez M, González-Burgos E, Carretero ME, Pilar Gómez-Serranillos M. *In vitro* neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole against H_2O_2 -induced oxidative stress in PC12 cells. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2016;71(7-8):191-9.
- [37] Vishwakarma GS, Mittal S. Bioherbicidal potential of essential oil from leaves of *Eucalyptus tereticornis* against *Echinochloa crus - galli* L. *J Biopestic*. 2014;5(1):47-53.

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	37-56	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	-------	---	-------------------	----------------

Stability of Colloids in Negatively Co-operative Melittin–Phospholipid

Estabilidad de los coloides en la interacción negativa melitina-fosfolípido

Fecha de recepción y aceptación: 22 de septiembre de 2017 y 28 de diciembre de 2017

Francisco Torrens Zaragoza^{1*}

¹ Institut Universitari de Ciència Molecular. Universitat de València.

* Correspondencia: Universitat de València. Institut Universitari de Ciència Molecular. Edifici d'Instituts de Paterna, P. O. Box 22085. 46071 Valencia. Spain. *E-mail*: torrens@uv.es.



ABSTRACT

The adsorption of melittin on 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine membranes is analysed. Rising melittin concentration, a multilayer adsorption is observed and discussed in terms of either monomer or tetramer stacking to the surface. An electrostatic adsorption model is applied because of the cationic peptide. According to the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek theory, the energy well corresponding to melittin aggregation in membranes is rather broad and, practically, no barrier exists opposing the aggregation of melittin molecules. Such aggregation corresponds to a small energy variation relative to the thermal energy, which suggests that spontaneous thermal fluctuations can affect the aggregation state of melittin at the membrane–solution interface. The results of the work make evident the multilayer formation of melittin on phospholipid membranes. Melittin tetramers, which are formed in solution, bind directly to the phospholipid membrane, which results in multilayers on the surface. Adsorption is treated *via* Langmuir adsorption isotherm modified by electrostatic effects. The theoretical treatment is an elegant method because both Gouy–Chapman and Debye–Hückel formalisms apply Poisson–Boltzmann equation to calculate the potential.

KEYWORDS: *Peptide-lipid interaction, Thermodynamic treatment, Binding isotherm, Scatchard plot, Hill plot.*

RESUMEN

Se analiza la adsorción de melitina sobre membranas de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina. Elevando la concentración de melitina, se observa y discute una adsorción en multicapas en cuanto a apilamiento, bien de monómeros, bien de tetrámeros, hacia la superficie. Se aplica un modelo de adsorción electrostática por el péptido catiónico. De acuerdo con la teoría Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek, el pozo de energía que corresponde a la agregación de melitina en membranas es bastante ancho, y prácticamente no existe barrera que se oponga a la agregación de moléculas de melitina. Tal agregación corresponde a una pequeña variación de energía relativa a la energía térmica, que sugiere que espontáneas fluctuaciones térmicas pueden afectar al estado de agregación de la melitina en la interfase membrana-disolución. Los resultados del trabajo evidencian la formación de multicapas de melitina sobre membranas fosfolípicas. Tetrámeros de melitina, que se forman en disolución, enlazan directamente con la membrana

fosfolipídica, que resulta en multicapas sobre la superficie. La adsorción se trata *vía* la isoterma de adsorción de Langmuir, modificada por efectos electrostáticos. El tratamiento teórico es un elegante método porque los formalismos tanto de Gouy-Chapman como Debye-Hückel aplican la ecuación de Poisson-Boltzmann para calcular el potencial.

PALABRAS CLAVE: *Interacción péptido-lípido, tratamiento termodinámico, isoterma de enlace, Diagrama de Scatchard, Diagrama de Hill.*

INTRODUCTION

Studies on the interactions between membranes and peptides are central to the knowledge of the insertion process of membrane proteins, binding of hormones to membrane receptors, and action of *antimicrobial peptides* (AMPs) and toxins. The general principles of the mechanism of interaction of surface-active peptides with membranes are understood, but the details necessary for a quantitative structure–activity and thermodynamic frameworks remain elusive. Melittin is the main active component (52 % of venom peptides) of *apitoxin* (European honey bee *Apis mellifera* venom) and is a powerful stimulator of phospholipase A2 (PLA2). It is a linear, basic, amphiphilic, cytotoxic, cytolytic and haemolytic oligopeptide with 26 amino acids (AAs) and the sequence $\text{H}_3\text{N}^+\text{-GIGAVLKVLTGTGLPALISWIKRKRQQ-CONH}_2$ (molecular weight $M_w=2846\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Sequences of hydrophobic (1–20) and hydrophilic (21–26) AAs are unequally distributed. It presents strong amphipathic surface activity, and is known to adopt a number of conformations and aggregation states in different aqueous solutions. Its conformation is largely *random coil* (disordered) when present as free monomer in solution. Melittin binds to cell membranes, causing their lysis *via* not completely understood mechanisms. The aggregation state and orientation of its amphipathic α -helix with respect to the membrane remain controversial. It adopts an amphipathic α -helical conformation when bound to membranes and micelles, with a flexible hinge in Pro¹⁴ and unordered C-terminal at 22–26 AAs. The Pro¹⁴ plays a critical role in its antimicrobial activity and cytotoxicity. At high peptide concentration or ionic strength, it self-associates into a tetrameric structure. The relationship between the tetrameric self-assembly of melittin and its bioactivity was linked to the necessity to prevent its hydrophobic residues from being exposed to the sugar charges present in biomembranes. Although it presents mainly hydrophobic residues, it shows six positive charges. Its N-terminal part is hydrophobic while C-end moiety is hydrophilic and strongly basic.

In order to understand membrane-lysis mechanism induced by melittin, effectors microscopic localization in the membranes at physiological concentrations is needed. Melittin orientation with respect to the bilayer surface is parallel or perpendicular, depending on the used lipid and hydration extent. Its amphiphilic nature resembles membrane-bound peptides, apolipoproteins and putative transmembrane helices of membrane proteins, which resulted in melittin being used as a model of lipid–protein interactions, toxin-mediated membrane disruption and ion channel-forming proteins. Its characteristic effect on cell membranes is the ability to lyse natural and artificial ones. It disrupts gel-phase zwitterionic 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) membranes into small discoidal objects, with diameter of 200–400 Å and a thickness of a single bilayer. In flu-



id-phase POPC bilayers, it induces the formation of large unilamellar vesicles (LUVs) with diameter of 2000 Å. Because of its cationic charge, melittin binds distinctly more to anionic than zwitterionic bilayers. Studies on anions influence on melittin action were performed on binary bilayer systems of POPC and anionic lipids [e.g., 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylserine (PS), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG)], which present the inconvenience that it is difficult to distinguish if melittin interacts with the initially provided mixture or domains locally enriched in one compound. Is glutaminy-substrate melittin a model peptide substrate to explore membrane-phospholipids role on the enzymatic activity of tissue transglutaminase (tTGase)?

Work showed that bee venom presents multiple effects, probably as a result of its interaction with anionic phospholipids. Melittin increases the permeability of cell membranes to ions (e.g., Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), which effect causes morphological (e.g., swelling), and functional changes in cells and tissues. Melittin exhibits antimicrobial activity vs. *Borrelia burgdorferi*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, etc. Habermann reviewed bee and wasp venoms [1]. Properties of AMPs were reviewed [2–21]. A special issue of *Current Topics in Medicinal Chemistry* was edited on AMPs [22]. Differential AMPs interaction with lipid structures were studied by coarse-grained molecular dynamics simulations [23]. Analysis of antimicrobial activities in relation to amphipathicity and charge characterized antimicrobial peptides [24]. Work on AMP analogues from scorpion venom, antimicrobial activity and toxicity showed that α -helix interacted with biomembranes according to carpet, toroidal and barrel models, and aggregates formed with rising concentration.

In an earlier publication, it was informed the binding of vinyl polymers to anionic model membranes [25], the interaction of polyelectrolytes with oppositely charged micelles studied by fluorescence and liquid chromatography [26], the negatively co-operative binding of melittin to neutral phospholipid vesicles, the stability of pairs of colloidal particles [Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory] [27], the binding of water-soluble, globular proteins to anionic model membranes [28], the comparative analysis of the electrostatics of the binding of cationic proteins to vesicles, the asymmetric location of anionic phospholipids [29], the binding of mono, bi and tridomain proteins to zwitterionic and anionic vesicles, the asymmetric location of anionic phospholipids in mixed zwitterionic/anionic vesicles and the co-operative binding [30]. In *Nereis*, it was reported the polymer bisphenol-A (BPA), incorporation of silica (SiO_2) nanospheres (nanosilica, nano- SiO_2) into epoxy/amine materials, polymer nanocomposites (NCs) [31] and the calculation of restricted volume for nanoparticles that can point [32]. In the present report, the condition of DLVO stability for colloids is reviewed. The aim is to investigate if the peptide–phospholipid binding model is generally valid and determine what is the driving force for the interaction: the net surface charge density, lipid physical state or its inverse hexagonal phase (H_{II})-promoting character. The purpose is to examine the stability of thermosetting polymer/nanoclay dispersions. The main objective is to analyze the adsorption of melittin on zwitterionic lipid POPC membranes. Rising melittin concentration, a multilayer adsorption is observed and discussed in terms of monomer or tetramer stacking to the surface.



METHOD

Condition of Stability for Colloids (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek Theory)

Colloids

Colloids can be classified according to the nature [gas (G), liquid (L), solid (S)] of the dispersed phase (approximately spherical fragments of size varying in $10\text{--}10^4\text{\AA}$) and that of the dispersive milieu. Table 1 gives some examples of colloidal systems after this classification.

Table 1. Classification of colloidal systems and examples

Class	Dispersed phase	Dispersive milieu	Examples
1. Liquid aerosols	L ^a	G	Fogs
2. Solid aerosols	S ^b	G	Fumes
3. Foams	G ^c	L	Beer
4. Emulsions	L	L	Milk
5. Colloidal suspensions (<i>sols</i>)	S	L	Paints, blood
6. Solid foams	G	S	Pumice, bread
7. Solid emulsions (<i>gels</i>)	L	S	Pearls, opal
8. Solid suspensions	S	S	Smoky glasses

^a L: liquid.

^b S: solid.

^c G: gas.

The most important class, corresponding to Entry 5 (colloidal suspensions, *sols*), splits into two categories: (1) *hydrophilic (lyophilic) colloids* where properties (viscosity coefficient, surface tension) are different from the dispersive milieu (*sol* $\leftrightarrow$ *gel*, e.g., gelatine in H₂O); (2) *hydrophobic (lyophobic) colloids* where the properties look like the dispersive milieu; such colloids are pH-sensitive and present an instability (*flocculation*) for a pH higher than a critical value (e.g., colloidal Au). Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory is devoted to lyophobic-colloids stability [33,34].

Interaction between Two Charged Spheres

The problem of the repulsive force from electrostatic origin between two charged spheres is much more difficult to solve than that of the potential originated from one charged sphere. No simple expression of the corresponding potential exists but reasonable approximations are known for limit situations [35]; e.g., for two identical spheres of radius a in a milieu characterized by the Debye length $\lambda_D = 1/\kappa = (\epsilon kT/8\pi e^2 n^0)^{1/2}$ [where ϵ is the solvent permittivity (before the introduction of the ions), k ,



Boltzmann constant, T , the absolute temperature, e , the proton charge, and n^0 , the number of ions per unit volume in the absence of any charged surface], one obtains:

$$V_{el} = \frac{\varepsilon a \psi^2}{2} \exp(-\kappa s) \quad (1)$$

where s is the shortest distance between the surfaces of the spheres in presence ($s \ll a$), and ψ , a potential characterizing both the charge state of the spheres and the properties of the ions of the intermediate milieu.

Total Interaction between Two Charged Spheres in an Ionized Milieu

The van der Waals (VdW) energy (attractive for two spheres presenting the same chemical composition) is:

$$V(D) = -\frac{AR}{12D} \quad (2)$$

where R is the radius of both spheres, D , the minimum distance between both spherical surfaces, A , the Hamaker constant ($A = \pi^2 n^2 B$), n , the number of spheres per unit volume, B , the attractive interaction constant of London in r^{-6} between an atom of sphere 1 and an atom of sphere 2, and r , the interatomic distance. The total interaction energy between two charged spheres in an ionized milieu is obtained, in DLVO framework, joining Eqs. (2) and (1) corresponding, respectively, to VdW and electrostatic energy (repulsive for approaching distances lower than λ_D , practically null farther). Therefore,

$$V = -\frac{Aa}{12s} + \frac{\varepsilon a \psi^2}{2} \exp(-\kappa s) \quad (3)$$

This expression will be used to discuss the stability of a colloid suspension.

Stability of a Pair of Colloidal Particles

In a colloidal suspension of *lyophobic* type, system *flocculation* is expected when the attractive forces between two particles dominate over the repulsive ones. Potential function between two charged spheres given by Eq. (3) will be written:

$$V(s) = V_A(s) + V_R(s) \quad (4)$$

Notice after Eq. (3) that absolute V_R is small with respect to V_A as for both $s \sim 0$ and $s \rightarrow \infty$. However, both cases in Fig. 1 are possible.



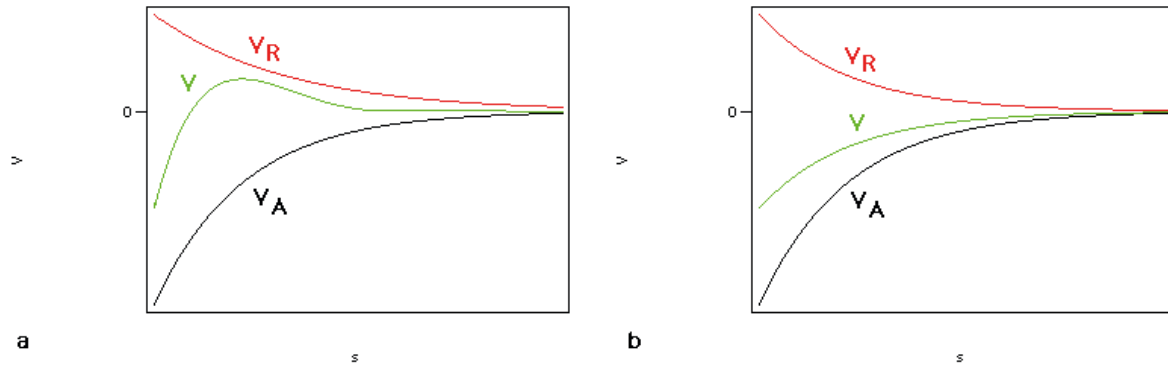


Fig. 1. Interaction potential vs. distance between particles: (a) domain of repulsive effects; (b) domain of attractive effects.

(1) In Fig. 1a, the repulsive effects are sufficiently intense in order that a maximum appear for $V(s)$, which corresponds to an activation energy needed for the two spheres to become in contact ($s = 0$). For a colloidal system, the figure corresponds to a possible *stability*. (2) However, in the case of Fig. 1b, V_R is too weak in order that the maximum would appear, and the figure corresponds to an immediate *flocculation* of the colloid. Figure 2 represents the net of curve $V = V(s)$ for different values of the inverse Debye length κ of the ionic milieu.

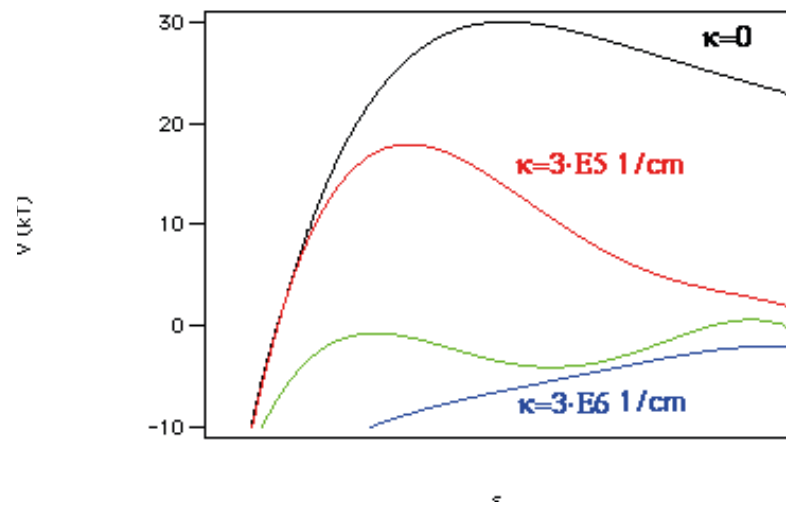


Fig. 2. Representation of the net of curve $V = V(s)$ for different values of the Debye length κ^{-1} of the ionic milieu.

One can go further searching for the condition by which curve $V = V(r)$ present a maximum and a minimum. Equation (3) can thus be rewritten, measuring s in λ_D units, *i.e.*, taking $s = \sigma/\kappa$:

$$V(\sigma) = -\frac{A\kappa a}{12\sigma} + \frac{\varepsilon a \psi^2}{2} \exp(-\sigma) \quad (5)$$

Nullifying the derivative of this expression:

$$\frac{dV}{d\sigma} = \frac{A\kappa a}{12\sigma^2} - \frac{\varepsilon a \psi^2}{2} \exp(-\sigma) = 0 \quad (6)$$

Thus:

$$\sigma^2 \exp(-\sigma) = \frac{A\kappa}{6\varepsilon\psi^2} \quad (7)$$

The $y(\sigma) = \sigma^2 \exp(-\sigma)$ function is represented in Fig. 3.

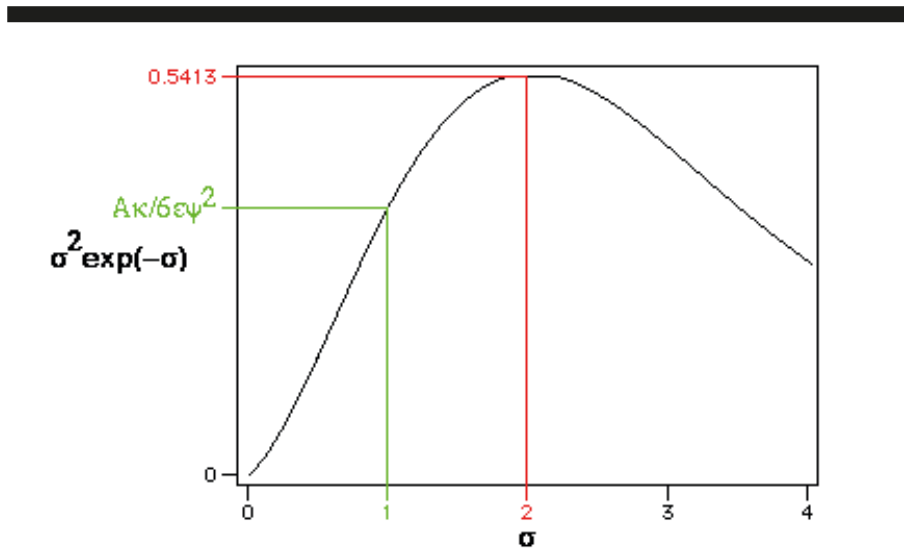


Fig. 3. Representation of the $y(\sigma) = \sigma^2 \exp(-\sigma)$ function vs. σ .

The figure above shows that if:

$$\frac{A\kappa}{6\varepsilon\psi^2} > \frac{4}{\exp(2)} \approx 0.5413 \quad (8)$$



then $V = V(r)$ curve presents no extreme. In this case, the attractive VdW force dominates, whichever s be, over the electrostatic repulsion and the colloid is *unstable*. Inequality (8) can also be written:

$$\psi^2 < \psi_{\text{crit}}^2 = \frac{A\kappa}{24\epsilon} \exp(2) \quad (9)$$

For a millimolar aqueous solution of monovalent ions, one has $\psi_{\text{crit}} = 19\text{mV}$. When $V = V(r)$ presents a maximum, *i.e.*, if $\psi > \psi_{\text{crit}}$, one can search for the value of V that correspond to the maximum. It matches to a value of σ_o of σ so that:

$$\exp(-\sigma_o) = \frac{A\kappa}{6\epsilon\psi^2\sigma_o^2} \quad (10)$$

From which:

$$V(\sigma_o) = -\frac{A\kappa a}{12\sigma_o} + \frac{\epsilon a \psi^2}{2} \exp(-\sigma_o) = -\frac{A\kappa a}{12\sigma_o} + \frac{A\kappa a}{12\sigma_o^2} = \frac{A\kappa a}{12\sigma_o} \left(\frac{1}{\sigma_o} - 1 \right) \quad (11)$$

Let us assume $\psi \gg \psi_{\text{crit}}$, then $\sigma_o^2 \exp(-\sigma_o) = A\kappa/(6\epsilon\psi^2) \ll 1$, and $\sigma_o \ll 1$. From which:

$$V(\sigma_o) \approx \frac{A\kappa a}{12\sigma_o^2} = \frac{\epsilon a \psi^2}{2} \quad (12)$$

For instance, if $a = 0.5\mu\text{m}$, $\epsilon_w = 80$ (aqueous solution, $\epsilon = \epsilon_w \epsilon_o = 7 \times 10^{-10} \text{C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), $\psi = 100\text{mV}$, then $V(\sigma_o) = 2.2 \cdot 10^{-17} \text{J}$. At room temperature (RT) one obtains:

$$\frac{V(\sigma_o)}{kT} \approx 5000$$

In the conditions above, the activation energy is 5000 times higher than the average thermal agitation energy. One can then consider that one collision out of $\exp(5000) \approx 10^{2000}$ will cause the co-alescence of the two concerned colloidal particles. The suspension could then be considered stable (*flocculation* of the colloid cannot occur).

Stability of Thermosetting Polymer/Nanoclay Dispersions

The term *stability* presents two meanings in the context of colloidal dispersions. In practice, it is used to show that there is no phase separation during a period. If the particles in a dispersion show a trend to sediment during an episode of storage, the dispersion is unstable. However, in another context, the word *stability* is utilized when the particles do not show a tendency to aggregate. The key to understand the expression *colloidal stability* is in the pair of potentials existing between two parti-



cles. The colloidal particles are subjected to attraction and repulsion forces, and an equilibrium exists between such forces. Brownian motion produces collision between the particles and, if the attraction forces dominate, the particles agglomerate after the impact. On the contrary, if the repulsion forces prevail, the particles remain separate after the collision. The attraction forces are those of VdW, while the repulsion forces come from the interaction between the electric double layers that enclose the particles. Variations of milieu ionic strength or pH modify electrostatic forces, which allows controlling co-agulation processes. Theory of DLVO developed the research, which gives total potential V_T as:

$$V_T = V_A + V_R \quad (13)$$

where V_T is total potential between two particles as the addition of attraction V_A and repulsion V_R potentials. The curve that represents the total energy of interaction between colloidal particles (V_T) is the adding of attraction (V_A) and repulsion (V_R) curves. It corresponds to an exponential equation, because repulsion force is inversely proportional to the square of distance, and the attraction force is also a function of the inverse of distance but this raised to an exponent always greater than two. When the attraction by VdW forces is greater than the electrostatic repulsion, one is in the primary minimum potential (*cf.* Fig. 4), which indicates the aggregation state of the particles with the condition of minimum energy. The state of primary maximum represents the activation energy necessary to reach the aggregation state. Movement of the particles is governed by the thermal energy and, naturally, one can describe the energy distribution after Boltzmann equation. One can predict the kinetic stability as aggregation rate, being proportional to: $\exp(-V_T/k_B T)$. When $V_T \gg k_B T$, the particles will be in a *stable* colloidal state. If the attraction energy is slightly greater than the thermal energy average, the aggregation states will be reversible (secondary minimum state). If a strong attraction exists between the particles, one has $-V_T \gg k_B T$, and get a strong aggregation or *co-agulation* of the particles, resulting the process irreversible (primary minimum state).

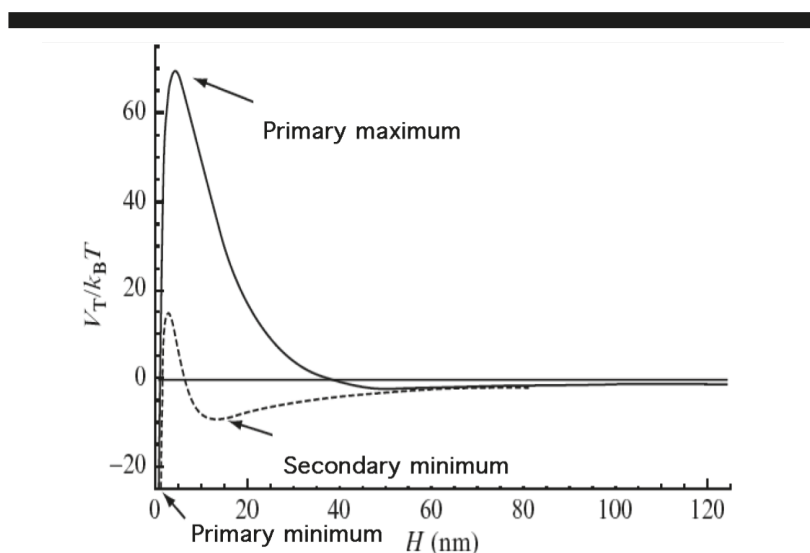


Fig. 4. Interaction potential vs. distance between the particles.

On rising particle concentration in the milieu, the aggregates grow in size, adopting a fractal-type structure. Russel *et al.* described the phenomenon [36]. The aggregates grow and occupy the whole available space. In this point, the *percolation threshold* is reached. When rising particle concentration, the aggregates grow forming clusters that, in turn, interact with one another producing a continuous structure crosslinked (*net*) in three dimensions (3D). From this point, on rising particle concentration, dense structures are formed, which are more difficult to describe from an only parameter, *e.g.*, fractal dimension. *Gelification* corresponds, at the molecular level, to the incipient formation of branched and reticulated molecules of a molecular weight that tends to infinite, insoluble and infusible. When *gelification* occurs, the system passes from liquid to a covalently interwoven *gel*. The phenomenon is associated with a sharp rise in the viscosity coefficient. From the theoretical viewpoint, the *gel* point was described *via* predictions of the classical polymerization theory developed by Flory [37] to modern fractal geometry [38] and percolation theory [39]. The theories contributed different explanations for the critical transition. Flory theory is incomplete because it does not consider the formation of rings, which implies that the mass of the fractal set rises with the fourth power of size, which is not realistic. Percolation theory allows the formation of rings, or closed cycles, so that it does not predict a divergent density for the fractal set. The validity of percolation theory lies in its ability to predict the behaviour of certain physical properties near the *gel* point [storage (elastic) modulus, viscosity coefficient, cluster average size and size distribution, *gel* volume fraction, etc.] *via* scaling laws governed by critical exponents. Fractal geometry is based on a structure invariant to scale (a part is structurally identical to the total) and shows a decay in density with the rise in aggregates size. Fractal objects are characterized by their fractal dimension D , which is defined from the fractal mass and surface by the following relationships:

$$M \sim R^{D_m} \quad S \sim R^{D_s} \quad (14)$$

where M and S are the object mass and surface, and R , its average size. Fractal mass and surface can never be in the same length scale. Index D_m takes values in 1–3. The values result from $D_m = 1$ –1.5, which corresponds to a long linear polymer, passing by $D_m = 1.5$ –2.25 for branched and dendritic polymers to dense aggregates with $D_m \sim 3$. On the other hand, the values of D_s rise from $D_s \sim 2$ for a smooth surface to $D_s \sim 3$ for a wrinkled surface. Shih *et al.* theory (1990) explained the formation of a continuous colloidal structure, crosslinked by interaction between the fractal flocs, distinguishing between two regimes according to colloidal-*gel* concentration [40,41]. It is important to determine the dependence of the storage shear modulus G' on clay volume fraction ϕ , in order to understand the mechanism controlling *net*-structure formation. Depending on the strength of the links between the flocs in comparison to that of the flocs, two regimes occur.

(1) *Strong-link* regime, where:

$$G' \sim \phi^{(d+x)/(d-D)} \quad (15)$$



where d is the Euclidean dimension, D , fractal dimension of the flocs, and x , backbone fractal dimension (chemical length exponent, tortuosity) of the flocs ($1 \leq x < D$). The *limit of linearity (critical strain)*:

$$\gamma_c \sim \phi^{-(1+x)/(d-D)} \quad (16)$$

(2) *Weak-link* regime, where:

$$G \sim \phi^{(d-2)/(d-D)} \quad (17)$$

and

$$\gamma_c \sim \phi^{1/(d-D)} \quad (18)$$

In the strong-link regime, the interaction force between the flocs overcomes the interaction forces from inside the same floc while, in the weak-link regime, the interaction force between the particles from inside the same floc overwhelms the forces between the flocs. The main differences between the two regimes are: (1) G' rises more slowly in the weak- than in the strong-link regime; (2) the limit of linearity γ_c rises with increasing particle concentration in the weak-link regime but decays with rising particle concentration in the strong-link regime. Extensions to the DLVO theory were informed. Bocquet *et al.* reported effective charge saturation in colloidal suspensions [42]. Chapot *et al.* published interaction between charged anisotropic macromolecules and applied it to rod-like polyelectrolytes [43].

RESULTS

The use of the partition equilibrium model, in combination with Gouy–Chapman formalism, provided an expression to generate theoretical association isotherms that depended on two adjustable parameters: (1) the theoretical partition coefficient Γ , calculated from the initial slope of the experimental curves; (2) the peptide effective interfacial charge v . The experimental binding isotherms were fitted *via* Γ and v parameters. The theoretical isotherms looked qualitatively similar to those obtained *via* the thermodynamic approach. Values of Γ theoretically calculated for melittin were of the same order of magnitude than those derived from the fitting analysis, which means that for every binding isotherm, the evaluated actual peptide charge in solution z_p^+ originated a theoretical Γ value similar to that obtained from the initial slope. However, with the present thermodynamic treatment, the determination of Γ and v parameters was made separately, without any extrapolation from the experimental isotherm. Data on multilayer formation of melittin on solid-supported POPC membranes (*cf.* Table 2) show a small calculated surface charge density σ in the range $0\text{--}12\text{mC}\cdot\text{m}^{-2}$, too small to avoid co-alescence [44]. Surface potential ψ_0 calculated *via* Gouy–Chapman theory lies in the range $0\text{--}16\text{mV}$. As a first approximation, a value of ionic strength (I)-corrected water permittivity $\epsilon_w = 77.3062 - 13.1601I = 76.8$ and α -helix conformation for the peptide (disc surface charge distribution,



$a = R_p = 7\text{Å}$ [45]) were used. It was shown by spectroscopy that in the presence of membrane-mimetic solvents and/or surfactants, melittin formed a partial α -helix [46–48]. The DLVO analysis allows calculating an activation energy for co-alescence in the range of $0\text{--}38\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ or $0\text{--}0.02$ units of kT at room temperature ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$), which indicates that one collision of $1\text{--}1.02$ will cause the co-alescence of adsorbed melittin molecules, which is in agreement with the fact that melittin aggregates in membranes predominantly in the form of tetramers. This supports the scenario of multilayer formation in which melittin tetramers, which are formed in solution, bind directly to the phospholipid membrane, which turns out to be in multilayers (double layers) on the surface, which is in contrast to observations with DOPC vesicles [49], confirming the importance of the experimental conditions [concentration of melittin, pH , temperature, ionic strength (salt concentration), etc.].

Table 2. Melittin–POPC binding (temperature $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, ionic strength $I = 0.04\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $pH\ 7.2$)

c_p^{Aa} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	α/R_t^b ($\text{mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$)	σ^c ($\text{mC}\cdot\text{m}^{-2}$)	ψ_o^d (mV)	c_p^{oc} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	K_p^f ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)	I/z^g ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)	I/kT^h	$\text{Exp}(I/kT)^i$
0.00	0.00	—	—	—	—	—	—	—
1.60	4.40	2.25	3.4	1.2	3670	2	0.0007	1.0007
2.2	3.60	1.8	2.8	1.7	2080	1	0.0005	1.0005
3.8	5.54	2.8	4.2	2.7	2090	3	0.001	1.001
6.2	7.54	3.8	5.7	3.8	1980	5	0.002	1.002
7.3	8.18	4.1	6.1	4.3	1900	5	0.002	1.002
8.4	9.78	4.9	7.2	4.5	2170	7	0.003	1.003
11.2	12.08	6.1	8.8	5.3	2290	11	0.004	1.004
20.5	16.4	8.1	11.5	7.6	2150	19	0.008	1.008
26.8	18.9	9.3	13.0	8.8	2150	24	0.01	1.01
40.2	23.2	11.3	15.4	10.7	2170	34	0.01	1.01
66.9	24.8	11.9	16.2	16.6	1490	38	0.02	1.02

^a Equilibrium melittin concentration in the bulk solution.

^b Moles of bound melittin per mole of POPC.

^c Surface charge density calculated according to Seelig, Allegrini and Seelig with $A_L = 68\text{Å}^2$, $A_p = 200\text{Å}^2$, and $z_p^+ = 2.2$ e.u.

^d Surface potential calculated by means of Gouy–Chapman theory.

^e Concentration of melittin at the binding plane calculated with $z_p^+ = 2.2$ e.u.

^f Partition coefficient.

^g Activation energy calculated with ionic strength-corrected water permittivity $\epsilon_w = 76.8$ and $a = 7\text{Å}$.

^h Activation energy in kT units, where k is Boltzmann constant.

ⁱ Number of collisions necessary for achieving one effective collision.

DISCUSSION

The adsorption of melittin on phospholipid vesicles is treated *via* Langmuir adsorption isotherm modified with electrostatic effects [50]. The theoretical approach is an elegant treatment, because the



two Gouy–Chapman and Debye–Hückel formalisms applied the same Poisson–Boltzmann equation to calculate either potential [51]. On comparing the adsorption of cationic melittin on zwitterionic and anionic phospholip vesicles, the latter is more complex because of its greater cover of the surface, which allows raising three questions: (1) Does the phospholipid surface continue to be anionic after a great cover by the cationic peptide? (2) What is the actual charge of the anionic surface after the adsorption of the cationic peptide? (3) Is Langmuir-modified adsorption isotherm still valid? The theoretical association isotherms, generated from the values of the actual peptide charge in solution z_p^+ , described satisfactorily the experimental data at lower ionic strength, and a number of parameters, included in the equation, were varied in order to better reproduce the experimental binding curves obtained at higher ionic strengths. The partition coefficient theoretically derived for melittin was similar to that deduced according to more classical binding analyses. The formalism allowed determining the values of the molar free energies for melittin in aqueous and lipid phases. Such an understanding of the thermodynamic parameters provided interesting information about the energetic of the peptide–lipid interactions. In the following, I shall provide a tentative model for the topology of melittin in two possible scenarios of multilayer formation on POPC membranes. A thermodynamic approach was proposed to analyse quantitatively the binding isotherms of peptides to model membranes *vs.* one adjustable parameter: z_p^+ . The main features of the treatment were: (1) a theoretical expression for the partition coefficient calculated from the molar free energies of the peptide in both aqueous and lipid phases; (2) an equation proposed by Stankowski to evaluate the activity coefficient of the peptide in the lipid phase; (3) Debye–Hückel equation that quantifies the activity coefficient of the peptide in the aqueous phase [52]. In order to assess the validity of the method, the interaction of basic amphipathic peptides was studied *via* steady-state fluorescence spectroscopy, which provides: (1) intensity (related to the abundance of the melittin–peptide complex); (2) blueshift (penetration of the hydrophobic part of melittin in the bilayer). The obtained z_p^+ charges were always found to be lower than the electrostatic charge expected from the number of ionizable groups in the cationic peptide ($q = 6$ e.u.) [53]. The z_p^+ charges were rationalized, considering that the peptide charged groups were strongly associated with the counterions in the buffer solution at a given ionic strength [54]. The partition coefficients theoretically derived *via* z_p^+ charges were in agreement with those deduced from Gouy–Chapman formalism [55]. From z_p^+ charges, the molar free energies for both free and lipid-bound states of the peptides were calculated.

The experimental activity coefficient was explained taking into account the electrostatic effects and v charge, and the experimental binding isotherms were fitted *via* Γ and v parameters [56]. However, determined v charges were also smaller than the electrostatic charge of the cationic peptide, which observation was understood when it was considered that the actual z_p^+ charge of the cationic polypeptide should decay, because of the screening effect of the counterions in the electrolyte solution, which provided a given ionic strength [57]. In order to explain the charge difference, theoretical treatments were reported, but the thermodynamic parameters involved in the peptide–surface interactions were not well defined for electrolytes greater than 1:1 [58]. A thermodynamic approach was proposed for the quantitative analysis of the peptide/lipid-surface binding isotherms. The treatment was based on the partition equilibrium model and introduced: (1) the theoretical expressions for the quantitative calculation of the molar free energies of the peptide in both aqueous and lipid phases, which allowed the evaluation of the partition coefficient; (2) the calculation of the activity coefficient



via concepts from the virial approach and Debye–Hückel theory, with both disc and hemispheric surface charge distributions considered for the peptide/vesicle contact. All the proposed expressions were based on the knowledge of the actual peptide charge in solution z_p^+ , which was different from the electrostatic charge of the cationic peptide. Once z_p^+ charge was known, v charges were derived *via* Gouy–Chapman theory. With the present thermodynamic treatment, the determination of theoretical partition coefficient Γ and v charge parameters was made separately, without any extrapolation from the experimental binding isotherm, which observation was understood when it was considered a disc surface charge distribution for the melittin/vesicle contact.

Some amount of high-molecular mass complexes of melittin with mainly anionic phospholipids existed. The interaction between cationic melittin and POPC vesicles/membranes presented four phases. (1) The initial interaction between melittin and vesicles/cells was merely electrostatic *via* the basic C-terminus, but melittin was not fully stabilized at the vesicle/membrane plane and remained in a low α -helical conformation. (2) The next step after the electrostatic interaction was a melittin stabilization in the vesicle/membrane. Conformational changes were induced to yield a peptide–lipid complex showing the lowest possible energy state. (3) The insertion of melittin in the vesicle/bilayer induced a re-organization of the vesicle/membrane components, which facilitated the cytoplasm release and concomitant cell collapse. (4) After the lysis was completed, melittin was complexed with mainly anionic phospholipids. The agreement between the results, obtained with wasp venom peptide toxin mastoparan, and experimental results gotten for melittin and neuropeptide substance *P*, supported that quantitative studies of the binding of amphipathic peptides to zwitterionic and anionic phospholipid membranes were achieved, *via* the thermodynamic approach, especially at lower ionic strength. However, at higher salt concentration, the thermodynamic treatment did not completely predict the shape of the curves at high surface cover, which was attributed to the fact that an average z_p^+ charge was assumed in all cases in the calculations, as representative of the whole adsorption isotherm. At lower ionic strength, z_p^+ charges in every point of the adsorption isotherm were similar and an average $\langle z_p^+ \rangle$ charge were adequate. Notwithstanding, at higher salt concentration, z_p^+ charges calculated for every experimental datum in the corresponding adsorption isotherm varied slightly, and the average z_p^+ charge was considered as a less representative parameter of the whole adsorption isotherm, which could be corrected introducing, in the theoretical expression of the molar free energies of the peptide in both aqueous and lipid phases, additional terms accounting for the interaction between the free peptide and the counterions present in the solution.

Figure 5 shows the schematic representation of two possible scenarios of multilayer formation. The *cylinders* represent the melittin molecules. In Figure 5a, melittin tetramers, which were formed in solution, bound directly to the phospholipid membrane, which resulted in multilayers (double layers) on the surface. In Figure 5b, although at higher melittin concentrations tetramers existed in solution, only monomers bound to the surface, forming multilayers. Data on multilayer formation of melittin on solid-supported POPC membranes, especially the small calculated surface charge density σ in the range 0–12 mC·m⁻², was too small to avoid co-alescence, in agreement with the evidence for multilayer formation of melittin on solid-supported phospholipid membranes by shear-wave resonator measurements.



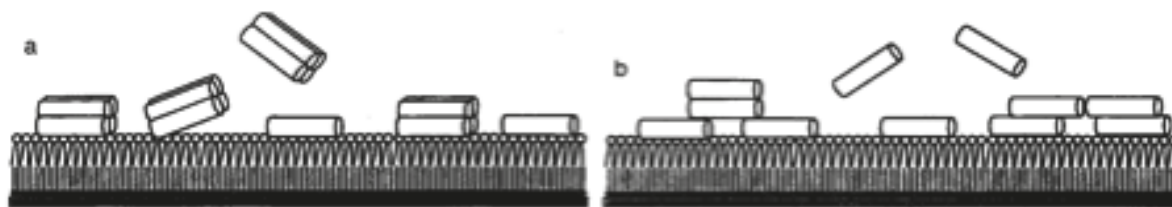


Fig. 5. Two scenarios of multilayer formation: (a) tetramers; (b) monomers. *Cylinder*: melittin. Modified from Ref. [44].

The local microenvironment composition of the lipid bilayer played a role as a regulator of the cross-linking activity of melittin and other toxins. In anionic phospholipid bilayers, its physical state *gel* or *liquid crystal* had no effect on melittin binding, contrary to neutral lipids, which showed that electrostatic forces played a role in the formation of the complex, and ruled out a penetration of the hydrophobic part of the peptide in the bilayer. The conclusion is supported by the fact that the stoichiometry of complexes was related to the surface charge density of the bilayer, as shown by *pH* effects on dimyristoylphosphatidic acid. The physical state of the bilayer and hydrophobic force played a role in the interaction with the toxins. However, at variance to neutral membranes, the driving force was modulated by electrostatic interactions, which controlled the phase formation below or above the temperature of gel-to-fluid transition. In addition to the interest in cell membranes and phospholipid bilayers, motivation exists for the design of supported membrane biosensors for medical and pharmaceutical applications. Assuming a certain structure for colloidal gels, a simple but systematic scaling theory was derived for storage modulus and limit of linearity of colloidal gels that were above the *gelation* threshold. The scaling of the elastic properties of colloidal gels resulted dominated by the fractal nature of the flocs and different from the scaling near the gelation threshold, where a percolation-type scaling applied. The exponents for storage modulus and limit of linearity were expressed in terms of flocs and backbone fractal dimensions. Flocs fractal dimension resulted that of the colloidal aggregates. Two types of scaling behaviour existed: strong- and weak-link regimes. The scaling of the storage modulus and limit of linearity depended on whether the interfloc links were stronger than the flocs. The linear region shrunk with the rising concentration in the strong-link regime but rose with the rising concentration in the weak-link scheme. The theory enabled extracting, from the rheological measurements, structural information about the individual flocs. The fractal dimension of the microstructural net of a fat crystal net is an indicator of the storage modulus of the net and hardness of the fat crystal net. The fractal and fractal backbone dimensions were calculated from polarized light microscope images of the net. The AMPs showed *in vitro* activity *vs.* micro-organisms resistant to conventional antibiotics. Their most common mode of action was the disruption of cell membranes leading to microbial lysis, which presented lesser risk of acquired resistance or cross-resistance with other agents than other modes, which made it an attractive template for the design of antimicrobials for specific applications. The outmost leaflets of the bilayer, which is exposed to the outside of the anionic bacterial membranes, are more attractive to the attack of cationic AMPs. The interaction is

mainly electrostatic actions, which are the major driving forces for cellular association. A need exists for modernizing the statistical methods used in research. Statistical modelling is improving. One cannot be an expert in everything; however, one can be encircled by experts. Is statistics a noble branch of esoteric sciences or an instrument to clarify a phenomenon existing behind data? Is the statistician a being nonplussed to a computer or an active collaborator integrated into a research team? New statistical methods allow to get more robustness in the conclusions and extract more information from the data.

CONCLUSION

From the previous results and discussion, the following conclusions can be drawn.

1. According to the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek model, the energy well corresponding to melittin aggregation in membranes was rather broad and, practically, no barrier exists opposing the aggregation of melittin molecules. Such aggregation corresponds to a small energy variation relative to thermal energy, which suggested that spontaneous thermal fluctuations affected melittin aggregation state at membrane/solution interface. The adsorption was treated *via* Langmuir adsorption isotherm modified with electrostatic effects. The theoretical treatment was an elegant method, because the two Gouy–Chapman and Debye–Hückel formalisms applied the same Poisson–Boltzmann equation to calculate either potential.

2. The results made evident the formation of the melittin multilayer on the phospholipid membranes. Melittin tetramers, which were formed in solution, bound directly to the phospholipid membrane, which resulted in multilayers on the surface. Work is in progress on testing the utility of steady-state spectrofluorimetry, Förster resonance energy transfer, fluorescence anisotropy and polarization, total internal reflection fluorescence, circular dichroism, circular-dichroic stopped-flow, polarimetry, Raman spectroscopy, polarized and attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, infrared dichroism, sum frequency generation vibrational spectroscopy, ^{31}P , ^{13}C , ^1H , ^2H , spin label, solid-state, nuclear-Overhauser, photochemically induced dynamic-nuclear-polarization and heteronuclear single-quantum coherence nuclear magnetic resonance, electron spin-echo envelope modulation and resonance spectroscopy, quasi-elastic light scattering, thin-layer, reverse-phase and size-exclusion high-performance liquid chromatography, X-ray diffractometry, X-rays and neutron off-plane scattering, electron and confocal microscopy, high-sensitivity differential scanning calorimetry, temperature scanning densitometry, conductance, viscometry, ultracentrifugation, quartz crystal microbalance, lateral diffusion measurements, imaging ellipsometry, reflection interference contrast microscopy, enzymatic cleavage experiments, cytolytic and haemolytic activity assays, assay of antibacterial activity of the peptides, fractal dimension analysis, molecular dynamics simulations, molecular modelling and computer analysis to confirm the present outcomes.

3. Further work will give a better quantitative description of the association isotherms at higher ionic strength and improve the approach in anionic lipid membranes. Although melittin enlightened its behaviour in the presence of natural membranes, it still remains to settle more definitively the parallelism between its perturbation induced on lipids and cell membranes. What is the detailed structure



of the detected *soluble* complexes? To which extent are they involved in the mechanism of action of cytolytic toxins?

ACKNOWLEDGEMENT

The author wants to dedicate this manuscript to Prof. Dr. Agustín Campos, who was greatly interested in this research and would have loved to see its conclusion. He acknowledges financial support from Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (Project No. UCV.PRO.17-18.AIV.03).

LITERATURE CITED

- [1] Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972;177:314-22.
- [2] Nicolas P, Mor A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;49:277-304.
- [3] Kourie JJ, Shorthouse AA. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000;278:C1063-87.
- [4] Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3:238-50.
- [5] Sundriyal S, Sharma RK, Jain R, Bharatam PV. Minimum requirements of hydrophobic and hydrophilic features in cationic peptide antibiotics (CPAs): Pharmacophore generation and validation with cationic steroid antibiotics (CSAs). *J. Mol. Model.* 2008;14:265-78.
- [6] Zhou X, Li Z, Dai Z, Zou X. QSAR modeling of peptide biological activity by coupling support vector machine with particle swarm optimization algorithm and genetic algorithm. *J. Mol. Graphics Model.* 2010;29:188-96.
- [7] Eckert R Road to clinical efficacy: Challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Fut. Microbiol.* 2011;6:635-51.
- [8] Fjell CD, Jenssen H, Cheung WA, Hancock REW, Cherkasov A. Optimization of antibacterial peptides by genetic algorithms and cheminformatics. *Chem. Biol. Drug Des.* 2011;77:48-56.
- [9] Kosciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzalkowska N, Jóźwik A, Horbanczuk J, Krzyzewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. Cathelicidins: Family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39:10957-70.
- [10] Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Vitiello M, Morelli G, Galdiero M. Peptide–lipid interactions: Experiments and applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:18758-89.
- [11] Forbes S, McBain AJ, Felton-Smith S, Jowitt TA, Birchenough HL, Dobson CB. Comparative surface antimicrobial properties of synthetic biocides and novel human apolipoprotein E derived antimicrobial peptides. *Biomaterials* 2013;34:5453-64.
- [12] Gomes-Neto F, Valente AP, Almeida FCL. Modeling the interaction of dodecylphosphocholine micelles with the anticoccidial peptide PW2 guided by NMR data. *Molecules* 2013;18:10056-80.



- [13] Imran S. Studies on the antibacterial peptide isolated from *Murrya konigii* leaves. Res. J. Biotechnol. 2013;8(12):49-53.
- [14] Ryu S, Song PI, Seo CH, Cheong H, Park Y. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: Immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. Int. J. Mol. Sci. 2014;15:8753-72.
- [15] Vale N, Aguiar L, Gomes P. Antimicrobial peptides: A new class of antimalarial drugs? Front. Pharmacol. 2014;5:275-1-13.
- [16] Tan J, Huang J, Huang Y, Chen Y. Effects of single amino acid substitution on the biophysical properties and biological activities of an amphipathic ahelical antibacterial peptide against Gram-negative bacteria. Molecules 2014;19:10803-17.
- [17] Dziuba B, Dziuba M. New milk protein-derived peptides with potential antimicrobial activity: An approach based on bioinformatic studies. Int. J. Mol. Sci. 2014;15:14531-45.
- [18] Chifiriuc MC, Grumezescu AM, Lazar V, Bolocan A, Triaridis S, Grigore R, Bartesteanu S. Contribution of antimicrobial peptides to the development of new and efficient antimicrobial strategies. Curr. Proteom. 2014;11:98-107.
- [19] Duncan V, Fraser-Pitt D, Mercer D. First class. Eur. Biopharm. Rev. 2014;2014(66):56-9.
- [20] Lee G, Bae H. Antiinflammatory applications of melittin, a major component of bee venom: Detailed mechanism of action and adverse effects. Molecules 2016;21:616-1-10.
- [21] Primon-Barros M, Macedo AJ. Animal venom peptides: Potential for new antimicrobial agents. Curr. Top. Med. Chem. 2017;17:1119-56.
- [22] Dawgul M. Antimicrobial peptides. Curr. Top. Med. Chem. 2017;17:507.
- [23] Balatti GE, Ambroggio EE, Fidelio GD, Martini MF, Pickholz M. Differential interaction of antimicrobial peptides with lipid structures studied by coarse-grained molecular dynamics simulations. Molecules 2017;22:1775-1-17.
- [24] Wang CK, Shih LY, Chang KY. Large-scale analysis of antimicrobial activities in relation to amphipathicity and charge reveals novel characterization of antimicrobial peptides. Molecules 2017;22:2037-1-8.
- [25] Torrens F, Campos A, Abad C. Binding of vinyl polymers to anionic model membranes. Cell. Mol. Biol. 2003;49:991-8.
- [26] Torrens F, Abad C, Codoñer A, García-Lopera R, Campos A. Interaction of polyelectrolytes with oppositely charged micelles studied by fluorescence and liquid chromatography. Eur. Polym. J. 2005;41:1439-52.
- [27] Torrens F, Castellano G, Campos A, Abad C. Negatively cooperative binding of melittin to neutral phospholipid vesicles. J. Mol. Struct. 2007;834-6:216-28.
- [28] Torrens F, Castellano G, Campos A, Abad C. Binding of water-soluble, globular proteins to anionic model membranes. J. Mol. Struct. 2009;924-6:274-84.
- [29] Torrens F, Castellano G. Comparative analysis of the electrostatics of the binding of cationic proteins to vesicles: Asymmetric location of anionic phospholipids, Anal. Chim. Acta 2009;654:2-10.
- [30] Torrens F, Castellano G. Binding of mono, bi and tridomain proteins to zwitterionic and anionic vesicles: Asymmetric location of anionic phospholipids in mixed zwitterionic/anionic vesicles and cooperative binding. J. Life Sci. 2011;5:167-81.



- [31] Torrens-Zaragozá F. Polymer bisphenol-A, the incorporation of silica nanospheres into epoxy-amine materials and polymer nanocomposites. *Nereis* 2011;2011(3):17-23.
- [32] Torrens-Zaragozá F. Calculation of restricted volume for nanoparticles that can point. *Nereis* 2017;2017(9):25-38.
- [33] Derjaguin B, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim. U. R. S. S.* 1941;14:633-62.
- [34] Verwey EJW, Overbeek JTG. Theory of the stability of lyophobic colloids: The interaction of sol particles having an electric double layer. Amsterdam: Elsevier; 1948.
- [35] Overbeek JTG. Recent developments in the understanding of colloid stability. *J. Colloid Interface Sci.* 1977;58:408-22.
- [36] Russel WB, Saville DA, Schowalter W. Colloidal dispersions. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1989.
- [37] Flory PJ. Principles of polymer chemistry. Ithaca (NY): Cornell University; 1953.
- [38] Mandelbrot BB. The fractal geometry of nature. New York: Freeman; 1983.
- [39] Stauffer D, Aharony A. Introduction to percolation theory. London: Taylor & Francis; 1991.
- [40] Shih WH, Shih WY, Kim SI, Liu J, Aksay IA. Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. *Phys. Rev. A* 1990;42:4772-9.
- [41] Narine SS, Marangoni AG. Fractal nature of fat crystal networks, *Phys. Rev. E* 1999;59:1908-20.
- [42] Bocquet L, Trizac E, Aubouy M. Effective charge saturation in colloidal suspensions, *J. Chem. Phys* 2002;117:8138-52.
- [43] Chapot D, Bocquet L, Trizac E. Interaction between charged anisotropic macromolecules: Application to rod-like polyelectrolytes. *J. Chem. Phys.* 2004;120:3969-82.
- [44] Steinem C, Janshoff A, Galla HJ. Evidence for multilayer formation of melittin on solid-supported phospholipid membranes by shear-wave resonator measurements. *Chem. Phys. Lipids* 1998;95:95-104.
- [45] Beschiaschvili G, Seelig J. Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* 1990;29:52-8.
- [46] Vogel H. Incorporation of melittin into phosphatidylcholine bilayers: Study of binding and conformational changes. *FEBS Lett.* 1981;134:37-42.
- [47] Vogel H, Jähnig F. The structure of melittin in membranes. *Biophys. J.* 1986;50:573-82.
- [48] Vogel H. Comparison of the conformation and orientation of alamethicin and melittin in lipid membranes, *Biochemistry* 1987;26:4562-72.
- [49] Schwarz G, Beschiaschvili G. Thermodynamic and kinetic studies on the association of melittin with a phospholipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1989;979:82-90.
- [50] Adamson AW, Gast AP. Physical chemistry of surfaces. New York: Wiley; 1997.
- [51] Seydel JK, Wiese M. Drug-membrane interactions: Analysis, drug distribution, modeling. *Methods and principles in medicinal chemistry* No. 18. Weinheim, Ger.: Wiley-VCH; 2002.
- [52] Stankowski S. Surface charging by large multivalent molecules. Extending the standard Gouy-Chapman treatment. *Biophys. J.* 1991;60:341-51.



- [53] Pérez-Payá E, Thiaudière E, Abad C, Dufourcq J. Selective labelling of melittin with a fluorescent dansylcadaverine probe using guinea-pig liver transglutaminase. *FEBS* 1991;278:51-4.
- [54] Pérez-Payá E, Braco L, Abad C, Dufourcq J. High-performance liquid chromatographic separation of modified and native melittin following transglutaminase-mediated derivatization with a dansyl fluorescent probe. *J. Chromatogr., A* 1991;548:351-9.
- [55] Pérez-Payá E, Porcar I, Gómez CM, Pedrós J, Campos A, Abad C. Binding of basic amphipathic peptides to neutral phospholipid membranes: A thermodynamic study applied to dansyl-labeled melittin and substance P analogues. *Biopolymers* 1997;42:169-81.
- [56] Pérez-Payá E, Dufourcq J, Braco L, Abad C. Structural characterisation of the natural membrane-bound state of melittin: A fluorescent study of a dansylated analogue. *Biochim. Biophys. Acta* 1997;1329:223-36.
- [57] Pott T, Maillet JC, Abad C, Campos A, Dufourcq J, Dufourc EJ. The lipid charge density at the bilayer surface modulates the effects of melittin on membranes. *Chem. Phys. Lipids* 2001;109:209-23.
- [58] Pérez-Payá E, Ferrándiz C, Abad C. The amphipathic peptide melittin as a tool to study the membrane-dependent activation of tissue transglutaminase. *Lett. Peptide Sci.* 2002;8:69-76.

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	57-68	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	-------	---	-------------------	----------------

One-dimensional mesh generation for critical points in an interval

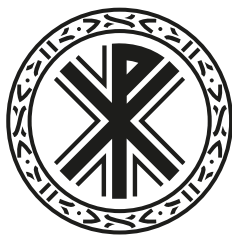
Generación de red unidimensional para puntos críticos en un intervalo

Fecha de recepción y aceptación: 22 de noviembre de 2017, 20 de febrero de 2018

J. L. González-Santander^{1*}

¹ Departamento de Ciencias Experimentales. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Calle Guillem de Castro, 96. 46001 Valencia. España. *E-mail*: juanluis.gonzalezsantander@gmail.com



ABSTRACT

We provide a general theory for the generation of one-dimensional non-uniform meshes. From this theory, we derive simple procedures for the calculation of meshes wherein the density of points are concentrated in the neighborhood of a critical point, namely, a Lorentzian- and an exponential-type mesh. The latter is especially useful when the critical point is on one of the extremes of the interval. Examples are provided in order to show that the considered non-uniform meshes improve the interpolation with respect to a uniform mesh.

KEYWORDS: *one-dimensional meshes, interpolation.*

RESUMEN

Proporcionamos una teoría general para la generación de mallas unidimensionales no uniformes. A partir de esta teoría, deducimos procedimientos simples para el cálculo de mallas en donde la densidad de puntos se concentra en la vecindad de un punto crítico, es decir, una malla de tipo lorentziano y una de tipo exponencial. Este último caso es especialmente útil cuando el punto crítico está en uno de los extremos del intervalo. Se proporcionan ejemplos para mostrar que las mallas no uniformes consideradas mejoran la interpolación con respecto a una malla uniforme.

PALABRAS CLAVE: *mallados unidimensionales, interpolación.*

INTRODUCTION

In Numerical Methods, such as interpolation, numerical integration or numerical solving of differential equations, we have to discretize the domain wherein we are looking for an approximate numerical solution of a given problem. As initial approximation to this discretization, usually uniform meshes are used. However, if some information is known in advance about the function being discretized, such an abrupt change or a violent oscillation in the neighborhood of a point, say a critical point, we can improve the numerical approximation by using non-uniform meshes which concentrate the number of mesh points nearby this critical point.

The scope of this paper is just to provide a general theory of how we can generate this non-uniform meshes for one-dimensional intervals. From this theory, we can derive closed-form expressions for some particular cases, namely, a Loretzian-type and an exponential-type meshes. Finally, we will provide some examples to see how this kind of meshes improves the interpolation of some functions.

UNIFORM AND NON-UNIFORM-MESHES

When we have a one-dimensional mesh of n points over an interval $(x_{\min}, x_{\max})$, we generate $n - 1$ subintervals (x_i, x_{i+1}) , $i = 1, 2, \dots, n - 1$. If the mesh is uniform, all subintervals are of the same length h ,

$$h = x_{i+1} - x_i, \quad i = 1, 2, \dots, n - 1. \quad (1)$$

Summing up all the subintervals, we obtain the length of the whole interval,

$$\sum_{i=1}^{n-1} h = \sum_{i=1}^{n-1} x_{i+1} - x_i \rightarrow (n-1)h = x_n - x_1 \rightarrow h = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{n-1}. \quad (2)$$

We can obtain non-uniform meshes with the aid of a positive function $f(x) > 0$ (hereafter termed as mesh density function), defining the subintervals as,

$$\int_{x_i}^{x_{i+1}} f(x) dx = A. \quad (3)$$

For convenience, the mesh density function $f(x)$ is normalized to unity within the whole interval,

$$\int_{x_{\min}}^{x_{\max}} f(x) dx = 1. \quad (4)$$

Thereby, the subintervals will be smaller where the mesh density function is greater (see Fig. 1).



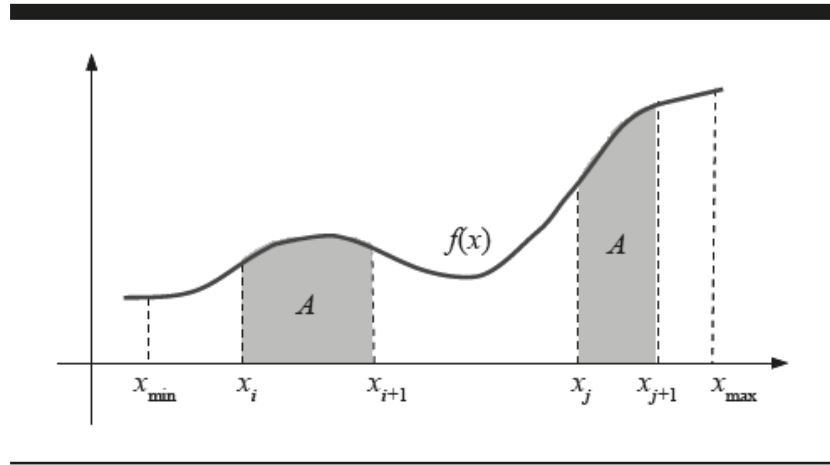


Figure 1. Non-uniform mesh subintervals.

Note that we can recover the uniform mesh taking a constant mesh density function $f(x) = C$. Indeed, in this case, from (3), we have

$$C(x_{i+1} - x_i) = A. \quad (5)$$

Therefore, summing up in (5) all the subintervals, we obtain

$$C \sum_{i=1}^{n-1} (x_{i+1} - x_i) = \sum_{i=1}^{n-1} A \rightarrow C(x_{\max} - x_{\min}) = (n-1)A. \quad (6)$$

However, note that from (4),

$$1 = \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} f(x) dx = C(x_{\max} - x_{\min}), \quad (7)$$

thus, (6) and (7) yields,

$$A = \frac{1}{n-1}. \quad (8)$$

Finally, combining (5), (7), and (8), taking into account (1), we arrive at (2), which is the formula for a uniform mesh.



PARTICULAR CASES OF NON-UNIFORM MESHES

Lorentzian mesh density function

Let us consider now a Lorentzian-type mesh density function, that for convenience, we will express as follows:

$$f(x) = \frac{\beta/\alpha}{(x - x_0)^2 + \beta^2}. \quad (9)$$

The above mesh density function (9) is positive in the real domain for $\alpha, \beta > 0$, and has got a unique maximum at $x = x_0$ (see Fig. 2). Therefore, this point is going to be the critical point around which the density of points in the mesh is going to be higher.

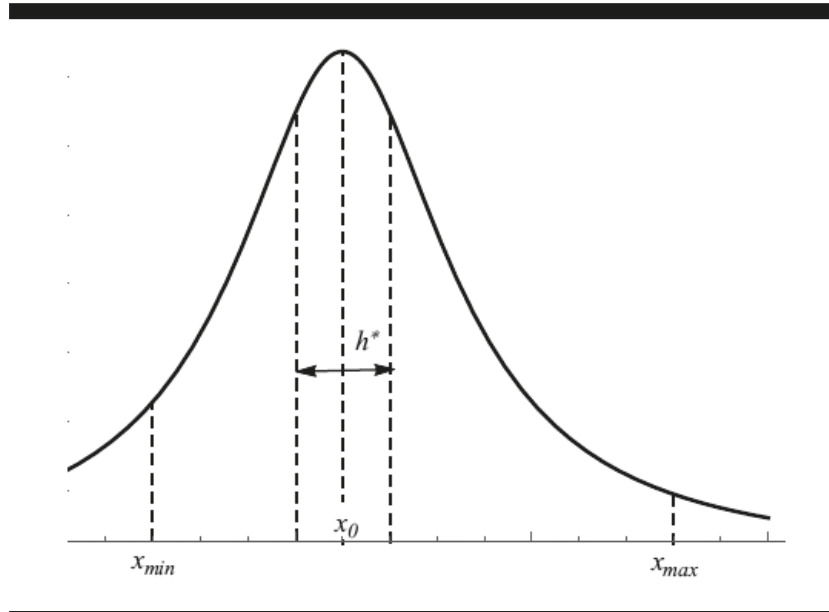


Figure 2. Lorentzian mesh density function.

Now, in order to calculate the non-uniform mesh with this Lorentzian-type density function, let us define a subinterval centered on $x = x_0$, and of width $h^* = 2\delta$ (see Fig. 2). Hereafter we will term this subinterval as the maximum subinterval. According to (3), the maximum subinterval has to satisfy,

$$\int_{x_0 - \delta}^{x_0 + \delta} f(x) dx = A. \quad (10)$$

As aforementioned, if we have n points in the mesh, the length h of each subinterval in a uniform mesh will be given by (2). However, the length of the maximum subinterval must be smaller, thus

$$\delta = \frac{h^*}{2} = \frac{\varepsilon h}{2}, \quad 0 < \varepsilon < 1. \quad (11)$$

The shrinkage factor ε will tell us how much the points of the mesh gather around the critical point x_0 . The points of the mesh are calculated iteratively as follows. Considering a Lorentzian density (9) in (3), and knowing that [1]

$$\int \frac{\beta/\alpha}{(x-x_0)^2 + \beta^2} dx = \frac{1}{\alpha} \tan^{-1} \left(\frac{x-x_0}{\beta} \right), \quad (12)$$

we have, for $i = 1, 2, \dots, n-1$,

$$\frac{1}{\alpha} \tan^{-1} \left(\frac{x-x_0}{\beta} \right) \Bigg|_{x=x_i}^{x_{i+1}} = A \rightarrow x_{i+1} = x_0 + \tan \left(A\alpha + \tan^{-1} \left(\frac{x_i-x_0}{\beta} \right) \right) \quad (13)$$

where for the initial iteration we know that $x_1 = x_{\min}$.

Let us calculate now the parameters α and β from the condition for the maximum subinterval (10) and the normalization condition (4). For this purpose, apply the following identity [2]

$$\tan^{-1}(x) - \tan^{-1}(y) = \tan^{-1} \left(\frac{x-y}{1-xy} \right), \quad xy > -1, \quad (14)$$

to (12), setting integration limits, hence

$$\int_a^b \frac{\beta/\alpha}{(x-x_0)^2 + \beta^2} dx = \frac{1}{\alpha} \tan^{-1} \left(\frac{\beta(b-a)}{\beta^2 + (a-x_0)(b-x_0)} \right). \quad (15)$$

Therefore, according to (15), the condition for the maximum subinterval (10) is rewritten as,

$$\tan(A\alpha) = \frac{2\delta\beta}{\beta^2 - \delta^2}. \quad (16)$$



Also, the normalization condition (4) is rewritten as,

$$\tan \alpha = \frac{\beta \Delta}{\beta^2 - K^2}, \quad (17)$$

where we have set,

$$\begin{aligned} \Delta &= x_{\max} - x_{\min}, \\ K^2 &= (x_{\max} - x_0)(x_0 - x_{\min}). \end{aligned} \quad (18)$$

Also, notice that from (2) and (18) we can rewrite (11) as

$$\delta = \frac{\varepsilon \Delta A}{2}, \quad 0 < \varepsilon < 1. \quad (19)$$

Solving for β^2 in (16) and (17), and equating both results, we can solve for β , obtaining,

$$\beta = \frac{K^2 - \delta^2}{2\delta \cot(A\alpha) - \Delta \cot(\alpha)}. \quad (20)$$

Now, inserting (20) in (17), we arrive at

$$4K^2\delta^2 \cot^2(A\alpha) + \Delta^2\delta^2 \cot^2(\alpha) - 2\delta\Delta(K^2 + \delta^2)\cot(\alpha)\cot(A\alpha) = (K^2 - \delta^2)^2. \quad (21)$$

The above equation (21) can be solved numerically using Brent's method [3], taking as initial bracketing $(0, \pi)$.

Procedure

In summary, knowing the interval $I = (x_{\min}, x_{\max})$, the critical point x_0 within the interval I , the number of points in the mesh n , and the shrinkage factor ε , we can compute A with (8), Δ and K with (18), and δ with (19). Once all these parameters are set, we can solve for α with (21). Next, β is computed using (20). Finally, the points of the mesh are calculated iteratively using (13).



Exponential mesh density function

The Lorentzian-type mesh cannot be used when the critical point x_0 is at one of the extremes of the interval $(x_{\min}, x_{\max})$. For these cases, consider an exponential mesh density function,

$$f(x) = \alpha e^{\beta x}. \quad (22)$$

The exponential function (22) is positive in the real domain for $\alpha > 0$. Also, in the interval $(x_{\min}, x_{\max})$, the maximum is at $x = x_{\max}$ when $\beta > 0$, and at $x = x_{\min}$ when $\beta < 0$. Therefore, the critical point will be found at one of the extremes of the interval $(x_{\min}, x_{\max})$ depending on the sign of β .

The points of the mesh are calculated as follows. Inserting (22) in (3), we have,

$$\frac{\alpha}{\beta} (e^{\beta x_{i+1}} - e^{\beta x_i}) = A \rightarrow x_{i+1} = \frac{1}{\beta} \log \left(\frac{\beta A}{\alpha} + e^{\beta x_i} \right), \quad (23)$$

where the initial iteration is given by $x_1 = x_{\min}$.

In order to calculate the parameters α and β , we use the normalization condition (4), which according to (18) and (22) reads as

$$\frac{\alpha}{\beta} e^{\beta x_{\max}} (1 - e^{-\beta \Delta}) = 1. \quad (24)$$

Now, consider $\beta > 0$, thus the maximum subinterval is given by $(x_{\max} - \delta, x_{\max})$. Similar to (11), the length of this maximum subinterval must be shrunk by a factor ε with respect to a uniform mesh, hence

$$\delta = \varepsilon h = \varepsilon \Delta A, \quad 0 < \varepsilon < 1. \quad (25)$$

Therefore, considering this maximum subinterval in (3), we get a second condition for α and β ,

$$\frac{\alpha}{\beta} e^{\beta x_{\max}} (1 - e^{-\beta \delta}) = A. \quad (26)$$

Now, from (24) and (26), we obtain the following equation for β ,

$$A(1 - e^{-\beta \Delta}) = 1 - e^{-\beta \delta}, \quad (27)$$



that can be solved using Newton-Raphson's method. For the initial iteration β_0 , we can expand in McLaurin series the exponentials given in (27) up to second order, arriving at the following approximate equation,

$$\delta - A\Delta \approx \frac{\beta}{2}(\delta^2 - \Delta^2 A) \rightarrow \beta_0 = \frac{2(\delta - A\Delta)}{\delta^2 - \Delta^2 A}. \quad (28)$$

Once β is computed, we can calculate α from (24) as,

$$\alpha = \frac{\beta e^{-\beta x_{\max}}}{1 - e^{-\beta \Delta}}. \quad (29)$$

As mentioned before, if we consider the first interval as the maximum subinterval, then we have to change $\beta \rightarrow -\beta$.

NUMERICAL EXAMPLES

Interpolation with a Lorentzian mesh

In order to test the usefulness of the Lorentzian mesh, we have interpolated the sigmoid-like function:

$$g(x) = \frac{1}{1 - e^{-3x^2 + 10x + 2}}, \quad (30)$$

taking $n = 9$ points. Fig. 3 shows the plot of the $g(x)$ function and the interpolated function with second order splines [4] using a uniform mesh within the interval $(-2, 1)$. We can see that the interpolation deviates from the $g(x)$ function where this function changes abruptly.



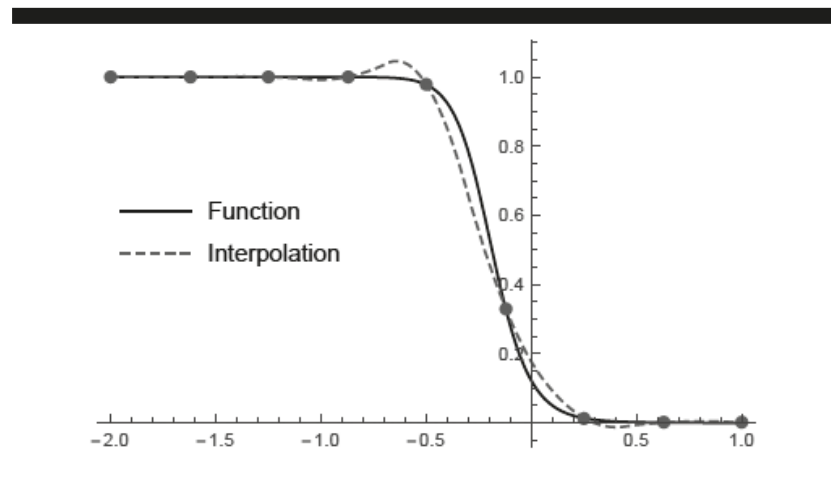


Figure 3. Interpolation using a uniform mesh.

However, taking the same number of points, $n = 9$, but using a Lorentzian mesh centered in $x_0 = -0.2$ with a shrinkage factor $\varepsilon = 0.4$, the second order splines interpolation improves the result, as it is shown in Fig. 4.

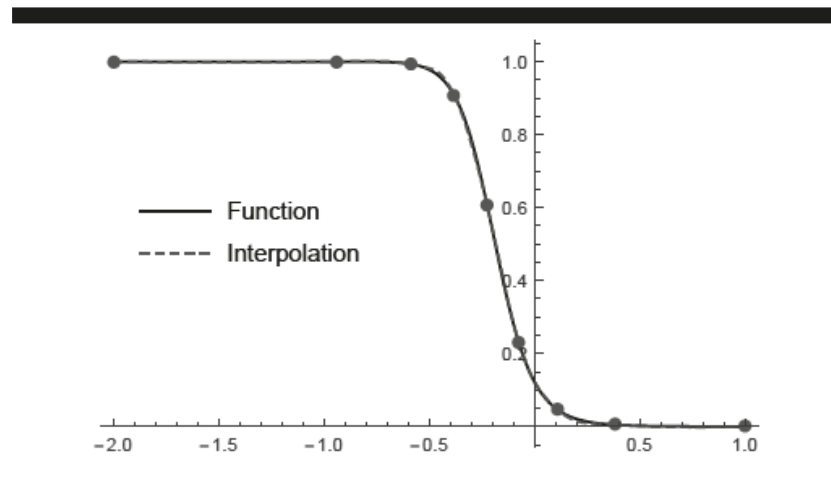


Figure 4. Interpolation using a Lorentzian-type mesh.

We can evaluate numerically the performance of both interpolations shown in Figs. 3 and 4, by using the following distance [5] between two non-negative functions f_1 and f_2 , integrable in a certain interval $I = (a, b)$:

$$\Delta_I(f_1, f_2) = \begin{cases} \frac{\int_a^b |f_1(x) - f_2(x)| dx}{\int_a^b |f_1(x) + f_2(x)| dx}, & f_1 \text{ or } f_2 \neq 0 \\ 0, & f_1 = f_2 = 0 \end{cases} \quad (31)$$

In [5] is proved that $0 \leq \Delta_I(f_1, f_2) \leq 1$, wherein $\Delta_I(f_1, f_2) = 0$ means that f_1 and f_2 are overlapped within the integration interval $I = (a, b)$, and $\Delta_I(f_1, f_2) = 1$ means that both functions are relatively infinitely far one from each other.

Denoting $g_{\text{unif}}(x)$ as the interpolating function with a uniform mesh (Fig. 3), and $g_{\text{lorentz}}(x)$ as the interpolating function with a Lorentzian mesh (Fig. 4), we have obtained,

$$\begin{aligned} \Delta_{(-2,1)}(g_{\text{unif}}, g) &\approx 0.015937, \\ \Delta_{(-2,1)}(g_{\text{lorentz}}, g) &\approx 0.001690, \end{aligned} \quad (32)$$

which indicates that the Lorentz mesh improves the interpolation quite significantly.

Interpolation with an exponential mesh

Now, let us interpolate the function,

$$g(x) = \sin\left(\frac{1}{x^2 + 0.05}\right), \quad (33)$$

within the interval $(0, \pi)$, taking $n = 10$ points in the mesh. Fig. 5 shows the plot of the $g(x)$ function and the interpolated function with second order splines [4] using a uniform mesh. We can see that the interpolation deviates from the $g(x)$ function nearby the origin since there the function oscillates significantly.



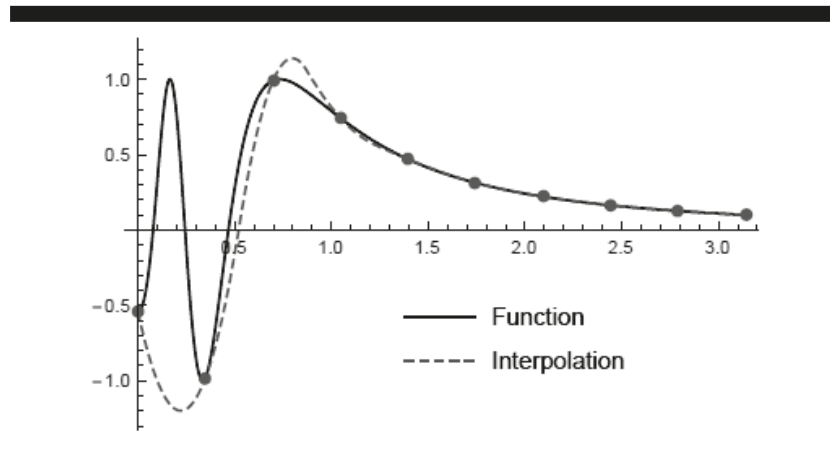


Figure 5. Interpolation using a uniform mesh.

However, taking the same number of points, $n = 10$, but using an exponential mesh with the critical point at $x_{\min} = 0$ with a shrinkage factor $\varepsilon = 0.25$, the second order splines interpolation improves the result, as it is shown in Fig. 6.

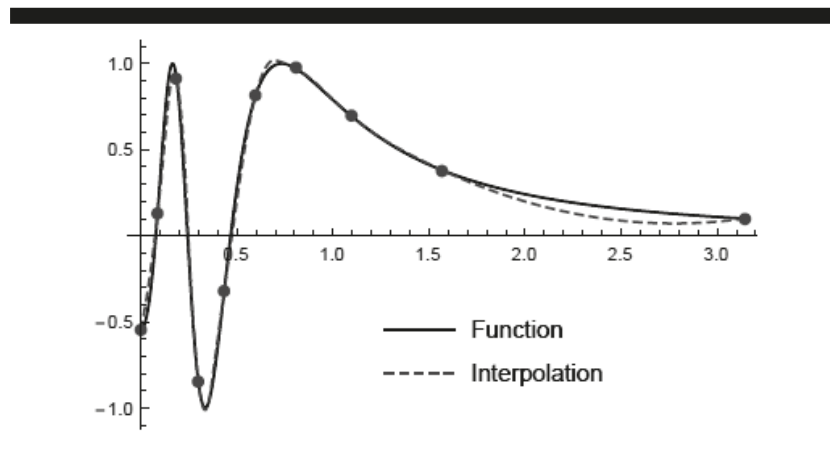


Figure 6. Interpolation using an exponential mesh.

Denoting $g_{\text{unif}}(x)$ as the interpolating function with a uniform mesh (Fig. 5), and $g_{\text{exp}}(x)$ as the interpolating function with an exponential mesh (Fig. 6), we have obtained,

$$\begin{aligned}\Delta_{(0,\pi)}(g_{\text{unif}}, g) &\approx 0.1847, \\ \Delta_{(0,\pi)}(g_{\text{exp}}, g) &\approx 0.04130,\end{aligned}\tag{34}$$

which indicates that the exponential mesh improves the interpolation quite significantly.

CONCLUSIONS

We have obtained a general procedure to generate non-uniform meshes in terms of the density of points required (mesh density function) within a given interval, (3) and (4). This is useful when we know in advance that a function changes abruptly or oscillates violently in the neighborhood of a certain point of the interval (i.e. a critical point x_0), thereby more points in the mesh are needed nearby x_0 . In particular, we have obtained closed-form expressions for a Lorentzian mesh density function in (13), which can be applied when the central subinterval belongs to the interval. When the critical point is on one extreme of the interval, an exponential mesh is used (23). Finally, numerical examples are given to highlight how this kind of non-uniform meshes improves the interpolation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to acknowledge the financial support received from Universidad Católica de Valencia under Grant 2017-160-001.

LITERATURE CITED

- [1] Spiegel, MR. Mathematical handbook of formulas and tables. New York: McGraw-Hill, 1968. Eqn. 14.39.
- [2] Gradshteyn IS, Ryzhik IM. Table of integrals, series and products. 7th ed. New York: Academic Press Inc; 2007. Eqn. 1.625.9.
- [3] Brent, RP. Algorithms for Minimization without Derivatives. Dover, 2002 (Original edition 1973).
- [4] Hoffman, JD, Frankel, S. Numerical methods for engineers and scientists. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. Sect. 4.9.
- [5] González-Santander JL, Martín G. Relative distance between two scalar fields. Application to mathematical modeling approximation. Math Method Appl Sci 2014;37:2906-2922.



Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	69-78	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	-------	---	-------------------	----------------

Estudio de la bioactividad *in vitro* e *in vivo* de brotes de brócoli ricos en glucosinolatos/isotiocianatos

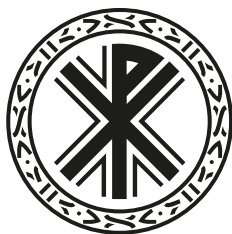
Study of the *in vitro* and *in vivo* bioactivity of glucosinolates/isothiocyanates-rich broccoli sprouts

Fecha de recepción y aceptación: 28 de agosto de 2017, 1 de diciembre de 2017

N. Baenas¹, D. A. Moreno¹ y C. García-Viguera^{1*}

¹ Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC.

* Correspondencia: Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo. Edificio 25. 30100 (Espinardo) Murcia. España. E-mail: cgviguera@cebas.csic.es



RESUMEN

Los brotes de brócoli son alimentos de gran interés debido a su mayor contenido en nutrientes y compuestos bioactivos en comparación con el vegetal adulto. Poseen alto contenido en glucosinolatos, destacando la glucorafanina, que se encuentra en mayor concentración, cuyo producto de hidrólisis, el isotiocianato sulforafano, ha demostrado poseer distintas actividades biológicas, como son la antiinflamatoria, antioxidante y un efecto antiproliferativo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto antiproliferativo de estos brotes como matriz vegetal, así como sus compuestos bioactivos puros, la glucorafanina y el sulforafano, demostrando una mayor bioactividad del vegetal como alimento completo. Por otro lado, se demostró el efecto antinociceptivo (analgésico) de estos brotes en modelos de roedores *in vivo*, abriendo una línea de investigación interesante para el estudio de los mecanismos de acción de estos compuestos naturales como fitoterapéuticos.

PALABRAS CLAVE: *crucíferas, glucorafanina, sulforafano, antiproliferativo, antinocicepción.*

ABSTRACT

Broccoli sprouts are very interesting plant foods due to their potential source of nutrients and bioactive compounds. These sprouts have a higher content in glucosinolates than adult plants, being glucoraphanin the one presented in higher amount. Its hydrolysis product, the isothiocyanate sulforaphane, has shown different biological activities in previous studies, such as anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative effect. The aim of this work was to explore the antiproliferative effect of pure glucoraphanin and pure sulforaphane against cell lines of human cancer *in vitro*, compared to the complete broccoli sprouts. Results showed that the whole plant is more active. On the other hand, also the antinociceptive effect of broccoli sprouts was studied in rodent models *in vivo*, providing an interesting research line for the study of the action pathways of these natural products as phytotherapeutics.

KEYWORDS: *crucifers, glucoraphanin, sulforaphane, antiproliferative, antinociceptive.*

INTRODUCCIÓN

Según distintos estudios realizados hasta la fecha, el consumo de vegetales de la familia de las crucíferas está relacionado con diferentes efectos beneficiosos para la salud, como una actividad anticancerígena o antiinflamatoria. Esto se debe a su alto contenido en compuestos bioactivos, como los glucosinolatos y sus derivados, los isotiocinatos, así como los compuestos fenólicos [1-3]. En este sentido, el consumo de brotes de brócoli proporciona una fuente muy interesante de nutrientes y fitoquímicos en nuestra dieta, ya que pueden presentar una concentración hasta veinte veces superior en bioactivos que el vegetal adulto [4, 5].

Muchas de las actividades biológicas de estos brotes están relacionadas con la presencia de sulforafano, el isotiocianato procedente de la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina. Este compuesto se metaboliza a través de la ruta del ácido mercaptúrico en los enterocitos, uniéndose al glutatión y derivados de la cisteína, los cuales se han encontrado en plasma y orina en niveles cuantificables [6]. El sulforafano y sus metabolitos son capaces de inducir actividades enzimáticas como las de detoxificación (enzimas de tipo Fase II), así como otros efectos antitumorales como inhibición del ciclo celular y apoptosis [7, 8]. Además, estos compuestos se han relacionado con una acción antiinflamatoria y antioxidante en la célula, inhibiendo el factor NF- κ B responsable de la expresión de iNOS, COX-2 y del factor THF- α , mecanismos implicados en la inflamación celular y, por lo tanto, previniendo o reduciendo el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas [9].

No obstante, además de estos estudios, todavía se necesita investigar con detenimiento los mecanismos de acción del sulforafano. Es por ello por lo que en este trabajo se evalúa el efecto antiproliferativo de los brotes de brócoli como matriz vegetal completa, así como de los fitoquímicos puros: la glucorafanina (principal glucosinolato del brócoli) y el sulforafano (isotiocianato derivado del anterior), en líneas celulares de cáncer humano colorrectal (Caco-2 y HT-29) y hepático (HepG2), comparando los efectos de una matriz vegetal con sus compuestos bioactivos puros. Por otro lado, se investiga una acción antinociceptiva (analgésica) en modelos de roedores (*in vivo*), abriendo una línea de investigación con el objetivo de promover el uso de fitoquímicos como alternativa al uso de medicamentos analgésicos con efectos secundarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación de brotes de brócoli

Las semillas de brotes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) se adquirieron en la empresa Intersemillas, S. A. (Valencia, España). La producción de estos brotes se realizó en las cámaras de cultivo controladas del CEBAS-CSIC, con las siguientes condiciones: ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h, temperaturas de 25 y 20 °C y humedad relativa del 60 y 80 %, respectivamente, radiación PAR 400 μ mol/m $\cdot$ s mediante tubos fluorescentes (Philips TLD 36 W/83, Hamburgo, Alemania) y lámparas de haluro metálico (Osram HQI.T 400 W, Múnich, Alemania). La germinación de los brotes se realizó, en primer lugar, mediante hidratación y aireación de las semillas durante 24 h en agua con 5 g/L de hipoclorito sódico para su activación y desinfección. A continuación, se extendieron sobre celulosa (CN SEEDS Ltd, Inglaterra) 10 g de semillas hidratadas por bandeja de 12 x 7 cm y se trasladaron



a la cámara de cultivo controlada. Allí se mantuvieron en oscuridad durante los primeros tres días, y a partir del cuarto día de germinación se expusieron al ciclo de luz/oscuridad hasta el octavo día, cuando se recogieron, pesaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Por último, los brotes se liofilizaron y molieron para realizar su extracción. Cada bandeja de brotes ($n = 3$) corresponde a un replicado de una muestra (tres bandejas son tres réplicas de una misma muestra).

Extracción y determinación de glucosinolatos en brotes de brócoli

Cada muestra liofilizada (50 mg), perteneciente a una bandeja de brotes, se extrajo con 1 ml de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (70:30). Las muestras se incubaron a 70°C durante 30 min, para desactivar la enzima mirosinasa. Tras centrifugar las muestras, el extractante se evaporó en un evaporador rotatorio y el residuo sólido se disolvió en H_2O para su posterior análisis cromatográfico. Las muestras se filtraron por una membrana de PVDF de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millex) y se analizaron por HPLC-DAD-MS/MS en los laboratorios del CEBAS-CSIC, mediante el método descrito por Baenas *et al.* para la efectiva identificación y cuantificación de los glucosinolatos [10].

Extracción y determinación de isotiocianatos en brotes de brócoli

Cada muestra liofilizada (50 mg) se extrajo con 1,5 ml de H_2O . Las muestras se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente (25°C), en agitación para conseguir la hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos [11]. Tras centrifugar las muestras, estas se filtraron por una membrana de PVDF de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millex) y se analizaron por UHPLC-MS/MS-QqQ, mediante el método descrito por Dominguez-Perles *et al.* para la identificación y cuantificación de los isotiocianatos [12].

Preparación de extractos acuosos para el análisis de bioactividad

La evaluación de la bioactividad se realizó empleando métodos *in vitro* e *in vivo*.

En primer lugar, los brotes de brócoli liofilizados y molidos se sometieron a una extracción acuosa siguiendo el método de Cramer y Jeffery (2011) a gran escala, consistiendo en la extracción de 25 g de material vegetal en 400 ml de agua, que se centrifugaron durante 10 min a 3.000 rpm. Posteriormente se filtraron por papel de filtro de tipo Albert 400. A continuación, este extracto acuoso se liofilizó y se almacenó en un desecador, libre de humedad y en oscuridad, hasta su uso.

Evaluación del efecto antiproliferativo *in vitro* en cultivos celulares

Se empleó el método colorimétrico MTT [13] y tres cultivos celulares: Caco-2 y HT-29 (líneas celulares de cáncer intestinal) y HepG2 (línea celular de cáncer hepático). Se expusieron a diferentes concentraciones de sulforafano puro (100-10 $\mu\text{mol/L}$), glucorafanina (100-10 $\mu\text{mol/L}$) y extracto acuoso de brotes de brócoli (20-0,05 $\mu\text{mol/L}$) durante 24 h, para determinar el efecto inhibidor de



dichas muestras en la proliferación de estas células, mediante el cálculo de la IC_{50} (concentración de la muestra que produce una inhibición del crecimiento celular del 50 %).

Evaluación del efecto analgésico *in vivo* en roedores

Mediante la realización de un extracto acuoso del material vegetal liofilizado, se evaluó el efecto antinociceptivo (analgésico) de los brotes de brócoli, por medio de dos tipos de test de nocicepción (proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos) en roedores [14]: test de la formalina en ratas Wistar [15] y test de estiramientos en ratones albinos Swiss [16]. Para ello se emplearon las dosis 500, 1000 y 2000 mg/kg del extracto acuoso liofilizado, diluido en agua, y se administraron con una sonda orogástrica o cánula directamente al estómago de los roedores, con el fin de controlar la dosis aplicada. Este tratamiento se administró 30 min antes del inicio de los tests de nocicepción.

Métodos estadísticos

Todos los análisis se realizaron por triplicado. El cálculo de la IC_{50} se llevó a cabo con el programa Graphpad Prism (IBM Corp, NY, USA); y las diferencias significativas entre valores correspondientes a más de dos muestras se calcularon mediante un ANOVA ($P < 0,05$) con el programa SPSS 15.0 (LEAD Technologies, Chicago, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido en compuestos bioactivos de los brotes de brócoli

La caracterización en compuestos bioactivos (glucosinolatos e isotiocianatos) del material vegetal se llevó a cabo con anterioridad al diseño de los experimentos de evaluación de la bioactividad, con el objetivo de escoger las dosis apropiadas del extracto acuoso de brotes de brócoli, con un contenido en compuestos conocido. Los brotes seleccionados se recogieron a los ocho días de germinación, habiéndose establecido dicho periodo de tiempo como óptimo para su consumo en trabajos previos, debido a un tamaño apropiado y a su alto contenido en compuestos bioactivos [10]. En el extracto hidrometanólico, preparado con el objetivo de desactivar la enzima mirosinasa responsable de la hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos, se encontró una elevada concentración de glucosinolatos (40,25 mg/g brotes de brócoli P.S.) (tabla 1), en comparación con el contenido de estos compuestos en vegetales maduros, como la pella de brócoli (~8 mg/g P.S.) [17]. Del total de glucosinolatos, se observó que el 40 % correspondía a la glucorafanina, cuyo producto de hidrólisis, el sulforafano, posee diferentes bioactividades *in vitro* e *in vivo*, como actividad antioxidante, antiproliferativa y antiinflamatoria, a través de la modulación de mecanismos y expresión de ciertas enzimas y genes relacionados con enfermedades crónicas y ciertos cánceres [9, 18].



Tabla 1. Compuestos bioactivos en brotes de brócoli (mg/g P.S.)

Glucosinolatos		
Glucoiberina	6,08	± 0,38
Glucorafanina	15,69	± 0,09
4-Hidroxiglucobrasicina	1,65	± 0,20
Glucoerucina	3,59	± 0,08
Glucobrasicina	3,02	± 0,29
4-Metoxiglucobrasicina	1,40	± 0,10
Neoglucobrasicina	8,81	± 0,20
GLS Alifáticos	25,36	± 0,50
GLS Indólicos	14,88	± 0,64
Total	40,25	± 0,79
Isotiocianatos		
Sulforafano	0,951	± 0,001
Iberina	0,026	± 0,001
Indole-3-carbinol	0,013	± 0,003
Total	0,990	± 0,005

Media (n = 3) ± SD. P.S. (peso seco)

Tras realizar la hidrólisis de la glucorafanina por la enzima mirosinasa mediante la extracción acuosa, el contenido en sulforafano en el extracto acuoso fue de 0,95 mg/g brotes de brócoli (tabla 1). En los brotes también se analizaron el isotiocianato iberina (0,026 mg/g), producto de hidrólisis de la glucoiberina, y el indol-3-carbinol (0,013 mg/g), producto de hidrólisis de glucosinolatos de tipo indólico, pues ambos isotiocianatos también contribuyen a la bioactividad de este alimento, debido a su actividad antioxidante y anticancerígena, según diversos estudios [8,19].

Efecto antiproliferativo en células cancerígenas intestinales (Caco-2 y HT-29) y hepáticas (HepG2) humanas

Los resultados indican que el efecto antiproliferativo del extracto de brotes de brócoli, como matriz alimentaria, y del sulforafano es dosis-dependiente. Sin embargo, no es así en el caso del tratamiento con glucorafanina, con el cual no se alcanza la inhibición del 50 % del crecimiento celular (IC₅₀). En la figura 1 se puede observar la inhibición del crecimiento de las líneas celulares tras los tratamientos realizados con sulforafano como compuesto puro (100-10 µmol/L), glucorafanina como compuesto puro (100-10 µmol/L) y el extracto acuoso de brotes de brócoli (conteniendo 20-0,05 µmol/L de sulforafano).



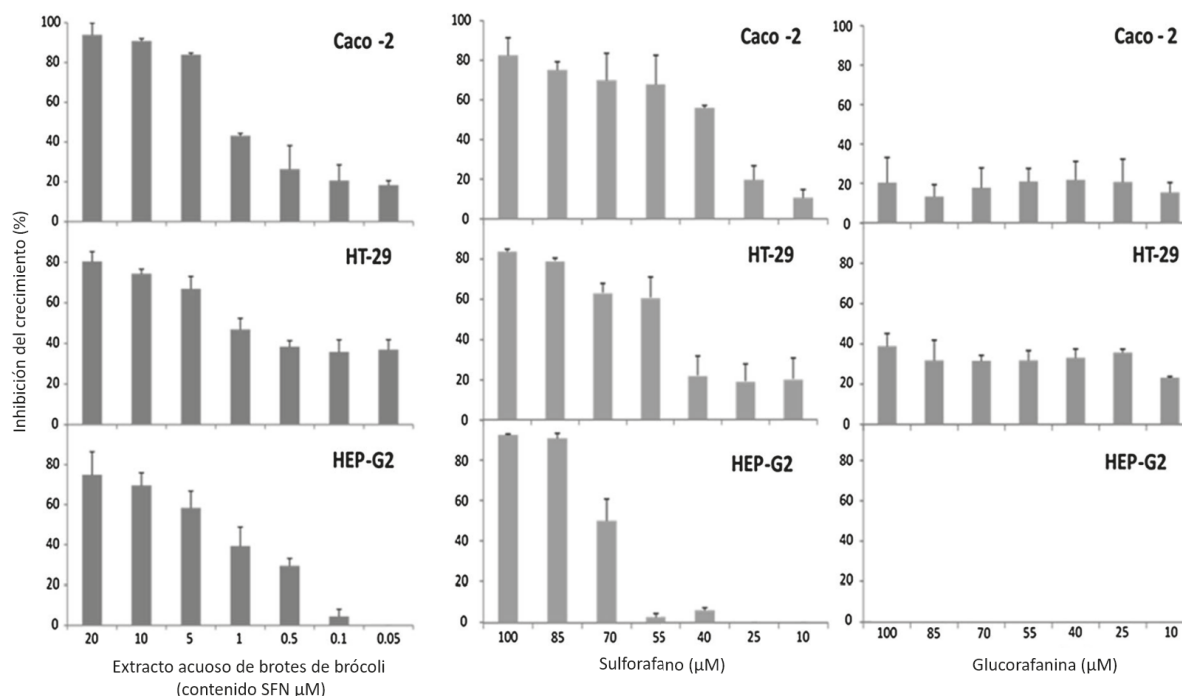


Figura 1. Efecto antiproliferativo (% inhibición del crecimiento) tras la aplicación de extracto de brotes de brócoli y sulforafano (SFN) y glucorafanina como compuestos puros.

Estos resultados indican que es necesaria la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina al isotiocianato sulforafano para obtener el efecto bioactivo, en este caso la actividad antiproliferativa, de acuerdo con otros autores [20]. La IC_{50} más baja que hemos obtenido ha sido con el tratamiento de brotes de brócoli, siendo de 1,6 y 3,2 $\mu\text{mol/L}$ en ambas Caco-2 y HT-29, y en HepG2, respectivamente (figura 1). Estos resultados nos indican que, aunque los brotes de brócoli contienen menor cantidad de sulforafano en comparación con la aplicación del compuesto puro, el efecto del alimento completo, con la presencia de otros compuestos bioactivos como compuestos fenólicos o vitaminas, actúa biológicamente de forma sinérgica, incrementando la bioactividad de esta muestra y no interfiriendo con la actividad del sulforafano presente en los brotes [20].

Efecto analgésico de brotes de brócoli en modelos de roedores

Antes de la realización de los test de nocicepción se administró a los roedores el extracto acuoso de brotes de brócoli liofilizado y disuelto en agua, empleando una cánula para proporcionarles las dosis orales de 500, 1.000 y 2.000 mg/kg 30 min antes. Los resultados obtenidos, tras realizar el test, indican una disminución del dolor en las ratas con el tratamiento, tanto en la primera fase (fase neurogénica) durante los primeros 5 min (figura 2.A-B.), como en la segunda (fase inflamatoria), de 20 a 25 min (figura 2.C-D.).

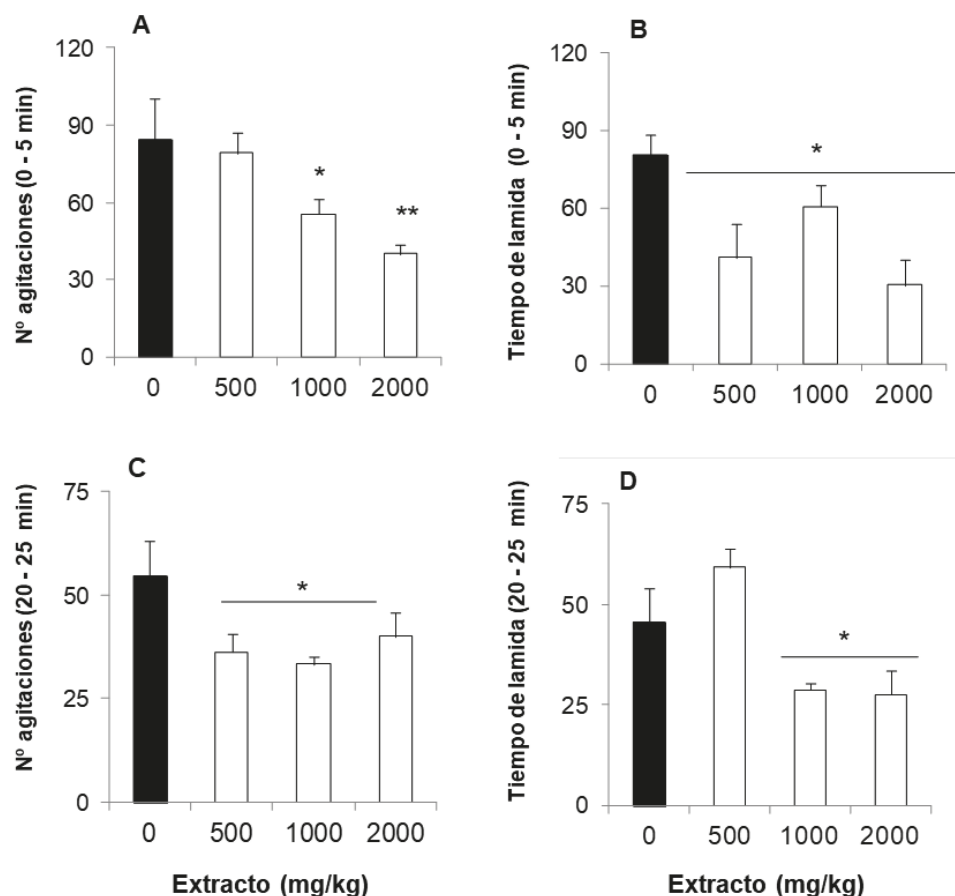


Figura 2. Efecto antinociceptivo evaluado con el test de la formalina tras el tratamiento vía oral del extracto de brotes de brócoli en ratas.

En cada una de las fases se evaluó la cantidad de veces que la rata agitaba la pata debido al dolor causado por un agente nocivo, inyectado en la zona subplantar, y el tiempo de lamidas que el animal realizaba en este lugar, siendo en general estos resultados significativos estadísticamente con las dosis de 1.000 y 2.000 mg/kg, donde encontramos una reducción de estos parámetros (figura 2).

En el caso del test de estiramientos en ratones, observamos que el efecto tanto en el tiempo de latencia hasta el primer estiramiento, como en el número total de estiramientos abdominales, fue dosis-dependiente, pues encontramos diferencias significativas en el aumento del tiempo de latencia para las dosis de 1.000 y 2.000 mg/kg en los ratones tratados (figura 3.A.), y tras proporcionar las tres dosis orales en el número total de estiramientos abdominales (figura 3.B.).



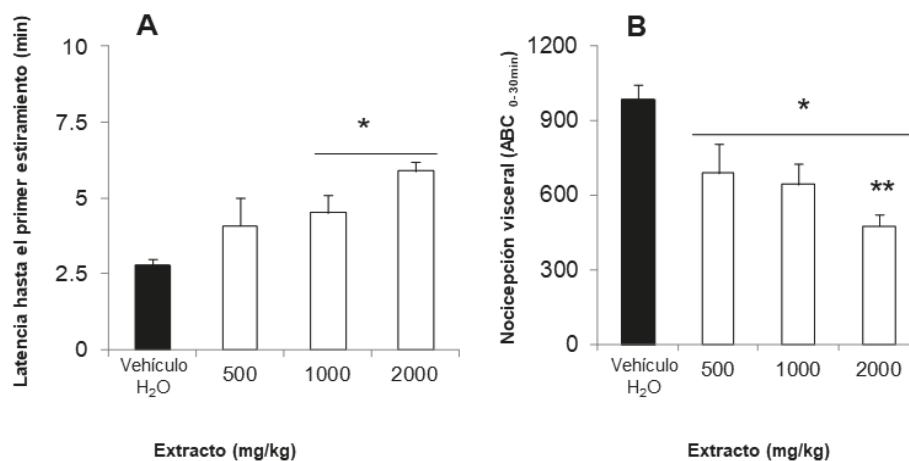


Figura 3. Efecto antinociceptivo dosis-respuesta evaluado por el test de estiramientos tras el tratamiento vía oral del extracto de brotes de brócoli en ratones.

Por lo tanto, el extracto de brotes de brócoli liofilizados modula tanto la fase neurogénica del dolor o dolor agudo, debido a la activación del sistema nervioso periférico, como la fase inflamatoria, responsable del dolor a nivel del sistema nervioso central. No obstante, la disminución del dolor es superior en la primera fase, posiblemente debido a una acción de tipo opiácea del tratamiento [20], así como una acción analgésica debido al bloqueo de mecanismos inflamatorios a nivel periférico [21,22].

CONCLUSIONES

Es importante, antes de realizar un estudio *in vitro* o *in vivo*, caracterizar el material vegetal que se va a utilizar para los tratamientos, con el objetivo de identificar y cuantificar los compuestos bioactivos, presentes en este, que puedan tener efecto beneficioso para la salud.

Con este trabajo se ha demostrado que se puede estudiar la biodisponibilidad y bioactividad del sulforafano en células cancerígenas humanas, uno de los responsables del efecto antiproliferativo de los brotes de brócoli en este modelo *in vitro*. Por otro lado, se ha demostrado el efecto analgésico de estos brotes en modelos de roedores, pudiendo utilizarse como tratamiento y evitar así los efectos secundarios de los medicamentos usados normalmente. Así mismo, se requiere el estudio de los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos presentes en los brotes de brócoli, como antiinflamatorio, anticancerígeno y antioxidante, para determinar cómo afectan al metabolismo humano y a la prevención del desarrollo de enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado mediante el proyecto AGL2013-46247-P, del Ministerio de Economía y Competitividad (España), y parcialmente a través de la Red Temática CORNUCOPIA (Ref. 112RT0460), dentro del programa CYTED (España). N. Baenas fue beneficiaria de una beca FPU del Ministerio de Educación (España).

REFERENCIAS

- [1] Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2012;18(6):337-47.
- [2] Jeffery EH, Keck AS. Translating knowledge generated by epidemiological and in vitro studies into dietary cancer prevention. *Molecular nutrition & food research*. 52 Suppl 1. 2008;S7-17.
- [3] Wagner AE, Terschluessen AM, Rimbach G. Health Promoting Effects of Brassica-Derived Phytochemicals: From Chemopreventive and Anti-Inflammatory Activities to Epigenetic Regulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;12.
- [4] Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*. 2010;119(4):1485-90.
- [5] Hanlon PR, Barnes DM. Phytochemical Composition and Biological Activity of 8 Varieties of Radish (*Raphanus sativus* L.) Sprouts and Mature Taproots. *Journal of Food Science*. 2011;76(1):C185-C92.
- [6] Angelino D, Jeffery E. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*. 2014;7:67-76.
- [7] Clarke JD, Ho E, Dashwood RH. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane, *Cancer letters*. 2008;269(2):291-304.
- [8] La Marca M, Beffy P, Della Croce C, Gervasi PG, Iori R, Puccinelli E *et al.* Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(8):2822-30.
- [9] Folkard DL, Marlow G, Mithen RF, Ferguson LR. Effect of Sulforaphane on NOD2 via NF- κ B: implications for Crohn's disease. *Journal of Inflammation*. 2015;12(1):1-6.
- [10] Baenas N, Moreno DA, García-Viguera C. Selecting sprouts of brassicaceae for optimum phytochemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(45):11409-20.
- [11] Cramer JM, Jeffery EH. Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutrition and cancer*. 2011;63(2):196-201.
- [12] Domínguez-Perles R, Medina S, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil-Izquierdo A. A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chemistry*. 2014;143:132-8.
- [13] Baenas N, Silván JM, Medina S, de Pascual-Teresa S, García-Viguera C, Moreno DA. Metabolism and antiproliferative effects of sulforaphane and broccoli sprouts in human intestinal (Caco-2) and hepatic (HepG2) cells. *Phytochemistry Reviews*. 2015;14(6):1035-44.



- [14] Baenas N, González-Trujano ME, Guadarrama-Enríquez O, Pellicer F, García-Viguera C, Moreno DA. Broccoli sprouts in analgesia-preclinical: In vivo studies. *Food and Function*. 2017;8(1):167-76.
- [15] Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*. 1990;40(2):229-38.
- [16] Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. 1968;32(2):295-310.
- [17] Aires A, Carvalho R, Rosa E. Glucosinolate composition of brassica is affected by postharvest, food processing and myrosinase activity. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2012;36(3):214-24.
- [18] Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhauser C. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(34):32008-15.
- [19] Munday R, Munday CM. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(7):1867-71.
- [20] Zhao CS, Tao YX, Tall JM, Donovan DM, Meyer RA, Raja SN. Role of micro-opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice. *Experimental neurology*. 2003;184(2):839-45.
- [21] Bell RF, Borzan J, Kalso E, Simonnet G. Food, pain, and drugs: does it matter what pain patients eat? *Pain*. 2012;153(10):1993-6.
- [22] Medina S, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil JJ. *et al.* The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *Food Chemistry*. 2015;173:1187-94.

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	79-94	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	-------	--	----------------------	----------------

Métodos de refuerzo mecánico del poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para aplicaciones industriales avanzadas

Mechanical reinforcement methods of poli(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
for advanced industrial applications

Fecha de recepción y aceptación: 17 de octubre de 2017, 15 de enero de 2018

Ariagna L. Rivera Briso¹ y Ángel Serrano Aroca^{1*}

¹ Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. E-mail: angel.serrano@ucv.es



RESUMEN

El poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) es un polímero biodegradable muy prometedor de la familia de polihidroxialcanoatos (PHA), con muchas aplicaciones potenciales en muchos campos industriales importantes, como los envases biodegradables, las prótesis sintéticas, el suministro terapéutico, la cura de heridas, los soportes porosos para ingeniería de tejidos, etc., debido a su excelente biocompatibilidad, nula toxicidad y producción industrial adecuada a gran escala. Sin embargo, muchas de sus prometedoras aplicaciones a menudo se ven obstaculizadas por su baja resistencia mecánica. Por lo tanto, se han desarrollado nuevos métodos para producir materiales avanzados basados en el PHBV en forma de sistemas multicomponente que exhiben propiedades superiores para poder aumentar de forma exponencial el uso de estos materiales en un amplio rango de sectores industriales. En este trabajo de revisión mostramos los grandes logros alcanzados hasta ahora en este campo de investigación. Sin embargo, es importante animar a todos los investigadores de Ciencia de Materiales a seguir trabajando en la mejora de las propiedades de este biopolímero excepcional.

PALABRAS CLAVE: poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), propiedades mecánicas, polímeros biodegradables, aplicaciones industriales, refuerzo.

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) is a very promising biodegradable polymer from the family of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) with many potential applications in many important industrial fields such as biodegradable packaging, synthetic prosthesis, therapeutic delivery, wound dressing, porous supports as scaffolds for tissue engineering, etc. due to their excellent biocompatibility, non-toxicity, and suitable large-scale industrial production. However, many of its potential uses required for these applications often are hindered by their low mechanical strength. Thus, new methods have been developed in order to produce advanced PHBV-based materials as multicomponent systems exhibiting superior properties to increase the potential uses of these materials in a wide range of industrial sectors. In this review, we show

great advances achieved so far in this research field. However, it is important to encourage all Material Science researchers to continue working in the enhancement of properties of this outstanding biopolymer.

KEYWORDS: *Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), mechanical properties, biodegradable polymers, industrial applications, reinforcement.*

INTRODUCCIÓN

El uso de biomateriales biodegradables data de periodos ancestrales, pues antiguas civilizaciones ya empleaban materiales de este tipo para el tratamiento de heridas y de algunas enfermedades. Sin embargo, no fue hasta la Segunda Guerra Mundial cuando se intensificó la búsqueda de nuevos materiales biodegradables para aplicaciones biomédicas [1]. Del mismo modo, se comenzó a incrementar el número de trabajos de investigación con el objetivo de mejorar las propiedades de estos materiales ya existentes y a sintetizar nuevos biomateriales, siendo los polímeros los materiales de mayor relevancia debido a su gran amplio rango de posibles aplicaciones [2].

Dentro de los polímeros biodegradables más producidos y comercializados en el mundo destacan los polihidroxialcanoatos (PHA), que constituyen una alternativa sostenible, ya que pueden ser transformados en agua y dióxido de carbono en presencia de oxígeno o en metano en condiciones anaerobias mediante microorganismos presentes en aguas y suelos [3].

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son una familia de biopolíesteres lineales compuestos de unidades de hidroxialcanoato (HA) como estructura básica, que se obtienen mediante fermentación bacteriana y son termoprocесables, con puntos de fusión entre 40 y 180 °C. Se acumulan como polímeros líquidos, insolubles en agua, móviles y amorfos en forma de gránulos rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas [4].

Estos biopolímeros se alojan, como inclusiones granulares, en el citoplasma de una amplia variedad de microorganismos, tanto gram positivos como gram negativos, en condiciones de carencia nutricional de elementos, como nitrógeno, fósforo, magnesio, azufre, etc., y exceso de fuente de carbono [5]. Estas inclusiones se observan con el microscopio como gránulos esféricos de diferentes tamaños [6]. Dichos gránulos intracelulares funcionan como un almacén energético para la célula que lo puede reconvertir en material carbonado cuando la fuente de carbono externa se agota, o si el nutriente limitante es suministrado nuevamente. La utilización de dicho polímero es considerada una estrategia desarrollada por las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes sujetos a condiciones cambiantes [7].

Las ventajas que tienen los PHA sobre los plásticos derivados del petróleo, y que les confieren muchas posibilidades para ser los candidatos idóneos para sustituir a los plásticos convencionales, es que pueden ser sintetizados, como se ha comentado, a partir de fuentes renovables, son biodegradables y además biocompatibles, propiedad muy importante para las aplicaciones biomédicas industriales [8].

El biopolímero más extendido y más ampliamente estudiado dentro de la familia de los polihidroxialcanoatos es el polihidroxibutirato (PHB), que fue descubierto en 1923 por Maurice Lemoigne [9]. El PHB es un polímero termoplástico, con propiedades físicas similares a las de algunos polímeros

derivados del petróleo, como el polipropileno, altamente biodegradable, no tóxico, biocompatible y entre cuyas propiedades destaca su alto grado de cristalinidad, insolubilidad en agua y que posee una relativa resistencia a la degradación hidrolítica [4]. Este biopolímero podría utilizarse con éxito en infinidad de aplicaciones de agricultura, industria y biomédicas. Sin embargo, su aplicación se ve desfavorecida por sus pobres propiedades mecánicas, principalmente por su elevada fragilidad [10,11].

Una estrategia muy utilizada para mejorar las propiedades del PHB es la incorporación de diferentes monómeros secundarios en la cadena del polímero para formar copolímeros con propiedades extremadamente diferentes [12]. De este modo, más de 150 monómeros diferentes se pueden combinar para originar materiales con propiedades extremadamente diferentes. Así, se han sintetizado polihidroxicanoatos copolímeros de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxihexanoato (PHBHHx) y poli-3-hidroxioctanoato (PHO). De todos estos bioplásticos, el copolímero de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), es el más estudiado recientemente y el que mejores propiedades presenta.

POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO)

El poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV o PHBHV) es un poliéster alifático lineal que se origina de la inserción de unidades de 3-hidroxivalerato (HV) en el PHB, cuya estructura química se presenta en la siguiente figura.

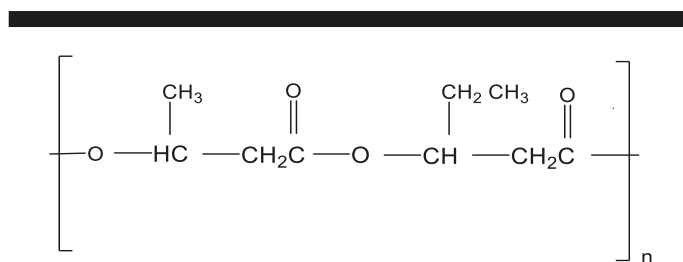


Figura 1. Estructura química del copolímero PHBV.

Dentro de la familia de los polihidroxicanoatos, el PHBV es el que mayor potencial presenta para aplicaciones industriales avanzadas como la ingeniería tisular, debido a sus propiedades mecánicas, su alta inmunotolerancia y su biodegradabilidad controlable mediante modificación superficial; además es no tóxico, es biocompatible con muchos tipos de células y se ha desarrollado a nivel industrial [13,14].

Este biopolímero se caracteriza por su alta cristalinidad, su rigidez y su condición quebradiza. La temperatura de fusión del PHBV es más baja que la del PHB, puede disolverse mediante disolventes clorados y es resistente a la radiación ultravioleta y a aceptables cantidades de alcoholes, grasas y aceites [15]. Además, comparado con el PHB, presenta excelentes propiedades barrera al oxígeno, mayor inactividad química, mayor viscosidad en estado líquido, mejor procesabilidad en extrusión, mejores propiedades mecánicas, mayor tensión superficial y mayor flexibilidad [16].



Recientemente, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) ha atraído la atención de la industria e investigadores como material biodegradable muy prometedor, debido a su potencial biotecnológico y a su aplicabilidad, tanto en los sectores médico y agrícola como en el ámbito del envasado alimentario [17,18]. Sin embargo, este polímero continúa presentado alta fragilidad, baja resistencia al impacto, marcada hidrofobicidad y deficiente estabilidad térmica, en comparación con los polímeros convencionales [19].

Por tanto, con el objetivo de solucionar estos problemas, diferentes estudios apuntan como estrategia la de reforzar el PHBV con otros materiales: polímeros, fibras naturales, nanomateriales como el grafeno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, nanocelulosa, nanoarcillas, nanometales, etc. [20,21].

PREFUERZO MECÁNICO - MATERIALES COMPUESTOS

Los materiales compuestos representan una alternativa con grandes posibilidades en el campo de los biomateriales debido a que posibilitan poder mantener las propiedades del material base de biocompatibilidad y biodegradabilidad, mejorando las mecánicas [22,23]. De este modo, se puede mezclar una matriz polimérica de PHBV con nanomateriales, polímeros, fibras naturales, etc. [24] y al igual que en todo material compuesto, las propiedades finales dependerán de las propiedades de cada componente (matriz y refuerzo), del tipo de composición y la morfología de cada fase [25].

REFUERZO CON OTROS POLÍMEROS

Diversas investigaciones se han centrado en la modificación del biopolímero de PHBV mediante la combinación con otros polímeros, con el objetivo de ampliar sus aplicaciones. De este modo, por ejemplo, se ha realizado la mezcla de PHBV con el polímero sintético termoplástico de ácido poliláctico (PLA), derivado del ácido láctico, originando sistemas inmiscibles con una mínima mejoría de la flexibilidad [26]. Sin embargo, al añadir a esta mezcla aceite de soja epoxidado, el comportamiento mecánico de las mezclas mejora, aumentando su ductilidad, aunque se produce una ligera disminución en la resistencia a la tracción y el módulo de Young [27]. Estudios como los de Jost y Kopitzky [28] muestran que la mezcla de entre un 20 y un 35 % de PHBV con ácido poliláctico (PLA) es una combinación adecuada para lograr altas propiedades de barrera tanto al oxígeno como al vapor de agua, manteniendo la biocompatibilidad del material. En resumen, los resultados apuntan a una mejora de las propiedades mecánicas, la inmiscibilidad y la degradación, al mezclar PHBV con proporciones variables de PLA [29,30].

Por otra parte, materiales obtenidos de la mezcla de polietileno (PE) y 30 % de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) muestran propiedades mecánicas de resistencia a la tracción, módulo de Young y alargamiento a la rotura, comparables a la de los plásticos de uso comercial [31]. Además, el contenido de PHBV redujo la tasa de transmisión de oxígeno y aumentó la velocidad de transmisión de vapor de agua en comparación con la de PE puro. Estas propiedades son muy valoradas en la industria de envasado de alimentos.



Además de los polímeros mencionados, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) se ha reforzado con poliuretano termoplástico (TPU), dando como resultado películas con mayor aumento en la elongación a rotura y mejora en el termoconformado del PHBV [27], y con un derivado de politiofeno carboxilato, el poli(3-tiofeno acetato de etilo) (PTAcEt), obteniéndose películas con gran flexibilidad, resistencia a la manipulación y carácter semiconductor, ya que conservan las propiedades individuales de cada polímero [32]. Además, esta mezcla presenta superficies irregulares y porosas que favorecen el crecimiento, la adhesión celular y no resultan citotóxicas. Estas características hacen que dicha mezcla sea un excelente candidato para su uso en la fabricación de soportes porosos (*scaffolds* en inglés) en ingeniería tisular.

Otra de las estrategias para mejorar las propiedades de los materiales es el desarrollo de estructuras multicapas donde se mezclan materiales con diferentes propiedades en una misma lámina [33]. Esta técnica puede además soslayar la incompatibilidad que tiene el PHBV al no ser miscible con proteínas y polisacáridos, debido a la escasa adhesión interfacial entre las fases de la mezcla [34].

La mezcla de PHBV con almidón, uno de los biopolímeros más abundantes y económicos, obtenido de fuentes renovables y que presenta una baja permeabilidad al oxígeno [35], da lugar a materiales compuestos con mejores propiedades mecánicas y baja permeabilidad al vapor de agua, lo que lo hace más apto como material para la conservación y envasado de alimentos [36].

REFUERZO CON FIBRAS NATURALES

La incorporación de fibras vegetales en compuestos plásticos biodegradables de origen natural, adquiere mayor relevancia cada día debido a ser materiales procedentes de fuentes renovables sostenibles y cuyos productos de desechos podrían ser asimilados y degradados por una gran variedad de microorganismos, evitándose de esta forma la creciente nociva acumulación de residuos en el medio ambiente [37].

El desarrollo de nuevos materiales de este tipo contribuye al avance para conseguir un total reemplazo de los plásticos derivados del petróleo que tanto daño están haciendo al medio ambiente [38,39]. La búsqueda en la obtención de biocompuestos ecológicos basados en recursos renovables ha sido el motor impulsor para diferentes estudios encaminados a reforzar el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) con fibras naturales. De este modo, se han obtenido biocompuestos basados en PHBV que contienen entre un 10 y un 40 % en peso de fibras de madera de Arce [40] y, al evaluar las propiedades del material, se concluyó que el módulo de tracción y flexión de los materiales reforzados con el 40 % en peso de fibra mejoró un 167 % en comparación con el PHBV puro. Los valores del módulo de almacenamiento de estos biocompuestos también mostraron una tendencia creciente en relación con el polímero puro, la temperatura de deflexión se incrementó en un 21 % mientras que el coeficiente de expansión térmica lineal del compuesto de PHBV puro se redujo en un 18 %.

El refuerzo de PHBV con un 30-40 % en peso de fibras de bambú ha mostrado que se producen pocas variaciones en las propiedades termomecánicas y de impacto cuando se varía el contenido de fibra [41]. En este estudio, el módulo de tracción de los materiales con el 40 % en peso de fibra aumenta en 175 % con respecto al PHBV puro y la temperatura de deflexión al calor aumenta en 9 °C. En otro estudio se obtuvieron resultados similares aunque la fuerza de tensión del PHBV disminuyó



con la adición de fibra de bambú [42]. Los investigadores atribuyeron este hecho a la falta de suficiente interacción interfacial entre la fibra de bambú y la matriz polimérica.

Otra de las fibras naturales que se ha utilizado como refuerzo del polímero PHBV es la curauá (*Ananas erectifolius*) bromelia característica de la zona amazónica. Estas fibras tienen propiedades mecánicas similares a las fibras de vidrio, tales como rigidez, resistencia al impacto y flexibilidad [43]. Estas fibras son suaves, ligeras y reciclables [44] y al mezclar PHBV con un 20 % en peso de fibra curauá tratadas con NaOH al 5 %, se encontró un aumento del 30 % en la resistencia a la flexión y del 12 % en la resistencia al impacto, en relación con los compuestos con fibras sin tratamiento [45]. Mediante este método, el tratamiento alcalino favorece una mejor adhesión de las fibras a la matriz polimérica, mejorando significativamente las propiedades mecánicas de los materiales compuestos desarrollados.

Por lo tanto, el refuerzo de PHBV con fibras naturales es una buena alternativa y muy interesante debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad [46,47].

REFUERZO CON NANOMATERIALES - NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinar que ofrece un amplio abanico de soluciones en diferentes ámbitos y sectores tanto científicos como tecnológicos, siendo de gran impacto y relevancia la investigación a nanoescala para la industria biomédica y farmacéutica [48]. De este modo, otra opción para la mejora de propiedades del PHBV es mediante la nanotecnología y así la utilización de nanopartículas como refuerzo. Es conveniente que estas nanopartículas sean biodegradables y provengan de fuentes renovables para poder desarrollar nuevos materiales nanocompuestos de acuerdo con los principios de química verde y desarrollo sostenible. Entre estas nanopartículas que muestran estas características se encuentra el grafeno, óxido de grafeno, grafeno reducido, los nanotubos de carbono y las nanofibras de carbono, celulosa, arcilla, etc.

REFUERZO CON GRAFENO Y SUS DERIVADOS

Otra forma de mejorar las propiedades del PHBV es mediante el exitoso nanomaterial grafeno (Nobel de 2010), que está formado por átomos de carbono, elemento básico en la composición de los seres vivos, que se distribuyen formando hexágonos en forma de láminas del grosor de un átomo, lo que le otorga gran flexibilidad [49]. Este material bidimensional es muy estable debido a que los enlaces entre las moléculas son muy resistentes, y se ha demostrado que es biocompatible y que mejora la adherencia celular de osteoblastos y células mesenquimales [50], lo que lo hace muy prometedor para aplicaciones biomédicas. Posee una resistencia mecánica doscientas veces superior a la del acero, lo que junto a las propiedades ya comentadas lo convierten en un excelente material de refuerzo de otros materiales con propiedades mecánicas limitadas [51]. Además, se ha demostrado su capacidad antibacteriana y la de sus derivados frente a distintas especies bacterianas [52].

En la familia del grafeno se encuentran nanomateriales surgidos de modificaciones físicas o químicas del grafeno [21]. De este modo, mediante tratamientos de oxidación o reducción del grafeno, se puede producir óxido de grafeno o grafeno reducido, respectivamente. La importancia de la conver-



sión del grafeno en otros compuestos radica en que algunas investigaciones han mostrado en algunas aplicaciones una cierta citotoxicidad del grafeno puro, que podría inducir a la apoptosis celular y a una disminución de la adhesión celular [53].

El grafeno proporciona la posibilidad de poder reforzar el PHBV, actuando como agente de nucleación para la cristalización, mejorando sustancialmente las propiedades mecánicas de los materiales compuestos y aumentando la temperatura de máxima degradación. Además, la presencia de grafeno no interfiere en la biodegradabilidad del PHBV, aunque podría restringir la movilidad de las cadenas de PHBV en el proceso de crecimiento de cristales [54,55].

REFUERZO CON NANOTUBOS DE CARBONO Y NANOFIBRAS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono NTC (o CNT en inglés) fueron descubiertos en 1991 por Sumio Iijima [56] y son láminas de grafito enrolladas en forma de tubos abiertos o cerrados. Pueden ser agrupados en dos tipos principales: nanotubos de carbono de capa única y nanotubos multicapa [57].

Los NTC son sistemas unidimensionales únicos con propiedades mecánicas, térmicas, eléctricas y electrónicas excepcionales que les permiten poseer gran aplicabilidad en diferentes campos de nanotecnología [58,59].

Los nanotubos de carbono se han insertado en la matriz del PHBV para mejorar sus bajas propiedades mecánicas. De este modo, los NTC de paredes múltiples han mostrado una efectiva mejora en la cristalización y la nucleación del PHBV puro, además de conseguir mejorar las propiedades mecánicas, termomecánicas y de conductividad eléctrica de los nanocompuestos desarrollados [60-63]. Además, estos nanocompuestos de NTC/PHBV mostraron una menor absorción de agua y permeabilidad al vapor de agua [64].

Por otra parte, la adición de los nanotubos de carbono multicapas ha conseguido un material resultante más hidrófilo y no citotóxico para las líneas celulares L929 de fibroblastos murino [65]. Además, la incorporación de nanotubos de carbono de paredes múltiples –además de mejorar en gran medida las propiedades mecánicas del poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)– permite una mayor adherencia, proliferación y diferenciación de células madre de médula ósea sobre el nanocompuesto resultante, lo que indica que la presencia de NTC tiene un efecto aparentemente positivo sobre el PHBV para favorecer la osteogénesis, lo cual tendría suma importancia en la recuperación de defectos óseos causados por enfermedades [66].

Un buen conocimiento del efecto de los nanotubos de carbono en el proceso de biodegradación del nanocompuesto PHBV-NTC es esencial para su posible implementación. De este modo, investigaciones realizadas en esta línea sobre la biodegradación en el suelo de este nanocompuesto apuntan que los NTC tienen el efecto de aumentar la resistencia al proceso de biodegradación cuando se agrega a matrices poliméricas de biopolímero de PHBV [67]. Esta biodegradación varía según la concentración de NTC en el nanocompuesto, lo que indica que los NTC pueden utilizarse para regular el tiempo de biodegradación según la cantidad adicionada.

Las nanofibras de carbono (NFC, o CNF en inglés), designadas en ocasiones como nanofilamentos de carbono o nanofibras gráficas, se ubican entre los nanotubos de carbono y las fibras de carbono comerciales. Son estructuras de carbono gráficas en las cuales los átomos de carbono se agrupan en estructuras filiformes con diámetros que varían desde 30 a 300 nm y una longitud de entre 50 y



100 micrómetros, con una separación entre los planos de grafito de 0,335-0,342 nm. De acuerdo con su estructura altamente grafitica, sus características morfológicas y sus excepcionales propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas [68,69], las nanofibras de carbono constituyen un excelente nanomaterial de refuerzo del PHBV con un potencial excelente como material tecnológico aunque se han realizado pocos estudios sobre esto hasta la fecha. Sin embargo, la combinación de la incorporación de CNF con el refuerzo conseguido mediante otros polímeros, sí que se ha propuesto como alternativa de refuerzo para el PHBV. De esta forma, se ha reforzado el PHBV con otro polímero sintético biodegradable, la policaprolactona (PCL), y la incorporación de CNF o NTC consiguiendo nanocompuestos con conductividad eléctrica, térmica y con mejores propiedades de barrera a los gases [70].

REFUERZO CON NANOCELULOSA

Diferentes estudios señalan a la nanocelulosa de fibras naturales como una excelente elección para el refuerzo del PHBV debido a sus propiedades únicas, entre las que destacan: alto módulo de Young, estabilidad dimensional, bajo coeficiente de expansión térmica, potencial de refuerzo excepcional y transparencia [71]. Además de sus excelentes propiedades mecánicas, la nanocelulosa presenta baja densidad y la presencia de los grupos hidroxilos superficiales facilita el anclaje de grupos químicos específicos que mejoran la compatibilidad con otros polímeros [72].

La nanocelulosa se presenta normalmente mediante dos tipos de morfología: los nanocristales de celulosa (NCC, o CNC en inglés) y las nanofibrillas de celulosa (NFC, o CNF en inglés). Ambos tipos de nanocelulosa mejoran la estabilidad térmica del PHBV y evidencian los efectos del refuerzo en el material [73]. Sin embargo, los NCC actúan como un mejor agente de nucleación, debido a que los cristales se distribuyen de forma homogénea en la matriz polimérica, y con 1 % en peso de NCC el compuesto de PHBV mostró propiedades mecánicas óptimas [74,75]. Por tanto, los materiales compuestos de NCC y PHBV muestran una disminución en la cristalinidad con respecto al PHBV puro, mientras que las medidas de ángulo de contacto muestran un aumento de hidrofiliidad. Las mejoras significativas de propiedades mecánicas pueden atribuirse a las interacciones por enlaces de hidrógeno entre los nanocristales de celulosa y la matriz de PHBV [76].

Por otra parte, la adición de celulosa nanofibrilada como refuerzo del poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) consigue producir materiales compuestos completamente biodegradables PHBV/NFC, con un aumento casi del doble del módulo de tracción. Sin embargo, un alto contenido de NFC también puede conducir a una mayor degradación térmica de la matriz de PHBV [77].

REFUERZO CON NANOARCILLAS

El desarrollo de nanocompuestos de PHBV reforzados con arcillas constituye una gran alternativa respetuosa con el medio ambiente. Esta opción de refuerzo puede potenciar en gran medida algunas de las propiedades de los materiales como son la estabilidad térmica, conductividad, propiedades mecánicas, propiedades de barrera de gases y vapores, etc., ya que al incorporar nanoarcillas a la matriz polimérica de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), el estado de dispersión de la arcilla

desempeña un importante papel, crucial para la mejora del rendimiento del material, como el aumento del módulo de Young [78].

Además, se ha demostrado que las arcillas organomodificadas bien dispersas mejoran considerablemente las diferentes propiedades de la matriz de PHBV puro [79].

REFUERZO CON NANOMETALES

Otras alternativas dentro de las estrategias nanotecnológicas para reforzar el PHBV se basan en la incorporación de nanometales en la matriz del polímero. De este modo, se han preparado nanocompuestos de PHBV con nanopartículas de disulfuro de tungsteno, presentando una buena dispersión de las nanopartículas de disulfuro de tungsteno en la matriz polimérica. Por tanto se consigue mejorar significativamente la estabilidad térmica del polímero [80]. Además, en este estudio se comprobó un eficiente efecto de nucleación comparable con los obtenidos con otros nanomateriales de refuerzos o agentes de nucleación específicos. El bisulfuro o disulfuro de tungsteno es un material con excelentes propiedades eléctricas, ópticas y tribológicas [81-83]. Sin embargo, el tungsteno, también conocido como wolframio, es un metal escaso en la corteza terrestre, y se encuentra en forma de óxido y de sales en ciertos minerales [84], a diferencia de otras alternativas de refuerzo que provienen de fuentes renovables.

Otro estudio reciente presenta películas basadas en poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) reforzado con nanotubos de carbono, partículas de nitruro de boro y triquititas de borato de aluminio [85]. Mediante este tipo de nanorrefuerzos se consigue aumentar la temperatura de descomposición, mejorando así la resistencia a la degradación térmica del nanocompuesto a temperaturas elevadas. Sin embargo, las nanopartículas de borato de aluminio mostraron el aumento más significativo, además de lograr mejorar el rendimiento mecánico del PHBV puro.

Otra alternativa de refuerzo consiste en la incorporación de partículas de nitruro de boro mediante fundido del PHBV [86]. Mediante este proceso se consigue disminuir la permeabilidad mejorando las propiedades barrera a los gases y aumentar la cristalinidad del PHBV puro. El nitruro de boro es un compuesto binario isoelectrónico que consta de proporciones iguales de boro (B) y nitrógeno (N), y presenta formas estructurales homólogas a las del carbono [87]. Las películas de nitruro de boro presentan excelentes características: elevada dureza, resistencia al ataque químico, comportamiento aislante, alta transparencia, etc. [88].

Otros estudios demuestran que la adición de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) consigue reforzar el PHBV, sin afectar a la alta tasa de biodegradación del PHBV y permitiendo el uso de estos nanocompuestos en aplicaciones que requieran mayor resistencia mecánica pero velocidades de biodegradación similares a las del PHBV puro [89].

CONSIDERACIONES FINALES

Las características de biocompatibilidad y biodegradabilidad del PHBV reforzado lo convierten en un excelente material, con amplias posibilidades de aplicación en una gran variedad de sectores. Las



excelentes propiedades del PHBV de reabsorción, así como su origen biológico, baja citotoxicidad, piezoelectricidad y termoplasticidad, lo hacen muy prometedor como biomaterial óptimo en aplicaciones biomédicas [90]. Por ejemplo, se ha propuesto su uso en la fabricación de materiales biomédicos, como los *stents* cardiovasculares [91], sistemas de liberación de fármacos, suturas quirúrgicas absorbibles y embalajes médicos [92,93].

Otro de los campos prometedores de aplicación del PHBV es el de la ingeniería de tejidos, en la elaboración de parches biodegradables, biosensores y soportes porosos biodegradables para el tratamiento de los defectos óseos ocasionados por enfermedades o lesiones, donde los tratamientos convencionales son ineficaces [94-97].

En otros sectores de la industria fuera del ámbito biomédico, existe un amplio abanico de aplicaciones que van desde objetos desechables de uso cotidiano, como son las bolsas, envases, embalajes, productos cosméticos y de higiene (por ejemplo, toallas, pañales o pañuelos), hasta productos que requieren una alta resistencia mecánica, como por ejemplos son los cascos para ciclistas, tableros con cableados impresos para electrónica o diferentes paneles para automóviles, etc. [98,99].

En el caso de la industria alimentaria, el PHBV es muy prometedor en la fabricación de envases de alimentos biodegradables, incluidas tapas y cierres [24,100].

Sin embargo, a pesar de las grandes expectativas generadas con el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), su uso está limitado por su elevado coste de producción. En este sentido, la comunidad científica internacional está trabajando en tres áreas principales: encontrar nuevas cepas microbianas capaces de acumular mayores niveles de PHB, desarrollar rutas fermentativas mucho más eficientes con fuentes renovables como sustrato, y disminuir los costes del proceso de extracción del polímero [101], con el objetivo de que en el futuro este polímero biodegradable, solo o combinado con otros materiales, pueda utilizarse en infinidad de aplicaciones industriales debido a sus excelentes propiedades.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda del proyecto interno de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir PRUCV2018-231-001 y el proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad MAT2015-69315-C3-1-R.

REFERENCIAS

- [1] Duffo G. Materiales y materias primas. Biomateriales. 2011;8.
- [2] Ramos ÁÁA, Almario MEM. Estudio electroquímico de biopolímeros conductores de almidón de yuca (cassava) elaborados a diferente pH. In 2017., in: Memorias III Semin. Int. Ciencias Ambient., SUE-Caribe. Colomb. 2017.
- [3] Khanna, AK, Srivastava S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochem. 2005;40:607-19.



- [4] Sudesh D, Abe K, Yoi H. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 2000;25:1503-55.
- [5] Lee S. Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.* 1996;14:431-38.
- [6] Braunegg KF, Lefebvre G, Genser G. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 1998;65:127-61.
- [7] Serafim LS, Lemos PC, Oliveira R, Reis MAM. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol, Bioeng.* 2004.
- [8] González García JA, Contreras Y, Carlos M, González Reynoso J, Córdova López O. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano., *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2013;29:77-115.
- [9] Anderson E, Dawes AJ. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 1990;54:450-72.
- [10] Kushwah BS, Kushwah AVS, Singh V. Towards understanding polyhydroxyalkanoates and their use, *J. Polym. Res.* 2016;23.
- [11] Bugnicourt E, Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym.* 2014;8:791-808.
- [12] Steinbüchel A. *Biopolymers*, Wiley-VCH. 2001.
- [13] Guo-Qiang C, Qiong W. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials.* 2005;26:6565-78.
- [14] Wang, L, Du J, Cao D, Wang Y. Recent Advances and the Application of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) as Tissue Engineering Materials. *J. Macromol. Sci. Part A.* 2013;50:885-93. doi: 10.1080/10601325.2013.802540.
- [15] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, Canada. 2012.
- [16] Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007;59:207-33.
- [17] Modi SJ, Cornish K, Koelling K. Vodovotz Y. Fabrication and improved performance of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) for packaging by addition of high molecular weight natural rubber. *J. Appl. Polym. Sci.* 2016;133:9.
- [18] Oner M, İlhan B. Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biocomposites with reinforcement by hydroxyapatite using extrusion processing. *Mater. Sci. Eng. C-Materials Biol. Appl.* 2016;65:19-26.
- [19] Ha, C. WC-P. In *polymer science*, undefined 2002, Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends, Elsevier (n.d.).
- [20] Lagaron A, López-Rubio JM. Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies. *Trends Food Sci. Technol.* 2011;22:611-17.
- [21] Felli E, Martínez EV, Fernández AJ, Aroca AS. El grafeno y sus derivados en la ingeniería tisular. *Nereis.* 2016;8:71-81.



- [22] Tate D, Akinola JS, Kabakov AT. Bio-based nanocomposites: An alternative to traditional composites. 2009.
- [23] Petersson K, Kvien L, Oksman I. Structure and thermal properties of poly (lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. *Compos. Sci. Technol.* 2007;67:2535-44.
- [24] Landa-Salgado V, Cruz-Monterrosa P, Hernández-Guzmán RG, Reséndiz-Cruz FJ. Nanotecnología en la industria alimentaria: bionanocompuestos en empaques de alimenticios. *Agroproductividad.* 2017;10.
- [25] Morales Mendoza NJ. Síntesis de nanocargas de base carbono y su aplicación al desarrollo de bio-nanocompuestos, Universidad de Buenos Aires. 2014.
- [26] Gerard T, Budtova T. Morphology and molten-state rheology of polylactide and polyhydroxyalkanoate blends. *Eur. Polym. J.* 2012;48:1110-17.
- [27] González Ausejo D, Boronat J, Gámez Pérez T, Cabedo Mas J, García García L. Mejora de las propiedades mecánicas y compatibilidad de mezclas de PHBV/PLA con plastificantes comerciales de origen bio. 2015.
- [28] Jost V, Kopitzky R. Blending of Polyhydroxybutyrate-co-valerate with Polylactic Acid for Packaging Applications - Reflections on Miscibility and Effects on the Mechanical and Barrier Properties. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2015;29:221-46. doi: 10.15255/CABEQ.2014.2257.
- [29] Modi Y, Koelling S, Vodovotz K. Assessing the mechanical, phase inversion, and rheological properties of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate](PHBV) blended with poly-(l-lactic acid)(PLA). *Eur. Polym. J.* 2013;49:3681-690.
- [30] Krikštanavičienė V, Stanys K, Jonaitienė S. Comparative Investigation of Mechanical-Physical Characteristics of Biodegradable and Non-Degradable Yarns. *Autex Res. J.* 2014;14:61-72.
- [31] Norrrahim H, Ariffin MNF, Hassan H, Ibrahim MA, Nishida NA. Performance evaluation and chemical recyclability of a polyethylene/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blend for sustainable packaging. *RSC Adv.* 2013;3:24378-88.
- [32] Recco FH, Floriano MS, Tada AC, Lemes DB, Lang AP, Cristovan R. Poly (3-hydroxybutyrate-co-valerate)/poly (3-thiophene ethyl acetate) blends as a electroactive biomaterial substrate for tissue engineering application. *RSC Adv.* 2016;6:25330-38.
- [33] Martucci RA, Ruseckaite JF. Three-Layer Sheets Based on Gelatin and Poly(lactic Acid), Part 1: Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 2010;118:3102-10.
- [34] Fabra JM, López-Rubio MJ, Lagaron A. On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts. *Food Hydrocoll.* 2014;39:77-84.
- [35] Dole N, Joly P, Espuche C, Alric E, Gontard I. Gas transport properties of starch based films. *Carbohydr. Polym.* 2004;58:335-43.
- [36] Janssen L, Moscicki L. Thermoplastic starch: a green material for various industries. Weinheim WILEY-VCH Verlag GmbH Co. 2009;78:3-16.
- [37] Raquez P, Deléglise JM, Lacrampe M, Krawczak MF. Thermosetting (bio) materials derived from renewable resources: a critical review. *Prog. Polym. Sci.* 2010;35:487-509.
- [38] Sykacek N, Hrabalova E, Frech M, Mundigler H. Extrusion of five biopolymers reinforced with increasing wood flour concentration on a production machine, injection moulding and mechanical performance. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 2009;40:1272-82.



- [39] John S, Thomas MJ. Biofibres and biocomposites. *Carbohydr. Polym.* 2008;71:343-64.
- [40] Singh AK, Mohanty S. Wood fiber reinforced bacterial bioplastic composites: Fabrication and performance evaluation. *Compos. Sci. Technol.* 2007;67:1753-63.
- [41] Singh H, Mohanty S, Sugie AK, Takai T, Hamada Y. Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 2008;39:875-86.
- [42] Sahari SM, Sapuan J. Natural fibre reinforced biodegradable polymer composites. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2011;30:166-74.
- [43] Monteiro JR, Aquino SN, Lopes FPD, Carvalho EA, d'Almeida JRM. Comportamento mecânico e características estruturais de compósitos poliméricos reforçados com fibras contínuas e alinhadas de curauá. *Rev. Matéria.* 2006;11: 197-203.
- [44] de Lima JCK, Pereira BS, Lenz FM, de Verney DM. Influência da fibra de curauá em compósitos cimentícios: verificação da resistência à flexão e da resistência à compressão. *Rev. Iniciação Científica Da ULBRA.* 2013;1:9.
- [45] Beltrami AJ, Cristine Scienza LVR, Zattera L. Effect of the alkaline treatments of Curauá fiber on the properties of biodegradable matrix composites. *Polímeros.* 2014;24:388-94.
- [46] Berthet N, Angellier-Coussy MA, Machado H, Hilliou D, Staebler L, Vicente A, Gontard A. Exploring the potentialities of using lignocellulosic fibres derived from three food by-products as constituents of biocomposites for food packaging. *Ind. Crops Prod.* 2015;69:110-22.
- [47] Berthet N, Angellier-Coussy MA, Chea H, Guillard V, Gastaldi V, Gontard E. Sustainable food packaging: valorising wheat straw fibres for tuning PHBV-based composites properties. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 2015;72:139-47.
- [48] Fúnez PM, Duaso AA, Gómez AIH. Nanotecnología en la industria alimentaria I: aplicaciones/ Nanotechnology in the food industry I: applications. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* 2016;10:1.
- [49] Fuchs MO, Goerbig JN. Introduction to the physical properties of graphene. *Lecture notes. Carbon N.Y.* 2008;472:8539.
- [50] Kalbacova M, Broz M, Kong A, Kalbac J. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon N.Y.* 2010;48:4323-29.
- [51] Zhu RS, Murali Y, Cai S, Li W, Suk X, Potts JW, Ruoff JR. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Adv. Mater.* 2010;22:3906-24.
- [52] Liu Y, Zeng S, Hofmann TH, Burcombe M, Wei E, Jiang J, Chen R. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS Nano.* 2011;5:6971-80.
- [53] Zhang W, Nayak Y, Hong TR, Cai H. Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications. *Nanoscale.* 2012;4:3833-42.
- [54] Sridhar H, Lee V, Chun I, Park HH. Graphene reinforced biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) nano-composites. *Express Polym. Lett.* 2013;7.
- [55] Wang Q, Zhang BJ, Zhang YJ, Gou JQ, Wang QT, Chen ZB, Gu P. Crystallization behavior, thermal and mechanical properties of PHBV/graphene nanosheet composites. *Chinese J. Polym. Sci.* 2013;31:670-78.
- [56] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* 1991;354:56.



- [57] Domingo G, Santoro C. Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono. *Opt. Pura Apl.* 2007;40:175-86.
- [58] Liang H, Bockrath W, Bozovic M, Hafner D, Tinkham JH, Park M. Fabry-Perot interference in a nanotube electron waveguide. *Nature.* 2001;411:665-69.
- [59] Avouris MS, Dresselhaus P, Dresselhaus G. Carbon nanotubes: synthesis, structure, properties and applications. 2000.
- [60] Shan MF, Gong GF, Chen X, Chen WP, Zhu L. Effect of multi-walled carbon nanotubes on crystallization behavior of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Colloid Polym. Sci.* 2011;289:1005-14.
- [61] Vidhate NA, Innocentini-Mei S, D'Souza L. Mechanical and electrical multifunctional poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) - multiwall carbon nanotube nanocomposites. *Polym. Eng. Sci.* 2012;52:1367-74.
- [62] Yu XG, Yao HY, Qin JM, Liu ZY, Yang L. Comparison of covalent and noncovalent interactions of carbon nanotubes on the crystallization behavior and thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *J. Appl. Polym. Sci.* 2013;130:4299-307.
- [63] Cristóvan AP, Machado FH, Tada JPB, Durán DB, Lemes N. Effect of MWCNT functionalization on thermal and electrical properties of PHBV/MWCNT nanocomposites. *J. Mater. Res.* 2015;30.
- [64] Yu JM, Qin HY, Sun ZY, Yao B, Yang XG. Reinforcement of transparent poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by incorporation of functionalized carbon nanotubes as a novel bionanocomposite for food packaging. *Compos. Sci. Technol.* 2014;94:96-104.
- [65] Ma R, Zheng Y, Wei Y, Song G, Hu W, Yang T, Xue H. Processing, structure, and properties of multiwalled carbon nanotube/poly (hydroxybutyrate-co-valerate) biopolymer nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* 2012;125.
- [66] Li M, Yang JL, Loo Z, Xiao WT, Zhang X, Cheung D, Wang MN. In vitro and in vivo biocompatibility of multi-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposite for bone defects repair. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2014;29:350-67.
- [67] Oyama AP, Montagna IC, Montanheiro LS, Lemes TL. Evaluating the biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/carbon nanotube nanocomposites in soil, in: BCCM-3 - Brazilian Conf. Compos. Mater, Gramado, RS. 2016.
- [68] Louie SG. Electronic properties, junctions, and defects of carbon nanotubes, *Carbon Nanotub.* 2001:113-45.
- [69] CM. Springer Berlin Heidelberg (Sánchez, Producción industrial y aplicaciones de nanofibras de carbono. Informe técnico, Madrid, España Grup. Antolín Ing. S.A.). 2005.
- [70] Sánchez-García MD, Lagaron JM, Hoa SV. Effect of addition of carbon nanofibers and carbon nanotubes on properties of thermoplastic biopolymers. *Compos. Sci. Technol.* 2010;70:1095-105. doi: 10.1016/j.compscitech.2010.02.015.
- [71] Kim J, Shim JH, Kim BS, Lee HS, Min YJ, Jang SK, Kim D. Review of nanocellulose for sustainable future materials. *Int. J. Precis. Eng. Manuf. Technol.* 2015;2:197-213.
- [72] Moon J, Martini RJ, Nairn A, Simonsen J, Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 3941-3994.



- [73] Jun Z, Guomin D, Mingzhu Z, Leilei P, Dagang Z, Rui L. Crystallization and mechanical properties of reinforced PHBV composites using melt compounding: Effect of CNCs and CNFs. *Carbohydr. Polym.* 2017;168:255-62.
- [74] Ten MP, Bahr E, Li DF, Jiang B, Wolcott L. Effects of cellulose nanowhiskers on mechanical, dielectric, and rheological properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhiskey composites. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012;5:2941-51.
- [75] Yu ZHOU, Qin HY, Zhe ZY. Cellulose nanocrystals as green fillers to improve crystallization and hydrophilic property of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 2011;21:478-84.
- [76] Yu Z, Qin HY, Liu ZY, Chen YN, Liu L, Zhou N. Simultaneous improvement of mechanical properties and thermal stability of bacterial polyester by cellulose nanocrystals. *Carbohydr. Polym.* 2012;89:971-78.
- [77] Srithep S, Ellingham Y, Peng T, Sabo J, Clemons R, Turng C, Pilla LS. Melt compounding of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/nanofibrillated cellulose nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* 2013;98:1439-49.
- [78] Carli RS, Crespo LN, Mauler JS. PHBV nanocomposites based on organomodified montmorillonite and halloysite: the effect of clay type on the morphology and thermal and mechanical properties. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 2011;42:1601-08.
- [79] Bittmann C, Bouza B, Barral R, Díez L, Ramirez J. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/clay nanocomposites for replacement of mineral oil based materials. *Polym. Compos.* 2013;34:1033-40.
- [80] Silverman G, Naffakh T, Marco M, Ellis C. Morphology and thermal properties of biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/tungsten disulphide inorganic nanotube nanocomposites. *Mater. Chem. Phys.* 2016;170:145-53.
- [81] Irtegov A, An Y, Vinatier VV, Sochugov P, Zakharov N. Properties of WS₂ Films Prepared by Magnetron Sputtering from a Nanostructured. *Adv. Mater. Res.* 2014;872:197-200.
- [82] Dai TONG, Wei MJ, Zhou CB, Min KS, Hou ZHU, Lin HJ, Xin SS. Properties of W/DLC/W-S-C composite films fabricated by magnetron sputtering. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 2015;25:3002-11.
- [83] Wu ZY, Li JS, Zhang JF, Qian L. Effects of environment on dry sliding wear behavior of silver-copper based composites containing tungsten disulfide. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 2017;27:2202-13.
- [84] Correa HEDJS. Nomenclatura química. 2014.
- [85] Zhao C., Jin N., Xue X., Zhang Y., Zhang X., Lin Y., Tang J. Processing and Characterizations of Nanofiller-Modulated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Composites. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 2016;55:663-71.
- [86] Öner M, Keskin M, Kızıl G, Pochat-Bohatier G, Bechelany C. Development of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/boron nitride bionanocomposites with enhanced barrier properties. *Polym. Compos.* 2017;10:24603.
- [87] Errandonea D. Más duro que el diamante. *Investig. Cienc.* 2009;75.



- [88] Essafti A. Efecto de la temperatura de deposición en las características estructurales y ópticas de películas delgadas de nitruro de boro obtenidas por CVD. *Boletín La Soc. Española Cerámica Y Vidr.* 2007;46:127-30.
- [89] Braga FH, da Silva NF, Arantes AP, Lemes TM, Cristovan AP. Physical-chemical properties of nanocomposites based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and titanium dioxide nanoparticles *Mater. Res. Express.* 2017.
- [90] K Wu, J Xue, K Li, H Sun, J Liu. Improvement of PHBV scaffolds with bioglass for cartilage tissue engineering. *PLoS One.* 2013;8:e71563.
- [91] Smith DA, Lamprou JR. Polymer coatings for biomedical applications: a review. *Trans. IMF.* 2014;92:9-19.
- [92] Vilos S, Morales C, Solar FA, Herrera PA, Gonzalez-Nilo NS, Aguayo FD, Kato DA. Paclitaxel-PHBV nanoparticles and their toxicity to endometrial and primary ovarian cancer cells, *Biomaterials.* 2013;34:4098-108.
- [93] Riekes HK., Junior MK., Pereira LR., Borba RN., Fernandes PA., Stulzer D. Development and evaluation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone microparticles of nimodipine. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19:7264-270.
- [94] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;2:2529-43.
- [95] AR Li, W Ding, Y Rai, R Roether, JA Schubert, Boccaccini DW. Preparation and characterization of PHBV microsphere/45S5 bioactive glass composite scaffolds with vancomycin releasing function. *Mater. Sci. Eng. C.* 2014;41:320-28.
- [96] Sultana M, Wang N. PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation. *Biofabrication*2. 2012;41:5003.
- [97] Gheibi AA, Khoshnevisan A, Ketabchi K, Derakhshan N, Babadi MA. Application of Electrospun Nanofibrous PHBV Scaffold in Neural Graft and Regeneration: A Mini-Review. *Nanomedicine Res. J.* 2016;1:107-11.
- [98] Patel E, Bastioli M, Marini C, Würdinger L. Environmental assessment of bio-based polymers and natural fibres, *Netherlands Utr. Univ.* (n.d.).
- [99] Philip I, Keshavarz S, Roy T. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007;82:233-47.
- [100] IN. Guerrero, A. Carvalho, CB. Madrona, GS. Cestari, LA. Scapin, Prado MRS. Envases alternativos biodegradables y activos con aceites esenciales para productos cárnicos. *Eurocarne.* 2015:238.
- [101] Satyanarayana F., Arizaga KG, Wypych GG. Biodegradable composites based on lignocellulosic fibers-An overview. *Prog. Polym. Sci.* 2009;34:982-1021.



Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	95-98	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	-------	---	-------------------	----------------

Tables for cumulative probability of the ex-Gaussian distribution

Tablas de probabilidad acumulada para la distribución ex-Gaussiana

Fecha de recepción y aceptación: 21 de septiembre de 2017, 19 de diciembre de 2017

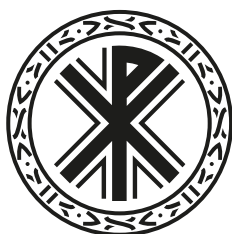
C. Moret-Tatay^{1*}, D. Gamermann² and P. Fernández de Córdoba³

¹ Facultad de Psicología, Magisterio y Ciencias de la Educación. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Física. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Departamento de Matemática Aplicada. Universitat Politècnica de València.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Psicología, Magisterio y Ciencias de la Educación. Calle Guillem de Castro, 175. 46008 Valencia. España. E-mail: mariacarmen.moret@ucv.es



ABSTRACT

The ex-Gaussian distribution provides a good fit to multiple empirical positive skewed distributions, such as reaction time. This fit is a useful tool when estimating confidence intervals and determining hypothesis testing for skewed variables. In order to create tables for significance testing, the ex-Gaussian distribution was parametrized in terms of its average, standard deviation and a new skewness parameter $\lambda = \sqrt[3]{(t/2)}$. To this end, x was standardized in order to normalize the ex-Gaussian distribution for average of 0 and standard deviation of 1. In this way, the distribution has only one free parameter ($0 \leq \lambda < 1$).

KEYWORDS: *ex-Gaussian distribution, significance testing, statistical tables.*

RESUMEN

La distribución ex-Gaussiana proporciona un buen ajuste a múltiples distribuciones asimétricas positivas, como el tiempo de reacción. Este ajuste es una herramienta útil para estimar los intervalos de confianza y determinar las pruebas de hipótesis para las variables asimétricas. A los efectos de desarrollar tablas para la prueba de significación, la distribución ex-Gaussiana fue parametrizada en términos promedio, desviación estándar y un nuevo parámetro de asimetría $\lambda = \sqrt[3]{(t/2)}$. Para este fin, x se estandarizó, tratando de normalizar la distribución ex-Gaussiana para un promedio 0 y desviación estándar 1. De este modo, la distribución presenta un solo un parámetro libre ($0 \leq \lambda < 1$).

PALABRAS CLAVE: *distribución ex-Gaussiana, prueba de significación, tablas estadísticas.*

The ex-Gaussian fit has turned into one of the preferable options when dealing with positive skewed distributions in behavioral sciences (Gu, Gau, Tzang y Hsu, 2013; Luce, 1986; Moreno-Cid et al., 2015; Moret-Tatay et al., 2017). The characterization of response latencies to an ex-Gaussian fit, generally is employed to examine the positively skewed shapes of most Reaction time distributions and it can be quantified using three parameters: μ (the mean of the normal component), σ (the standard deviation of the normal component), and τ (both the mean and standard deviation of the exponential component). This technique provides a good fit to multiple empirical data, such as reaction times. In this work, we present statistical tables for cumulative probability of the ex-Gaussian distribution.

In order to create tables for the ex-Gaussian distribution, a parametrization was carried out in terms of average M , standard deviation S and a new skewness parameter $\lambda = \sqrt[3]{(\tau/2)}$. Finally, the point x was standardized ($z = (x - M) / S$) in order to normalize the ex-gaussian distribution for average 0 and standard deviation 1 (in terms only of its asymmetry):

$$f_{\lambda}(z) = \frac{1}{2\lambda} e^{\frac{1}{2\lambda^2}(-2z\lambda - 3\lambda^2 + 1)} \operatorname{erfc}\left(\frac{-z + \frac{1}{\lambda} - 2\lambda}{\sqrt{2}\sqrt{1 - \lambda^2}}\right).$$

METHOD

The calculations were performed in a computer running under linux operational system with a processor icore7 (four kernels) and 6Gb of RAM memory. The integrations were performed by a python script programmed by the authors. The script used a slightly modified gaussian quadrature method: the whole integration interval was divided in 1000 smaller intervals and the integral over each one of these intervals was performed via the 20 point gaussian quadrature method. In the numerical integral the minus infinity was substituted by the value -8 (8 standard deviations from the average). At this point (8), for any value of λ the value of the ex-Gaussian function is smaller than the floating point precision of the computer (meaning that -8 is as good as minus infinity for practical numerical integration).

RESULTS

How to read the tables

The tables present the area of the left tail for a given z point for an ex-Gaussian with asymmetry given by the λ parameter. In order to use the tables, one should first know the three parameters defining a particular ex-Gaussian probability density. There are two different sets of three parameters that one must know: the ex-Gaussian components parameters (μ , σ and τ) and the statistical parameters (M , S and t or λ). The parameter λ (assymetry) indicates which table one should consult and knowing the point x one is interested in, one calculates the table point z he must consult via $z = (x - M) / S$.



The point z should be looked for in the tables first rows and columns, in the following WAY: the point z is the result of summing up the first number in a column with the first number in a row. For example, if one is interested in the point -1.78 , the first row should indicate the number -1.8 and the first column 0.02 . For example, considering the following extract from the table:

z	0.00	...	0.04	...	0.09
-2.0	0.0000	...	0.0000	...	0.0000
$\vdots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$
-1.1	0.0308	...	0.0419	...	0.0593
$\vdots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$
0.6	0.7964	...	0.8045	...	0.8143
$\vdots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$

It is possible to read that for $z = -1.06$ one has $F(z) = 0.0419$ while for $z = 0.64$, $F(z) = 0.8045$. This means that for the particular value of λ in this table, 4.19% of the distribution is below the point $z = -1.06$ and 80.45 % is below the point $z = 0.64$. Tables are attached in the following Appendix: <http://meblaboratory.blogspot.it/p/response-latency-components.html>.

CONCLUSIONS

The ex-Gaussian fit has turned into one of the preferable options when dealing with positive skewed distributions. This technique provides a good fit to multiple empirical data, such as reaction times (a popular variable in Psychology due to its sensibility to underlying cognitive processes). Thus, in this work we present statistical tables for cumulative probability of the ex-Gaussian distribution. This work provides tables for significance testing with an ex-Gaussian distribution, which were currently not available in the literature. Their potential advantage are related to significance testing in terms of determining the Type I error %.



REFERENCES

- [1] Gu SLH, Gau SSF, Tzang SW, Hsu WY. The ex-Gaussian distribution of reaction times in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Research in developmental disabilities*. 2013;34(11):3709-3719.
- [2] Luce RD. *Response times: Their role in inferring elementary mental organization* (No. 8). Oxford University Press on Demand; 1986.
- [3] Moreno-Cid A, Moret-Tatay C, Irigaray TQ, Argimon II, Murphy M, Szczerbinski M, ... & Fernández P. The role of age and emotional valence in word recognition: an ex-gaussian analysis. *Studia Psychologica*. 2015;57(2):83.
- [4] Moret-Tatay C, Lemus-Zúñiga LG, Tortosa DA, Gamermann D, Vázquez-Martínez A, Navarro-Pardo E, Conejero JA. Age slowing down in detection and visual discrimination under varying presentation times. *Scandinavian journal of psychology*. 2017;58(4):304-311.



<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	99-105	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	--------	---	-------------------	----------------

Antioxidant capacity of 5-Fluorouracile and new fluorinated uracil derivatives

Capacidad antioxidante del 5-fluorouracilo y nuevos derivados uracilofluorados

Fecha de recepción y aceptación: 28 de octubre de 2017, 1 de febrero de 2018

C. Casanova Sorní¹, M. L. Moreno Sancho^{2*}, M. Miranda Sanz¹, I. Almansa Frías¹, A. Falcó Montesinos¹, A. Navarro Moreno², S. Fustero Lardies^{3,4*}, S. Mérida Donoso¹ and V. M. Villar Amigó¹

¹ Department of Biomedical Sciences. School of Health Sciences. Universidad Cardenal Herrera-CEU. CEU Universities. Av. Seminario, s/n. 46113 (Alfara del Patriarca) Valencia. Spain.

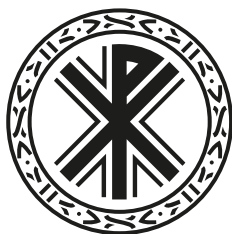
² Department of Basic Sciences. School of Physical Activity and Sport Sciences. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Department of Basic Sciences. School of Physical Activity and Sport Sciences. Calle Ramiro de Maeztu, 14. 46900 (Torrent) Valencia. Spain. *E-mail*: mlmoreno@ucv.es

³ Department of Organic Chemistry. School of Pharmacy. Universitat de València.

* Correspondencia: Universitat de València. Department of Organic Chemistry. School of Pharmacy. Av. V. A. Estellés, s/n. 46100 (Burjassot) Valencia. Spain. *E-mail*: santos.fustero@uv.es

⁴ Príncipe Felipe Research Centre.



ABSTRACT

Oxidative stress is associated with multiple pathologies such as cancer and can exacerbate the development of them. In this work, we have studied the antioxidant capacity of 5-Fluorouracile (5-FU) which is an antineoplastic drug that is used in the treatment of colorectal cancer. 5-FU is a compound that has a chemical structure similar to uracil and is also fluorinated. New fluorinated derivatives previously obtained in our laboratory were tested to study its antioxidant activity. All the compounds analyzed were able to inhibit lipid peroxidation when used in concentrations of 10 μ M.

KEYWORDS: *antioxidants, MDA, lipid peroxidation, antineoplastic, cancer.*

RESUMEN

El estrés oxidativo está asociado a múltiples patologías, como el cáncer, y puede agravar el desarrollo de estas. En este trabajo hemos estudiado la capacidad antioxidante del 5-fluorouracilo (5-FU), que es un fármaco antineoplásico que se utiliza en el tratamiento del cáncer colorrectal. El 5-FU es un compuesto que tiene una estructura química similar al uracilo y además está fluorado. Nuevos derivados uracilofluorados que se habían obtenido previamente en nuestro laboratorio fueron testados para estudiar su actividad antioxidante. Todos los compuestos analizados fueron capaces de inhibir la peroxidación lipídica cuando se utilizaron a concentraciones de 10 μ M.

PALABRAS CLAVE: *antioxidantes, MDA, peroxidación lipídica, antineoplásico, cáncer.*

INTRODUCTION

Oxidative stress is defined as the alteration produced by the imbalance between oxidants and antioxidants species (Sies, 1986). It can be caused by an excess of oxidants, antioxidant deficiency, or both factors simultaneously. Currently, there is a growing interest in oxidative stress because it can lead to cell death and contribute to the development of multiple pathologies (Serero et al., 2008). Some of these diseases are cancer, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, myocardial infarction, acute pancreatitis, Parkinson's and Alzheimer's disease among others (Wang et al., 2014; de Sa Junior et al., 2017; Miletic et al., 2017).

Colorectal cancer is the fourth leading cause of cancer death in the world. It presents an incidence of 1.4 million of cases per year with a death rate of 700,000 people (Bhardwai et al., 2017). In colorectal cancer, a widely antineoplastic drug used is the fluorinated uracil molecule 5-Fluorouracile (5-FU) (Yoshitani and Takashima, 2009). This molecule is an antineoplastic antimetabolite of the pyrimidine base uridine. It acts as a false substrate in the synthesis process of the essential constituents of nucleic acids, causing the synthesis of an anomalous DNA. It is indicated in a large variety of tumors. It is used orally or intravenously. It is absorbed in the intestine and is rapidly distributed throughout the body. It is metabolized in the liver giving rise to its active metabolite being eliminated by several mechanisms (Woloch et al., 2012).

Since oxidative stress and lipid peroxidation have been causally implicated in the pathogenesis of cancer and the previous cited pathologies, the determination of remaining products of lipid peroxidation, such as MDA, has been accepted and widely used as a marker of this process (Bosch-Morell et al., 1998; Bunnag, 2006; Surekha et al., 2007). For this reason, the aim of our study is to assess the antioxidant capacity observed by the inhibition of lipid peroxidation by 5-FU and other new fluorinated uracil derivatives previously synthesized in our laboratory: 6-[Difluoro(phenyl)methyl]-3-(2,4,6-trifluorophenyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (S-81), 3-[2-Chloroethyl]-6-[difluoro(phenyl)methyl]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (S-86), 6-[Difluoro(phenyl)methyl]-3-(4-trifluoromethoxyphenyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (S-123). Padhye and collaborators (2010) observed that the fluorinated chalcones were more potent as antioxidants and as anti-proliferative drugs than the initial compounds with phenolic hydroxyl groups, their hydroxyl counterparts which were substituted by fluor. (Padhye et al., 2010).

METHODS

Animals

Male C57BL/6 mice (20-25 g) were used. Animals received human care in accordance with guidelines established in Spanish legislation (Royal Decree RD 53/2013). The protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee CEU Cardenal Herrera University.



Lipid peroxidation inhibition

Lipid peroxidation inhibition was determined by measuring MDA concentration in samples of C57BL/6 mouse liver homogenates with an HPLC system (Waters) of the CEU Cardenal Herrera University following Richard's method (Romero et al., 1998). 5 mL of liver homogenate were adjusted to a final protein concentration of 12 mg/mL. A range of concentrations between 0 and 10 μ M of fluorinated uracil derivatives and peroxidation inducers were added to the homogenates and incubated at 37 °C for 2 h. After incubation homogenates were stored at –80 °C until MDA analysis.

The chromatographic separation column used was a Kromasil C18 5 μ m of 250 x 4.6 mm (Análisis Vínicos S.L.). The flow of the mobile phase was 1 mL/min. The excitation wavelength used was 532 nm and the emission wavelength was 553 nm. The fluorescence detector voltage used was 600 and the response was 2 seconds. The mobile phase was prepared with 50 mM of phosphate buffer at pH 6.0 and methanol (580 mL of buffer and 420 mL of methanol). Then, it was filtered through a membrane filter (Scheicher und Schuell) of 0.45 μ m pore and 47 mm diameter. The calibration stock solution was prepared daily and consists of a 20 mM concentration of 1,1,3,3-tetraethoxypropane in absolute ethanol. The working solution consists of a preparation of thiobarbituric acid (TBA) (0.37 %) and perchloric acid (6.4 %), 2: 1 v/v respectively. The working solution was also prepared daily. 0.1 mL of the sample and 0.75 mL of the working solution are mixed well and kept for 60 minutes in a 95 °C water bath. After this time the mixed was cooled to 4 °C for 10 min in order to stop the reaction, and centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. Until its injection into the HPLC unit, the tubes were kept at a constant temperature of 4 °C. Since the MDA-TBA adduct is unstable at neutral pH, each sample was neutralized with 0.7 M of potassium hydroxide a few minutes before injection into the HPLC equipment. Immediately after neutralizing, centrifuge for 1 min to help precipitate insoluble salts that could interfere in the determination and proceed, after filtering with non-sterile syringe filters (3 mm, 20 microns, Teflon membrane, supplied by Corning Laboratory Sciences Company), to inject into the HPLC equipment. In each experiment, a blank and a standard calibration curve (0, 0.25, 0.5, 1 and 2 μ M) were prepared. The area of the peak obtained is directly proportional to the concentration of MDA in the sample, which was calculated by intrapolation in the regression line obtained with the standards.

Total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity (TAC) of 5-FU was measured by the ELISA kit from Cayman-chemical™ which is based on the ability of antioxidants to inhibit the oxidation of ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]). Antioxidant capacity was expressed in TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) units.



Statistical analysis

Results are shown as mean $\pm$ SD. Statistically significant differences in mean values were tested by ANOVA test using SPSS Software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

We have observed a significant decrease in MDA production of 58.12 % in S-86, 44.61 % in S-123, 24.11 % in 5-FU and 10.83 % in S-81 in the sample with highest concentration (10 μ M) (Figures 1-2). 5-FU also showed a TAC of 0.68 TEAC.

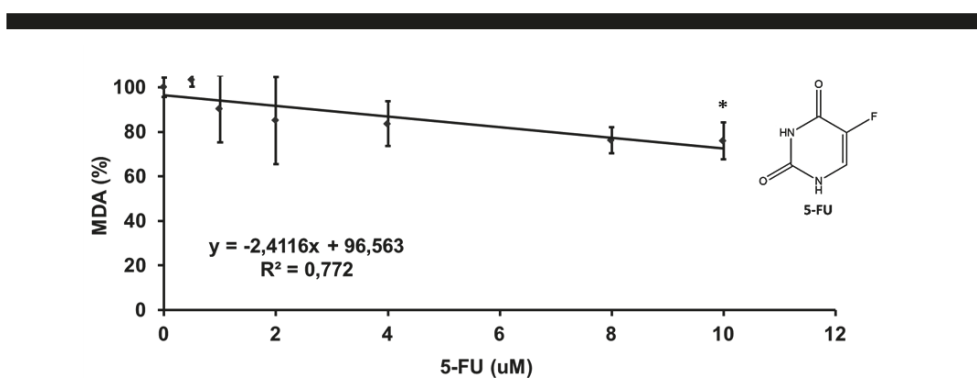


Figure 1. MDA production in presence of 5-FU in samples of C57BL/6 mouse liver. Concentrations used of 5-FU were 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ M. Statistical significance is indicated as * $p < 0.05$ vs 0 μ M.

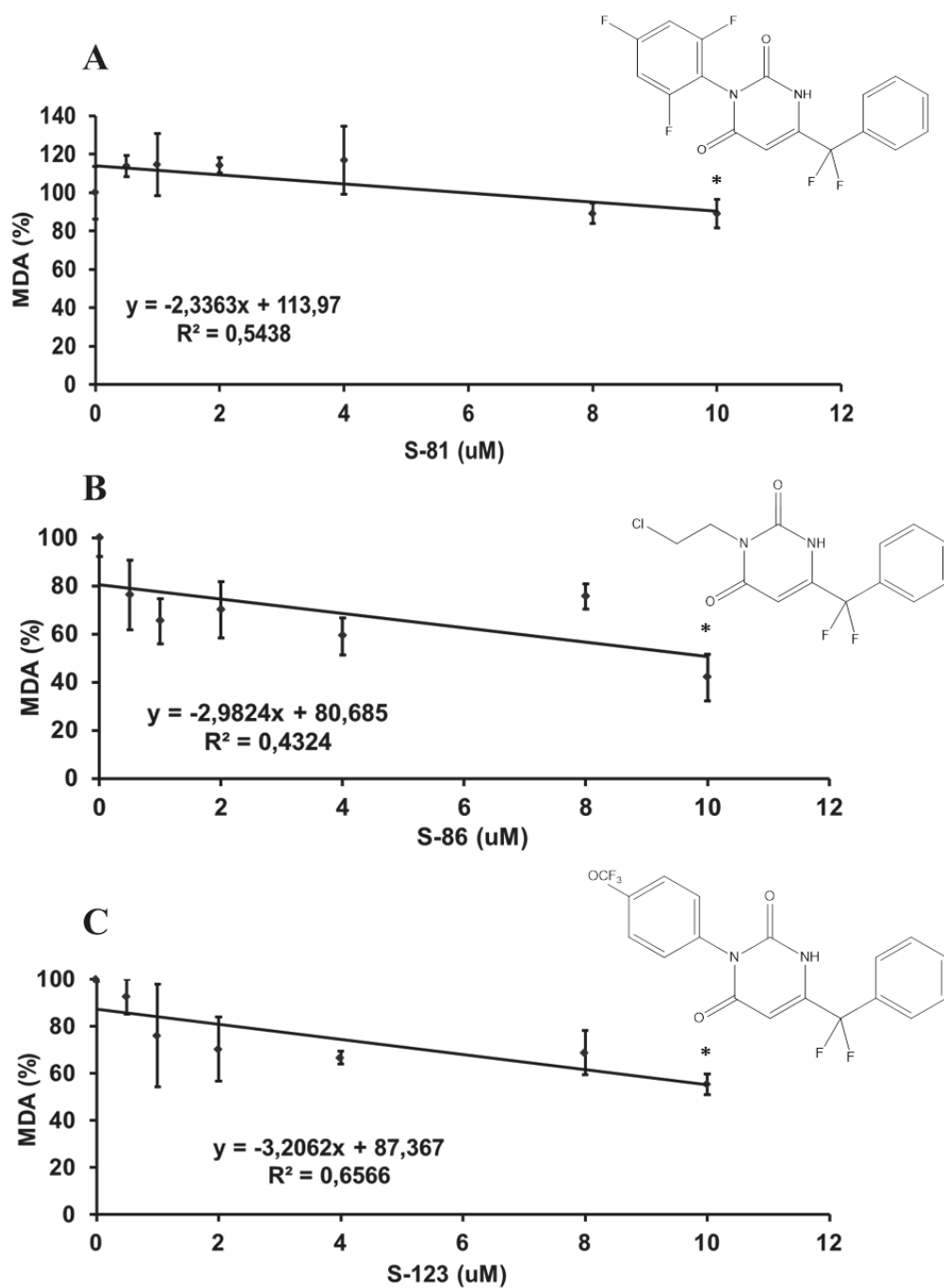


Figure 2. MDA production in presence of S-81 (A), S-86 (B) and S-123 (C) in samples of C57BL/6 mouse liver. Concentration of the three molecules studied were 0, 2, 4, 6, 8, 10 μM. Statistical significance is indicated as * $p < 0.05$ vs 0 μM.

DISCUSSION

Several studies have focused their researches on the antioxidant activity of various uracil derivatives (Akhatova et al., 2011; Spanou et al., 2011). In our studies, we provide new uracil derivatives (S-81, S-86 and S-123) that decrease the percentage of MDA concentration indicating an antioxidant capacity. Since oxidative stress is associated with cancer, 5-FU could be an interesting drug in antitumor therapy not only for its antineoplastic properties, but also for its antioxidants too. In this way, 5-FU could provide the advantage of the combination in the same drug preparation of two beneficial effects for the treatment of cancer. In this line, it would avoid pharmacokinetic problems and interactions due to the separate administration and combined of an antioxidant drug and another antineoplastic drug. This also implies an increase in the comfort level of the patient who receives the treatment.

CONCLUSION

It was decided from the very beginning of our research work to study the fluorinated compounds, instead of the phenolic ones without fluor and with only hydroxyl groups. As it can be found in other studies the fluorinated compounds are more potent antioxidant and anti-proliferative drugs than their hydroxyl counterparts. 5-FU and the new fluorinated uracil derivatives (S-81, S-86 and S-123) studied have a significant antioxidant capacity. Specifically, the antineoplastic 5-FU has both biological and antioxidant activity *per se*.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by funds from Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (2017-257-001).

LITERATURE CITED

- [1] Akhatova GR, Safarova IV, Gerchikov AY. Antioxidant activity of uracil derivatives. *Kinet Catal.* 2011;52(1):1-5.
- [2] Bhardwaj M, Erben V, Schrotz-King P, Brenner H. Cell line secretome and tumor tissue proteome markers for early detection of colorectal cancer: A systematic review. *Cancers (Basel)*. 2017; 9 (11):E156.
- [3] de Sá Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS, Fonseca PMM, Jorge SD, Araldi RP, *et al.* The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:2467940.
- [4] Miletić J, Drakulić D, Pejić S, Petković M, Ilić TV, Miljković M, *et al.* Prooxidant-antioxidant balance, advanced oxidation protein products and lipid peroxidation in Serbian patients with Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 2017;17:1-21.



- [5] Padhye S, Ahmad A, Oswal N, Dandawate P, Rub RA, Deshpande J, *et al.* Fluorinated 2'-hydroxychalcones as garcinol analogs with enhanced antioxidant and anticancer activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20:5818-21.
- [6] Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:993-7.
- [7] Serero A, Lopes J, Nicolas A, Boiteux S. Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(8):1262-75.
- [8] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 1986;25(12):14.
- [9] Spanou C, Tzioumaki N, Manta S, Margaritis P, Kouretas D, Komiotis D, *et al.* Unsaturated keto and exomethylene pyranonucleoside analogues of thymine and uracil exhibit potent antioxidant properties. *Pharmacology & Pharmacy.* 2011;2:122-6.
- [10] Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(8):1240-7.
- [11] Woloch C, Di Paolo A, Marouani H, Bocci G, Ciccolini J, Lacarelle B, *et al.* Population pharmacokinetic analysis of 5-FU and 5-FDHU in colorectal cancer patients: search for biomarkers associated with gastro-intestinal toxicity. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(15):1713-9.
- [12] Yoshitani S, Takashima S. Efficacy of postoperative UFT (Tegafur/Uracil) plus PSK therapies in elderly patients with resected colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009;24:35-40.



<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	107-120	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

Caracterización sanitaria de las explotaciones ganaderas en el sur del Líbano

Sanitary portrayal of the animal husbandry in the south of Lebanon

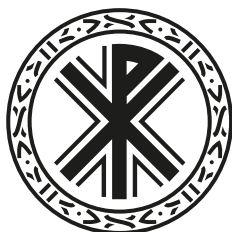
Fecha de recepción y aceptación: 7 de octubre de 2017, 9 de enero de 2018

Carla Ibáñez Sanchis^{1*}, Borja Martí Peiró¹ y Antonio Calvo Capilla²

¹ Departamento de Producción Animal y Salud Pública. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Departamento de Producción Animal y Salud Pública. Calle Guillem de Castro, 94. 46003 Valencia. España. *E-mail*: carla.ibanez@ucv.es



RESUMEN

La ganadería es una actividad económica muy importante en toda Asia Occidental, principalmente en el Líbano, donde las oportunidades de trabajo son limitadas y el 60 % de la población rural depende de los productos animales como principal medio de subsistencia. La actividad ganadera, además de ser una fuente de alimento, contribuye a generar ingresos mediante la venta de productos de origen animal, que a menudo cubren los requerimientos de las familias más desfavorecidas. El presente trabajo tiene como propósito analizar el estado de las diferentes explotaciones ganaderas en las zonas rurales del sur del Líbano. Este estudio se ha realizado en la provincia de Nabatiye, recogiendo datos de 7.878 animales presentes en 109 granjas de la zona. Actualmente, el sector padece serios problemas, como la disminución progresiva del número de animales, la reducción de las zonas de pastizales y el aumento del precio de los piensos concentrados y forrajes, lo cual deriva en un aumento del coste de producción. Además, la mala gestión de los productos de origen animal y el débil sistema de salud animal en Siria están afectando negativamente a este sector. La situación actual de la cabaña ganadera en el Líbano muestra un sistema debilitado por el bajo nivel de formación de los ganaderos que pesa sobre el estado de salud de los animales, el manejo de la granja y la calidad y seguridad de los productos animales, concretamente de la leche.

PALABRAS CLAVE: *Líbano, explotaciones ganaderas, sanidad animal, productos de origen animal.*

ABSTRACT

Livestock farming is a very important economic activity throughout Western Asia, mainly in Lebanon, where work opportunities are limited and 60 % of the rural population depends on animal products as their main means of subsistence. Livestock activity, besides being a source of food, contributes to generate income through the sale of animal products, which often cover the requirements of the most disadvantaged families. Analyzing the state of the different livestock farms in rural areas of southern Lebanon is the purpose of this paper. This study was carried out

in the province of Nabatiye, collecting data of 7,878 animals present in 109 farms in the area. Nowadays, the sector is suffering serious problems such as the progressive reduction in the number of animals, the reduction of grassland areas and the increase in the price of concentrated feed and forages, which triggers an increase in the cost of production. In addition, the poor management of animal products and the weak animal health system in Syria is affecting negatively this sector. The current situation of the livestock in Lebanon shows a weakened system due to the low level of herdsmen training, that affects to the management of the farm, the state of animals health and the quality and safety of the animal products, specifically milk.

KEYWORDS: *Lebanon, livestock farms, animal health, animal products.*

INTRODUCCIÓN

La ganadería es una actividad económica muy importante en toda Asia Occidental, principalmente en Líbano, donde las oportunidades de trabajo son limitadas y el 60 % de la población rural depende de los productos animales como principal medio de subsistencia. La actividad ganadera, además de ser una fuente de alimento, contribuye a generar ingresos mediante la venta de productos de origen animal, que a menudo cubren los requerimientos de las familias más desfavorecidas [1,2,3]. Por ello es de suma importancia para el desarrollo rural conocer la situación en la que se encuentra actualmente la producción ganadera, saber si se cumple algún programa de sanidad animal e higiene o investigar cómo la población utiliza los productos ganaderos.

Situación, superficie y límites geográficos

Líbano es un país de Oriente Medio que se encuentra en Asia Occidental, a orillas del Mediterráneo. El país limita al norte y al este con Siria, al sureste y al sur con Israel y al oeste se encuentra bañado por el mar Mediterráneo [1,4-7]. Con un total de 10.452 km² y una estimación de 5,9 millones de habitantes, se divide en ocho distritos o provincias: Akkar, Baalbeck-Hermel, Beirut, Bekaa, Líbano norte, Líbano sur, Monte Líbano y Nabatiye [1,2,4-9].

Importancia del sector agropecuario

La agricultura representa una parte importante de la actividad económica y social de Líbano. La ubicación del país, el clima mediterráneo, los recursos hídricos y la fertilidad de los suelos favorecen el desarrollo del sector agrícola, llegando a ser uno de los más productivos de la región. Debido a los constantes enfrentamientos a los que se ha sometido el país, la tierra no se ha podido explotar en su totalidad. Por lo tanto, la producción total es inferior al consumo, y no se llegan a satisfacer las necesidades alimentarias de los habitantes [1,5,7]. A pesar de la ventaja de los suelos fértiles y la climatología, el sector agrario libanés cuenta con elevados costes del terreno, mano de obra, energía y materiales que suponen una desventaja frente a los países de su alrededor [1,6,10,11].



De todos los habitantes de Líbano, alrededor de un 13 % viven en zonas rurales. Diferentes censos agrícolas realizados por el Ministerio de Agricultura (MOA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) han registrado que la agricultura es una actividad a tiempo parcial. Los agricultores tradicionales tienen que complementarla con diferentes actividades bien sean ganaderas o de servicios, con el fin de obtener varios insumos económicos [1,12].

El sector primario libanés cuenta con una importante producción en la que destacan los vegetales (tomates y patatas), las frutas (cítricos, manzanas, uvas, plátanos y kakis), el tabaco, el vino, el aceite de oliva y los productos lácteos. Entre todos ellos, la producción vinícola es de reconocido prestigio internacional debido a su calidad [1,5,6,11]. La aportación del sector agropecuario a la economía libanesa durante 2015 se ha situado en torno al 1,2 % del producto interior bruto (PIB), y ha supuesto una tasa de disminución respecto a 2014, cuando el PIB fue del 1,5 % [11].

Los agricultores de las zonas rurales necesitan desarrollar nuevos métodos agrícolas para aumentar su productividad y competitividad, ya que se están viendo afectados por las importaciones de frutas y hortalizas más baratas de países vecinos, debido a los acuerdos de libre comercio y a la apertura de mercados árabes [1,10].

El cierre de las fronteras con Siria, principal vía de exportación, ha supuesto una interrupción de las rutas comerciales y un incremento de los costes en los productos agropecuarios exportados (frutas, hortalizas y aves de corral), ya que se tienen que exportar por mar. Además, la mano de obra barata proporcionada por trabajadores temporales sirios se ha visto reducida porque los desplazados con situación irregular no tienen permitido trabajar [9-11].

Situación general del sistema de producción ganadera

La producción pecuaria está considerada como una actividad secundaria a la agricultura libanesa. Este tipo de producción es de suma importancia, ya que en las zonas rurales las familias cuentan con bajos ingresos y dependen de la producción de leche y ganado, combinada con la producción de cultivos, para asegurar su alimentación y economía. El nivel de vida de muchos de los ganaderos está por debajo de los estándares humanitarios. Habitan principalmente en casas de hormigón dispersas y separadas unas de otras, y algunos incluso con acceso limitado a las necesidades básicas, como son las carreteras, el agua corriente, la electricidad y los servicios médicos [1,5]. En Líbano se considera prioritaria la supervivencia de este sector, ya que la cría de animales desempeña un papel socioeconómico importante en muchas de las poblaciones rurales con bajo potencial económico y desertificación humana [9,13,14].

Población ganadera

El censo ganadero registra 67.000 cabezas de ganado bovino, 236.000 de ganado ovino y 367.000 de la especie caprina [11]. Aunque la bibliografía recoge un aumento de algunas especies animales del año 2000 al 2009, como son las cabras y las aves de corral, en general la mayoría de los animales se han mantenido en número o han disminuido hasta los datos de 2016, como son sobre todo las cabezas de ganado vacuno y ovino (tabla 1) [1].



Tabla 1. Población ganadera. Censos ganaderos en Líbano entre los años 2000 y 2016

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2011	2014	2016
Asnos	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	-	-	-
Ganado vacuno	77.000	78.124	88.216	86.182	80.343	76.900	77.000	77.400	76.900	77.000	63.000	69.000	67.000
Cabras	417.000	399.183	408.933	428.035	432.158	494.700	484.400	434.700	450.000	450.000	421.000	404.000	367.000
Caballos	3.580	3.580	3.580	3.580	3.580	3.580	3.580	3.580	3.580	3.580	-	-	-
Mulas	4.780	4.780	4.780	4.780	4.780	4.780	4.780	4.780	5.000	5.000	-	-	-
Ovejas	354.000	328.579	297.829	302.513	305.360	337.300	370.400	324.400	330.000	330.000	375.000	265.000	236.000
Aves de corral	31.000.000	32.000.000	33.000.000	34.000.000	37.500.000	35.500.000	36.000.000	36.700.000	37.000.000	37.500.000	53.500.000	50.000.000	-

En Líbano, alrededor del 70 % de los productores de rumiantes tienen menos de cincuenta cabezas por propietario. El ganado bovino se cría principalmente para la producción de leche, predominando animales de raza Holstein, la mayoría importados de la Unión Europea (UE). En las granjas de pequeños propietarios, que poseen cuatro o cinco cabezas de ganado, predominan vacas de razas locales con baja producción lechera que se utilizan para trabajos agrícolas, como Baladi, cruce de Baladi-Frisio y algunas cabezas de Holstein [1,2,6,7,9,10,12,13,15,16].

En referencia a los pequeños rumiantes, predominan las razas rústicas. Las ovejas son principalmente de la raza Awassi, o también llamadas de cola grasa, que producen leche, carne y lana. Las cabras son, principalmente, de razas locales como «Mountain Black» o Baladi, aunque también son comunes las cabras de la raza Shami, también llamada cabra de Damasco, para producción lechera y cárnica [1,2,6,7,9,10,12,13,15,16].

Por último, la producción avícola a gran escala en Líbano cuenta con más de diez grandes productores avícolas y alrededor de dos mil granjas de aves de corral. Los cuatro principales productores están totalmente integrados, por lo que tienen su propia planta de alimentación, sus propias granjas, mataderos y canales de distribución. Además, las integradoras se encargan de vender alimentos a pequeños criadores y facilitarles la venta aprovechando su canal de distribución. En las zonas rurales, la producción tradicional de aves de corral consiste en la cría para la obtención de pollos y huevos principalmente. La mayoría de los animales son de razas locales con alojamientos al aire libre, en patios traseros de viviendas o en las explotaciones, alimentándose de hierbas e insectos, carentes de medidas de bioseguridad. Este sistema ya no es óptimo debido a que la demanda de alimentos aumenta incesantemente, por lo que los pequeños criadores de estas zonas solo se encargan de abastecer el consumo de la población local [2,7,9,17,18].

Sistemas de producción

Se han descrito distintos sistemas de producción para la cría y alimentación de pequeños rumiantes en el medio silvestre, aunque actualmente el ganado ovino y caprino se suele criar en granjas

[1,14,16,19]. En el sistema intensivo, los animales viven en corrales y son los propios ganaderos los que aportan el alimento, a pesar de ello, algunos ganaderos poseen campos de cultivo de cereales y hortalizas alrededor de las explotaciones y llevan a los animales realizando un pastoreo limitado. El coste más alto de este tipo de producción es la alimentación, ya que depende de la disposición y precio de los piensos y forrajes. La venta de corderos y cabritos es la principal fuente de ingresos, además de la venta de lana y estiércol, que pueden aportar una pequeña contribución, aunque rara vez captan el valor añadido del estiércol debido a la falta de conocimiento de procesado y almacenamiento adecuados [14-16].

Los sistemas de extensivo se componen de grandes rebaños que se desplazan entre diferentes áreas para aprovechar al máximo las tierras de pastoreo. En este caso, la leche es la principal fuente de ingresos mediante la venta directa. La producción de leche varía constantemente, ya que cuando el clima es seco y empeora la calidad del forraje, disminuyen los recursos de alimentación y se produce un rendimiento negativo. Además, el rendimiento de la producción se ve limitado por las condiciones de cría y sanidad animal, donde la mortalidad llega a un 40-45 % [14,15].

Sistemas de alimentación

El tipo de alimentación depende de la especie y del sistema de producción. En sistemas de producción de extensivo, los pequeños rumiantes se alimentan del pastoreo en los bosques naturales, pastizales de montaña y residuos agrícolas. La mayoría de los pastores seminómadas generalmente no poseen tierras propias, por lo que utilizan cultivos alquilados para que los animales puedan pastar en parcelas de residuos de cultivos. Tanto las ovejas como las cabras aprovechan pastizales y tierras en barbecho. Además de los forrajes del pastoreo, algunos ganaderos adquieren cereales, como la cebada, y otros cultivos forrajeros como suplemento para los ovinos y caprinos, intentando compensar así la baja calidad y/o disponibilidad del forraje [1,10].

Los sistemas de producción más intensivos se basan en la alimentación a base de piensos concentrados de producción local. Los granos más comunes que se añaden a las raciones son la cebada, el maíz y el trigo, y como aporte de forraje, la alfalfa y la paja. Normalmente, este tipo de alimentación se utiliza de manera ineficaz, dando raciones desequilibradas a los animales, lo que desencadena un impacto negativo en el rendimiento del ganado lechero, cuya principal consecuencia son las enfermedades metabólicas, como la acidosis crónica del rumen, la laminitis, el bajo contenido de grasa láctea y la baja fertilidad [1,10,16].

Los rebaños, sobre todo de pequeños rumiantes, han ido disminuyendo por diferentes razones. El cambio en las prácticas del uso de la tierra, utilizándose más para los cultivos y menos para el pastoreo, el desplazamiento de los medios de subsistencia rurales a urbanos y la fragmentación de los pastizales debido a la expansión urbana son los motivos que han afectado a la disponibilidad y el precio de los pastizales y alimentos concentrados [1,3,10,12,16].

Servicios veterinarios

La mayoría de los ganaderos sufre la ausencia o asistencia limitada de servicios veterinarios. Además, la pobreza y la desconfianza en los medicamentos veterinarios disponibles son factores que



demuestran la escasa cobertura de salud animal [1]. Por lo general, únicamente proporcionan tratamientos o vacunas dependiendo del brote de enfermedades y cuando el MOA emprende un programa de vacunación [1,16,20,21].

Como consecuencia, las enfermedades más frecuentes en casi todas las explotaciones lecheras son: mamitis, en un 52 %; metritis, en un 24 %; laminitis y pedero, en un 10 %; fiebre aftosa, en un 5 %, y otras enfermedades en un 9 %, como gástricas, respiratorias o hipocalcemias. La mamitis, enfermedad más común, está causada principalmente por la mala higiene, y puede desencadenar la contaminación de la leche. La metritis y la laminitis son resultado de una mala gestión de la alimentación, especialmente con deficiencias de minerales y vitaminas. Y las enfermedades gástricas, como por ejemplo la acidosis ruminal, están causada por el alto uso de alimentos concentrados y la falta de forraje [1,16].

La situación sanitaria de los ovinos y caprinos también es muy deficiente debido a los altos costes de los servicios veterinarios y vacunas. Las enfermedades de cabras y/o ovejas más difundidas por las explotaciones son: la peste de los pequeños rumiantes, la fiebre aftosa, la brucelosis, las parasitosis gástricas, la enterotoxemia y la pasteurelosis. Estas enfermedades, que afectan a los pequeños rumiantes, causan grandes pérdidas en la producción animal. Además, la seguridad alimentaria y los medios de subsistencia rurales, la inocuidad de los alimentos y el comercio nacional e internacional de animales y sus productos se ven ampliamente afectados [4,16,18].

Líbano cuenta con unas repercusiones negativas, por las que en 2013 el MOA inició un programa de vacunación para evitar una posible epidemia. Esto se debe a que los refugiados sirios llegan acompañados de miles de cabras, ovejas y vacas que pueden no estar vacunadas, convirtiéndose así en una amenaza para la estabilidad económica y supervivencia de los granjeros [18,21]. Además, las enfermedades zoonóticas y la higiene de la carne y productos lácteos no están controladas [1]. En 2002, surgió un brote de brucelosis que afectó al 13 % del ganado, y hubo un alto nivel de infección en humanos por el consumo de leche no pasteurizada, declarándose endémica [1,5]. Otras enfermedades endémicas son las equinocosis (quiste hidatídico), el carbunco, la leptospirosis, la fiebre Q y la rabia [5].

Inseminación artificial

La fertilidad supone un obstáculo importante en todas las explotaciones de ganado, considerándose una de las principales causas de bajos beneficios en la producción lechera. El uso de la inseminación artificial (IA) es limitado. En términos generales, la IA solo la utilizan regularmente el 12 % de los ganaderos de vacuno, mientras que el 28 % utilizan IA y monta natural, y un 60 % dependen únicamente de la utilización de toros para la reproducción de su ganado [1,7].

En las granjas a gran escala, que poseen la tecnología de la IA y tienen acceso a buenos materiales reproductivos y toros, prevalece un tipo de cría de una sola raza para mejorar la productividad de la descendencia. Sin embargo, los pequeños ganaderos prefieren utilizar toros seleccionados según conformación, sin conocer el verdadero potencial genético. Es la manera fácil y barata de apareamiento de sus vacas, que finalmente conduce al cruzamiento [1,7].

El MOA ha introducido durante unos años la tecnología de la IA y ha proporcionado semen congelado de manera gratuita a los ganaderos. Las importaciones de semen congelado del MOA son única-



mente de razas con un alto rendimiento que pueden producir leche a un coste razonable. La tendencia común es reemplazar la raza autóctona Baladi por razas importadas como Holstein, ya sea mediante sustitución directa o cruce [1,7].

Producciones animales

La demanda de leche y carne en Líbano es elevada, a pesar de que la producción de estos productos es relativamente baja. La carne de cabra ha experimentado últimamente un ligero aumento debido a la crisis mundial de la enfermedad de las vacas locas y los nuevos hábitos de alimentación que favorecen los productos orgánicos y locales. A pesar de esto, y de que la carne de oveja y cabra se adapta a la cocina tradicional libanesa, la producción local de estos productos lleva unas décadas disminuyendo a causa de la disponibilidad de carne importada más barata en supermercados y centros comerciales. La carne de ganado bovino se produce a partir de machos extra lecheros de raza Holstein o novillos locales. Debido a que la producción sigue siendo muy limitada, abasteciendo únicamente al 10 % de la demanda local, se importan animales principalmente de la UE para su sacrificio en mataderos libaneses [1,7].

Los estudios demuestran que la producción de leche es de 21 l/vaca/día, 1 l/oveja/día y 0,72 l/cabra/día, lo que refleja graves problemas relacionados con la alimentación, manejo y principalmente la eficiencia reproductiva [1]. Aun así, la producción lechera está en aumento gracias a la creación de modernas industrias lácteas y al apoyo brindado a las explotaciones existentes por diferentes programas nacionales e internacionales facilitados por la FAO, la UE y el Gobierno libanés [11,16]. No obstante, a excepción de los grandes productores de leche, parece ser que la ganadería lechera en explotaciones de pequeño tamaño y la pobreza están directamente relacionadas. En las zonas rurales, la leche es una fuente adicional de ingresos para diversas familias y la llevan a cabo pequeños ganaderos [1,15,16].

Uno de los grandes problemas que presentan las explotaciones de pequeño tamaño son los métodos de producción. Muchos explotadores no disponen de máquinas de ordeño y dependen del ordeño manual, además utilizan recipientes inadecuados como jarras de plástico o tanques de metal de baja calidad para la recolección de la leche. La falta de dispositivos para la refrigeración de la leche recolectada y las malas condiciones higiénicas, en cuanto a la limpieza y desinfección de utensilios, hacen que no tengan un buen control sobre la calidad de los productos lácteos. Únicamente unos pocos ganaderos siguen los correctos procedimientos de ordeño y manipulación. Uno de los proyectos que emprendió la FAO en 2009 fue el «Proyecto FAO/UNDP» de recuperación y rehabilitación del sector lechero en el valle de la Bekaa y las llanuras de Hermel-Akkar, centrado fundamentalmente en apoyar a pequeños productores de leche, ofreciendo programas de formación y prácticas de higiene y recolección primaria en fincas y aldeas [1,15,16].

Otro de los grandes problemas en las granjas libanesas, tal y como se ha mencionado anteriormente, son la mastitis y la fiebre aftosa, comunes por la falta de higiene. La FAO y el MOA han realizado programas vacunales para ayudar al tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, los productores no cumplen los tiempos de espera desde la vacuna y venden la leche, que resulta estar contaminada [16].

La mayoría de los productores lecheros dependen de los colectores de la leche del pueblo Hallabas, que desempeñan el papel de intermediarios entre los ganaderos y las plantas procesadoras de



productos lácteos. La falta de buenos sistemas de recolección y la obtención de mejores precios hacen que el comercio minorista y el procesado de la leche en los hogares se practiquen cada vez más en las zonas rurales. El 60 % de los ganaderos venden su leche a comerciantes, y el 27 % almacenan la leche cruda y se encargan de procesar la leche en condiciones antihigiénicas, fabricando yogur y productos de queso, como Iaban y Labneh, que pueden contener altas cantidades de bacterias. El 10 % utilizan la leche para consumo doméstico, y únicamente el 3 % se encargan de vender directamente a las plantas de procesamiento [1,3,16].

Por lo tanto, los objetivos del presente estudio han sido analizar el estado de la salud animal en las zonas rurales del sur de Líbano, correlacionar las enfermedades con las prácticas de manejo de los ganaderos y detectar los principales problemas que afectan a la inocuidad de los productos animales destinados a consumo humano.

MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en Nabatiye, provincia situada al sur de Líbano, entre los días 20 de octubre y 2 de noviembre de 2015.

La población utilizada para el desarrollo del presente estudio son animales de todas las especies criados en granjas de las zonas rurales del sur de Líbano. Los animales que se incluyen en el estudio son: 2.619 cabras, principalmente de las razas Baladi y Shami, razas rústicas de la población local; y un total de 1.174 ovejas que pertenecen a la raza Awassi, de cola grasa, o un híbrido de Awassi-Baladi. En cuanto al ganado vacuno, un total de 840 cabezas de la raza Holstein, mayoritariamente. También se visitan dos granjas que se dedican a la producción de pollo de engorde y huevos, con un total de 2.500 gallinas y 230 pollos. Además, se cuenta con 14 caballos y 23 perros.

Procedimiento

La primera acción llevada a cabo para desarrollar el trabajo fue establecer un marco de colaboración entre la Universidad Católica de Valencia (UCV) y la Unidad de Cooperación Cívico Militar (CI-MIC) del Ejército español, unidad que desempeña por mandato de Naciones Unidas distintas labores en la zona fronteriza de Líbano con Israel.

Tras haber realizado una revisión lo más exhaustiva posible para conocer los antecedentes históricos, la situación actual y la situación de la cabaña ganadera, se decide el material y los medicamentos que se deben enviar para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como la higiene de las explotaciones. El 19 de octubre de 2015, profesores y alumnos de la titulación de Veterinaria de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir viajan hasta la base militar Miguel de Cervantes, de Ebel Es Saqui-Marjayoun, en el sur de Líbano para participar en la Misión Libre Hidalgo XXIII UNIFIL.

El desarrollo del estudio comprende las siguientes fases:

1. Redacción de un cuestionario para recopilar información general sobre el lugar donde se encuentra cada explotación, el nombre del propietario, el número y la composición de los rebaños,



así como las observaciones generales, los posibles diagnósticos y los tratamientos administrados.

2. Visita de las pequeñas aldeas de Nabatiye, Deir Mimes, Wazzani, Blate, Marjayoun, Ebel el Saqi, Klayaa, El Hebbariech, Ethaibe, Deir Siriane, Kafer Kela, Houla, Wata Khiam y Ain Arab-Wazzany. La extensión de estas aldeas es de 1.058 km² aproximadamente, considerándose una muestra representativa de las condiciones de producción libanesas.
3. Visita de 109 granjas de distintas especies animales que suman un censo total de 7.878 animales. En cada una de las explotaciones se realiza una inspección *in situ*, tanto de los animales como de las condiciones ambientales, y se registran los datos en el cuestionario.
4. Decisión acerca de la asistencia sanitaria que se ha de proporcionar (prácticas veterinarias rutinarias en nuestro país, como por ejemplo desparasitación, tratamiento de enfermedades y medidas higiénico-sanitarias).
5. Asesoramiento al ganadero según sus prácticas de manejo, estado de sus instalaciones y entrega de un póster de prácticas de manejo e higiene.
6. Una vez en España se realiza de nuevo una búsqueda de información en las bases de datos PUBMED, Sciencedirect, Ministerio de Defensa y FAO, en la que las palabras clave son: Líbano, producción animal y explotaciones ganaderas, empleadas tanto en español como en inglés. Además, se realiza una búsqueda bibliográfica acerca de enfermedades animales en Líbano, resultando fallida debido a la falta de información.
7. Finalmente, se analizan los resultados obtenidos para su posterior valoración estadística mediante el programa Microsoft Office Excel.

Análisis estadístico de los datos obtenidos

El análisis de los datos obtenidos del estudio consiste en un contraste de resultados por el que se valoran las enfermedades encontradas entre los diferentes animales sometidos a la investigación. Este análisis se realiza con el programa estadístico Microsoft® Excel® para Mac (versión 2011, Microsoft Corporation).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Animales y enfermedades

Con relación a los animales estudiados, en el ganado vacuno predomina la raza Holstein, principalmente importada de países europeos, y en contraposición cabe destacar la ausencia de ganado de aptitud cárnica.

Con respecto a los pequeños rumiantes, en el ganado caprino se pueden distinguir distintos tipos raciales frecuentemente cruzados: la cabra Shami, con marcado perfil convexo, y la cabra Baladi, con un perfil más recto. Se trata de ganado muy rústico destinado principalmente a la cría de cabritos. En cuanto al ganado ovino, destacan las ovejas Awassi, cuyo uso principal es la producción de corderos.



Por otro lado, en las aves existe un predominio absoluto de gallinas, donde se pueden distinguir las de tipo mediterráneo, con distintos grados de mestizaje, y las de tipo asiático. La mayoría de los équidos son de talla pequeña, salvo algunos caballos tipo berberisco. Con respecto a los caninos, algunos cumplen los estándares de razas, como la Pointer y similares, y muchos otros no son asignables a ningún tipo racial.

Como se observa en la tabla 2, los rebaños que predominan son de vacuno, aves y pequeños rumiantes, bien sean ovejas y cabras en rebaños mixtos, o cada especie independientemente. Como se refleja en varias investigaciones, estas son las principales especies que se mantienen en Líbano para la producción de alimentos (por ejemplo, carne, leche y huevos) o para la producción de otros productos como lana y pieles [2,7].

A estos animales, tal y como se ha descrito en el apartado de material y métodos, se les realizan distintas tareas de control, diagnóstico y tratamiento de enfermedades: desparasitaciones, administración de antibioterapia, administración de suplementos vitamínicos-minerales, realización de pruebas diagnósticas (como el test de California para la detección de mamitis), palpaciones y auscultaciones para problemas digestivos y respiratorios. En definitiva, tareas veterinarias de las cuales se desprenden los resultados expuestos a continuación.

La mamitis es el problema mayoritario del ganado bovino, pues afecta a un 43,8 % de los animales. En los terneros, los problemas digestivos predominan sobre cualquier otra patología, perjudicando a un 62 %. La presencia de animales con sintomatología respiratoria en los rebaños de pequeños rumiantes muestra la diseminación de problemas respiratorios, que aqueja al 36,3 y 49,2 % de ovejas y cabras, respectivamente. Sin embargo, al comparar rebaños de ovinos y caprinos por separado, los ovinos tienen una tasa más alta de problemas digestivos que los caprinos, encontrándose el 35 % de los ovinos afectados y solo el 27,7 % de la población caprina. Los problemas respiratorios, además, son el principal problema que se muestra en las aves, con un 60 % de animales afectados. Por otro lado, la prevalencia de ectoparásitos hallados en los perros es del 100 %. Y en relación con los caballos, el 71 % de los casos presentan problemas del sistema locomotor.

Tabla 2. Composición de la población utilizada para el estudio

LOCALIDAD	Nº GRANJAS	VACAS	TOROS	TERNEROS	OVEJAS	CABRAS	GALLINAS	CABALLOS	PERROS	GATOS	TOTAL ANIMALES
Deir Mimes	2	9			65	80	15		1		170
Wazzani	15	119	3	41	526	9	35	1			734
Blate	6	12		4	5	450	10	2	7		490
Marjayoun	11	102		28	15	20	30		9		204
Ebel el Saqi - Klaya	16	127		6	151	630	2730	6	3	1	3654
El Hebbariech	2	31		20					3		54
Ethaibe - Deir Diriane	14	89		38	5	1	13				146
Kafer Kela	10	93		24	33			2			152
Houla	10	80		5	130	608	30	3			856
Wata Khiam	9	33		13	240	715					1001
Ain Arab - Wazzany	14	145		98	67	107					417
TOTAL	109	840	3	277	1237	2620	2863	14	23	1	7878

Para obtener los datos de la población bovina se visitan 79 granjas, con un total de 840 animales. La mayor parte de las vacas se encuentran en grupos reducidos, como es el caso de 55 explotaciones en las que solo hay de 1 a 10 animales. 17 propietarios poseen de 11 a 20 animales, y solo en 7 granjas hay de 21 a 50 animales, con tan solo 2 de ellas con más de 51 vacas. El tamaño de las explotaciones encuestadas está en un promedio de diez cabezas por granja. Estos datos coinciden con el estudio de Elie Haddad y Najah Chamoun en 2010, en el que se refleja que el 90 % de las granjas libanesas se dedicaban a la producción de leche a pequeña escala, y que estas solo tenían entre 1 y 15 cabezas de ganado [6]. De las 79 granjas visitadas, únicamente 30 no manifiestan síntomas de enfermedad en sus animales, y de las 840 vacas estudiadas, 187 presentan alguna patología.

Como se ha mencionado anteriormente, la mamitis en el ganado bovino es la patología más prevalente, con un total de 82 animales afectados. Seguidamente se encuentran los animales con papilomas víricos, vistos en 45 vacas, sobre todo en las ubres. Los ectoparásitos más frecuentes son los parásitos artrópodos hematófagos de la familia *Ixodidae*, que afectan a un total de 29 animales. Dentro de los problemas reproductivos, se hace referencia a 4 animales con metritis y a otros 5 con problemas de parto.

Apenas son 3 animales los que presentan algún síntoma asociado, probablemente, a problemas digestivos, en este caso la caquexia. Con relación a los animales que presentan problemas podales, como pedero, y a los animales que presentan problemas locomotores, por cojera, solo se ven afectados 7 animales en total. Y, por último, a 5 animales se les observa abscesos o heridas provocadas por traumatismos.

Fady Asmar indica en su estudio que, según el total de enfermedades declaradas, las más recurrentes, en la mayoría de explotaciones lecheras, son las siguientes: la mamitis (52 %), la metritis (24 %), la laminitis y el pedero (10 %), la fiebre aftosa (5 %) y otras, con menor porcentaje (gástricas y respiratorias, o deficiencias vitamínicas y minerales) [1]. Nuestros resultados siguen manteniendo la mamitis como problema principal. No obstante, aunque también se presentan los demás problemas en el mismo orden, se han contemplado muchos casos de papilomas víricos y problemas por ectoparásitos que en dicho estudio no aparecen.

En el caso de los terneros, se visita un total de 44 granjas en las que se encuentran 277 terneros en distintas etapas de crecimiento. De las 44 granjas, aproximadamente la mitad presentan algún problema; y entre los terneros 77 padecen algún síntoma.

Los principales problemas de los terneros son digestivos, ya que el 62 % de terneros presentan síntomas como diarrea y caquexia. Una de las etiologías planteadas puede ser la parasitosis gástrica, ya que no se les administra ningún tipo de desparasitación. Por otro lado, existe una coincidencia en los resultados de terneros con problemas respiratorios y ectoparásitos, encontrándose alrededor del 30 % de los animales afectados por estas dos patologías. En menor medida, se hallan animales con problemas locomotores u otros, como la agenesia congénita de cola, septicemias y onfaloflebitis.

Los resultados de los pequeños rumiantes provienen de 37 explotaciones. El 54 % de las explotaciones contenían solo cabras, y el 32,5 % únicamente ovejas; respecto a rebaños mixtos, un 13,5 %, en los que generalmente predomina una de las dos especies. El ganado ovino consta de 17 explotaciones con un total de 1.174 animales, de los que prácticamente la mitad se encuentran con algún síntoma de patología. Por otro lado, se visitan 25 explotaciones de ganado caprino, de las que 19 presentan algún problema; mientras que de los 2.619 animales, únicamente 844 no presentan síntomas



aparentes. El alto porcentaje de cabras en comparación con las ovejas en nuestra muestra coincide con las estadísticas publicadas por el MOA y la FAO [1,2,7,9].

Las enfermedades diagnosticadas en los animales enfermos muestran cierta similitud entre ovejas y cabras. El porcentaje más elevado se corresponde con los animales que presentan síntomas respiratorios: un 36 % en las ovejas y un 49 % en las cabras. Por otro lado, hay coincidencia en cuanto a las alteraciones digestivas: en el 35 % de las ovejas y el 29 % de las cabras se encuentran signos de diarrea. Respecto a los ectoparásitos, en ambos casos el problema es debido a sarna, producida por el ácaro *Sarcoptes*. Además, aparece un 2 % de mamitis en cabras, lo que supone un total de 26 casos. Con respecto a los problemas restantes encontrados en las dos especies con menor incidencia destaca: en los ovinos, únicamente un caso de un tumor mamario; y en las cabras, diferentes problemas, como: 15 casos de oestrus ovis, 3 casos de prurito anal, un caso de metritis, un animal con pederio, un caso de linfadenitis y otro de tumor mamario.

Según Fady Asmar, las enfermedades más prevalentes de los pequeños rumiantes son la paratuberculosis gástrica (34 %), la enterotoxemia (33 %) y la pasteurellosis (33 %) [1]. Obviando los diferentes problemas encontrados, nuestro estudio es coincidente con los datos de la bibliografía, ya que en ambos casos los dos principales problemas son respiratorios y digestivos. Aun así, los problemas respiratorios, en nuestro caso, se encuentran en mayor frecuencia porque están asociados a la falta de ventilación por la acumulación de amoníaco en lugares poco ventilados.

De todas las explotaciones de aves visitadas, los problemas se encuentran en 4 de ellas y únicamente en 58 animales que los ganaderos tienen para consumo propio. Así pues, se evidencia un claro incremento de problemas respiratorios en la población estudiada (60 %), que predomina sobre los problemas de histomoniasis aviar (23 %) y los problemas oftalmológicos (17 %).

De los 23 perros presentes en el estudio, el 100 % presentan ectoparásitos, todos ellos parásitos artrópodos, y en relación con los équidos, la mayoría presentan cojeras, solo hay un caso en que se diagnostica úlcera corneal.

La alta frecuencia de enfermedades que se encuentra en las explotaciones se debe a la desconfianza de los ganaderos en los medicamentos veterinarios, así como a los altos costes de los servicios de estos y de las vacunas, lo que provoca que la mayoría de los ganaderos no tengan acceso a ello [1].

Además, estos problemas se ven acrecentados por la falta de limpieza general en las cuadras y recintos donde se encuentran los animales, la falta de ventilación y luz solar, la falta de desinfección umbilical en los recién nacidos y la mala alimentación, como la paja de los bovinos demasiado picada y la escasa utilización de bloques de suplemento vitamínico y mineral.

Instalaciones y manejo

La mayoría de las explotaciones pertenecen a unidades familiares cuyos propietarios generalmente son hombres de avanzada edad, dirigidas por personas sin formación y con una mano de obra muy limitada, que cuenta con escasas habilidades y un deficiente conocimiento de las prácticas básicas para mejorar el manejo y la higiene de la granja. Diversos estudios coinciden con estas características, más concretamente un estudio llevado a cabo por la FAO, según el cual en 2010 solo el 35 % de los ganaderos de Líbano tenía menos de 35 años, y en el que la media de edad era de 52 años [6].



Los animales se encuentran, principalmente, en refugios rudimentarios, bajo las viviendas de los ganaderos o en algunas casas de hormigón a medio construir. Todos ellos utilizan cualquier tipo de material reciclado o de desecho, como hierros y objetos metálicos para construir puertas o para separar los distintos corrales. Existe una falta de limpieza general en las cuadras y recintos donde se alojan los animales.

Los estándares de calidad de la leche cruda son muy pobres y se realizan malas prácticas de ordeño. El ordeño es de tipo manual o mediante máquina de ordeño mecánico portátil, especialmente en el ganado vacuno. Hay ausencia de inmersión de pezones y uso de desinfectantes, mala manipulación y almacenamiento de la leche, utilizando viejos tanques de aluminio y plástico sin ninguna higiene. El uso de utensilios rudimentarios y métodos y aparatos primitivos para procesar la leche suponen un riesgo para la salud humana.

El manejo reproductivo está basado en la cubrición continua de ovinos y caprinos. En el vacuno destaca la presencia de pocos sementales adultos y un elevado número de añejos se destinan a cubrición natural, tanto para uso propio como para préstamo entre vecinos y amigos. Las referencias a la inseminación artificial se constatan en muy pocas ocasiones.

CONCLUSIONES

El sistema de salud animal está debilitado por la falta de programas permanentes de sanidad animal, lo cual potencia la aparición de patologías entre los animales. Las principales enfermedades encontradas son mamitis en ganado bovino, problemas digestivos en terneros, problemas respiratorios en pequeños rumiantes y aves, ectoparásitos en perros y problemas locomotores en caballos. La mayor parte de los problemas identificados se asocian a un manejo deficiente y a una inadecuada concepción de las instalaciones, lo que desencadena una situación de estrés que afecta al bienestar de los animales. Con respecto a la contaminación de los productos animales con destino a consumo humano, el mayor problema que se presenta son las enfermedades animales, los tratamientos para los que no ha transcurrido el tiempo de espera y las fuentes ambientales durante la producción y el almacenamiento de los alimentos. El bajo nivel de formación de los ganaderos pesa sobre el manejo de la granja, el estado de salud de los animales y la calidad y seguridad de los productos animales, especialmente de la leche. Sería interesante llevar a cabo una acción formativa anual de los ganaderos sobre el terreno, bien mediante proyectos, como el desarrollado por la UCV, bien por los veterinarios libaneses. Somos conscientes de la dificultad que ello comporta, pero sería la única manera de mejorar gradualmente la viabilidad de la ganadería en las zonas más desfavorecidas del sur de Líbano.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Universidad Católica de Valencia por establecer la colaboración con la Unidad de Cooperación Cívico Militar (CIMIC) del Ejército español y permitirnos disfrutar de esta extraordinaria experiencia. En segundo lugar, a la unidad de CIMIC, por su cálida acogida, por su trato, por toda la ayuda prestada y, sobre todo, por dejarnos desarrollar con absoluta confianza todas las tareas necesarias para llevar a cabo el presente trabajo.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Asmar RF. Country Pasture/Forage Resource Profiles. Roma, FAO. 2011:5-24.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations. National report on the situation of animal genetic resources in Lebanon. Líbano, FAO. 2012:1-3.
- [3] Ministry of Agriculture. Ministry of Agriculture Strategy 2015-2019. MOA. 2014:11-24.
- [4] Arcos GP, Cherri Z, Castro DR. The Lebanes-Syrian crisis: impact of influx of Syrian refugees to an already weak state. Risk Management and Healthcare Policy. 2016;9:165-72.
- [5] Centro de inteligencia de las Fuerzas Armadas. Manual de Área Líbano. Madrid, EMAD. 2010:1-139.
- [6] Haddad E, Chamoun N. Developing the typical dairy products of the Bekaa and Baalbeck-Hermel: diagnosis and local strategy. CIHEAM. 2014:1-47.
- [7] Ministry of Agriculture. The National Report on the Status of the Animal Genetic Resources In Lebanon. Beirut, MOA. 2004:2-31.
- [8] Government of Lebanon and the United Nations. Lebanon crisis response plan 2015-16. Líbano. 2014:3-17.
- [9] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Addressing in the Impact of the Syria Crisis & Food Security Response and Stabilization of Rural Livelihoods. FAO. 2014:1-42.
- [10] Rouda RR. Livestock Production in Southern Lebanon. Rangelands. 1992;14(2):115-18.
- [11] Oficina Económica y Comercial de España en Beirut. Líbano. Beirut. 2016:9.
- [12] Hamadeh S, Bistanji G, Darwish M, Abi Said M, Abi Ghanem D. Economic sustainability of small ruminants production in semi-arid areas of Lebanon. Small Ruminant Research. 2001;40:41-9.
- [13] Srouf G, Marie M, Abi Saab S. Performances productives des élevages caprins et ovins au Liban. CIHEAM. 2006;70:193-201.
- [14] Srouf G, Marie M, Abi Saab S. Agro-environmental sustainability of small ruminant production in Lebanon. Animal Science. 2004;1:1-5.
- [15] Horsi C, Nehme M. Small ruminant production systems in north Lebanon: technical and economic analysis. CIHEAM. 2006;70:11-116.
- [16] Protect and Provide Livelihoods in Lebanon: Small Ruminant Dairy Value Chain Assessment. MeryCrops. 2014:2-26.
- [17] Riwa D, Marwan M. Poultry Industry in Lebanon-Facing Foreign Competition. Blominvest bank. 2016:1-3.
- [18] Risks of transboundary animal diseases (TADs) outbreaks due to the conflict in Lebanon. EMPRES watch. 2006:1-6.
- [19] Dick C, Ghanem A, Hamadeh S. Adaptation strategies of small ruminants production systems to environmental constraints of semi-arid areas of Lebanon. Animal Science. 2008:115-17.
- [20] Food and Agriculture Organization of the United Nations. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Roma, FAO. 2010:58-79.
- [21] Beirne P, Kelty-Huber C. Los animales y la migración forzada. RMF. 2015;49:97-8.



Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	121-126	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	---------	--	----------------------	----------------

Influencia de la música en la estimación del tiempo: un análisis de componentes de respuesta en estudiantes universitarios

Influence of music in time estimation: an analysis of answer components in university students

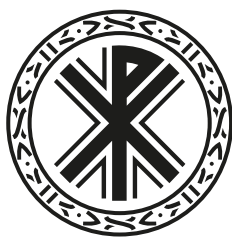
Fecha de recepción y aceptación: 24 de octubre de 2017, 25 de enero de 2018

J. S. Blasco-Magraner¹, G. Bernabé-Valero² y C. Moret-Tatay^{2*}

¹ Departament de Didàctica de l'Expressió Musical. Universitat de València.

² Facultad de Psicología, Magisterio y Ciencias de la Educación. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Psicología, Magisterio y Ciencias de la Educación. Calle Guillem de Castro, 175. 46008 Valencia. España. E-mail: maricarmen.moret@ucv.es



RESUMEN

El presente estudio trata de examinar el rol de la música en componentes de procesamiento obtenidos en tareas como la estimación del tiempo (tareas que tal y como describe la literatura contemplan diferentes aspectos cognitivos). Para ello, se seleccionó una muestra piloto de estudiantes universitarios de estudios musicales y una muestra similar de alumnos sin ninguna noción de música, con el fin de realizar la función de grupo de control, de forma voluntaria. Tras el análisis de los parámetros inherentes a una distribución ex-Gaussiana, se encontraron menores valores para los estudiantes de música frente a los controles. Esto sugeriría una mejor ejecución de este grupo, así como aspectos susceptibles de ser entrenados en este tipo de tareas, a partir de los estudios en música. No obstante, es necesaria una investigación más detallada en este ámbito.

PALABRAS CLAVE: *estudiantes de música, precisión, latencia de respuesta, parámetros ex-Gaussianos.*

ABSTRACT

The present study examines the role of music in latency components obtained through a time estimation task (one should bear in mind that this type of tasks have been related to cognitive processes in the literature). For this propose, a pilot sample has been selected where University students of music and a control group (without any notion of music) volunteered to take part. An analysis on the ex-Gaussian parameters has been carried out. Lower parameter values were found for the students of music in comparison with the control group. This might suggest a better execution for this group, as well as, some trainable aspects in this type of tasks, from music studies. However, more research in the field is necessary.

KEYWORDS: *music students, precision, response latency, ex-Gaussian parameters.*

En 2003, Conte y Jacobson relacionaron la conocida falacia de la planificación (en otras palabras, la tendencia a subestimar en el desarrollo de una tarea) con factores inherentes a la personalidad humana. En este sentido, los autores encontraron evidencia a favor de algunos tipos de personalidad con más probabilidades de llegar tarde al efectuar una peor estimación cognitiva de la variable. Precisamente, los tipos de personalidad A (generalmente descritos como personas impacientes, competitivas e incluso agresivas) tenderían a ser más puntuales que, por ejemplo, los tipo B (pacientes y relajadas). El interés de esta temática ha crecido en la última década, con aspectos relacionados con realizar o no varias tareas al mismo tiempo. Este fenómeno se conoce en la actualidad como *multitasking* y no ha tardado en popularizarse en relación con el uso de nuevos dispositivos y teléfonos móviles. En este sentido, la literatura ha mostrado evidencia sobre los resultados nocivos de dicho patrón, mostrando mayores tiempos a la hora de completar una tarea y tasas de error, incluso mostrando peores resultados académicos en estudiantes (Junco, 2012; Junco y Cotten, 2012). Por todo ello, consideramos de especial interés investigar aquellas variables, por ejemplo aptitudes, que pueden aportar beneficios en términos de precisión temporal.

La variable dependiente tiempo de reacción, con la que podríamos evaluar la estimación en una tarea, se ha descrito como subyacente a diferentes procesos cognitivos, entre los que encontraríamos estados atencionales y del aprendizaje (Moret-Tatay *et al.*, 2017). No obstante, diferentes investigadores coinciden en que la práctica musical podría fomentar dicha competencia. El objetivo de la presente investigación es examinar si la práctica de un instrumento musical influye en la capacidad de estimación temporal (Gordon, Fehd y McCandliss, 2015). Para determinar esta influencia se realizó un estudio piloto con estudiantes universitarios de música, y estudiantes controles sin ningún conocimiento de esta.

En el presente proyecto presentamos el ajuste ex-Gaussiano como una herramienta muy útil en el estudio de los componentes de procesamiento. La distribución se especifica mediante tres parámetros que se han relacionado con procesos cognitivos: μ , σ y τ . El primer y segundo parámetros (μ y σ) corresponden a la media y a la desviación estándar del componente ex-Gaussiano, mientras que el tercer parámetro (τ) es la tasa de decaimiento exponencial del componente. Tradicionalmente, Luce (1986) argumenta que la función ex-Gaussiana proporciona un buen ajuste para múltiples distribuciones de tiempo de respuesta empírica. Por otra parte, muchos investigadores se han centrado en estos parámetros y su posible relación con procesos cognitivos subyacentes. Matzke y Wagenmakers (2009) ofrecen una revisión de la interpretación de los parámetros ex-Gaussianos. Una de las obras más importantes sobre el tema es la investigación realizada por Leth-Steensen, Elbaz y Douglas (2000). Estos investigadores compararon grupos de niños con TDAH y controles, encontrando diferentes distribuciones con relación al parámetro τ . Los resultados proporcionan una evidencia clara sobre el papel del parámetro τ en la atención o aspectos ejecutivos que, a su vez, se ve respaldada por la literatura (Gu, Gau, Tzang & Hsu, 2013; Moreno-Cid *et al.*, 2015; Moret-Tatay *et al.*, 2014; Moret-Tatay *et al.*, 2016; West, Murphy, Armilio, Craik y Stuss, 2002). No obstante, autores como Sternberg y Backus (2015) sugieren cautela en la interpretación, ya que los parámetros presentan relaciones entre sí y, por tanto, no son independientes. El ajuste a esta distribución fue examinado en una tarea de precisión en músicos y no músicos, a efectos de evaluar la sensibilidad del ajuste.



MÉTODO

Participantes

Una muestra de cuarenta estudiantes universitarios realizó de forma voluntaria el presente experimento. Estos participantes se dividieron en dos grupos, según el principal criterio de inclusión: estudiantes de música y estudiantes sin ninguna noción de música. Concretamente, la muestra seleccionada para los no músicos estaba compuesta por veinte alumnos de los cuales el 20 % eran hombres y el 60 % eran mujeres. Por otro lado, la muestra seleccionada para músicos estuvo compuesta por un 30 % de hombres y un 70 % de mujeres. La edad media para ambos grupos fue de 21,5 años ($DE = 5,3$).

Procedimiento y materiales

La tarea se realizó mediante el software DMDX (Forster y Forster, 2003). Esta consistió en determinar la duración de un minuto presionando una tecla (M) del ordenador. El tiempo comenzó a contar a partir de la aparición de la palabra *inicio* en la pantalla, registrada la latencia de respuesta en términos de milisegundos. La tarea se realizó en una habitación libre de ruido e individualmente.

Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el lenguaje de programación R y concretamente el paquete estadístico «retimes» (Massida, 2013), a efectos de caracterizar la distribución ex-Gaussiana y sus parámetros inherentes. Además, se emplearon las funciones logLik y AIC, en término de máxima verosimilitud y criterios de ajuste distribución hiperbólica generalizada.

RESULTADOS

Como era de esperar, los estudiantes de música presentaron una mayor precisión en la estimación de un minuto que los estudiantes controles. Además, con la prueba *t* de *student* para grupos independientes, estas diferencias alcanzaron el nivel de significación estadística ($p < 0,001$). En la tabla 1 se muestra la estimación de parámetros ex-Gaussianos. Así mismo, en la figura 1 se presenta la función de densidad, claramente asimétrica positiva para el grupo de músicos. No obstante, la forma de distribución fue asimétrica negativa para el grupo control.



Tabla 1. Parámetros obtenidos por grupo (músicos y no músicos), así como otros indicadores de calidad del ajuste

Grupo/Parámetros	μ	σ	τ	γ	LogLik	AIC
Músicos (n = 20)	60.696,16	4.537,48	3.495,461	0,47	-197,67	401,35
No músicos (n = 20)	36.326,30	15.089,02	20.118,69	-1.01	-231,76	469,51

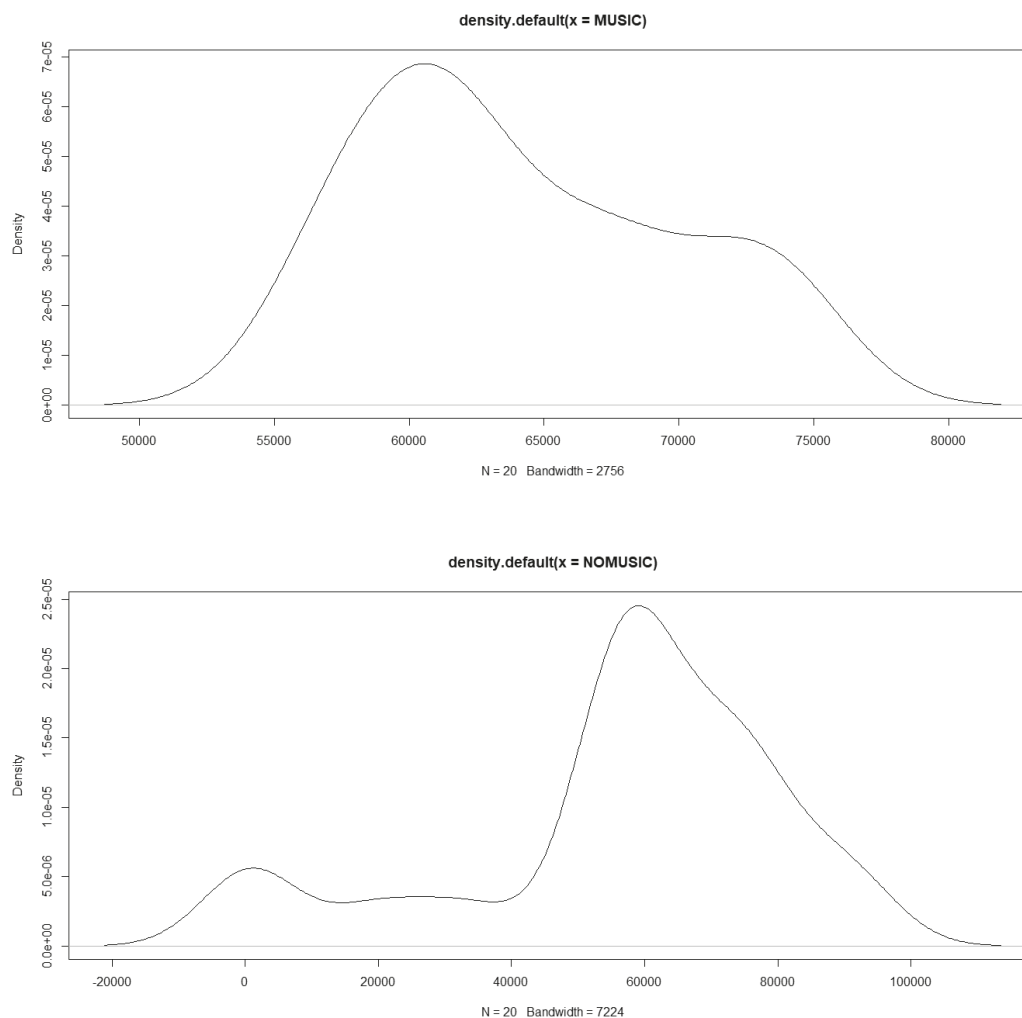


Figura 1. Distribución de densidad para los músicos y su grupo control.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La estimación del tiempo es un proceso que engloba diferentes procesos cognitivos, incluso de la personalidad humana. El interés en esta tarea ha crecido en la última década, debido a sus implicaciones en estudios como patrones de multitarea. En este sentido, el presente estudio trata de examinar variables como el estudio de la música y su impacto en la precisión de la estimación del tiempo. A efectos de evaluar la variable dependiente latencia de respuesta, se desarrolló el ajuste a una distribución ex-Gaussiana. Los resultados obtenidos sugieren: *i*) mejor ajuste para los sujetos músicos bajo estudio que los controles, *ii*) mejor ejecución en la estimación de los músicos que los controles y *iii*) valores menores en los parámetros de los músicos, concretamente en τ , que los controles. Todo esto, a su vez, podría sugerir que procesos de fuerte componente atencional podrían ser entrenados mediante variables como el desarrollo del estudio musical.

En lo que concierne a la forma de la distribución de los sujetos controles, cabe destacar que esta presentó problemas de ajuste, indicando en sí la dificultad de estos sujetos para realizar la tarea. Concretamente, este patrón no fue generalizado a todos los sujetos del grupo. Por ello, para futuras líneas de investigación, sería de gran interés incluir variables como la personalidad en el *screening* de los participantes. La principal limitación del presente estudios es la toma única de una variable. En futuras líneas de investigación se recomienda la inclusión del cálculo de diferentes intervalos de tiempo, así como variables de personalidad, entre otras. Pese a esta limitación, es interesante remarcar el ajuste del grupo de músicos a la distribución bajo estudio. Siguiendo lo estipulado en la interpretación de parámetros de componentes de procesamiento, como era esperable, estos mostrarían una ventaja generalizada de todos los parámetros frente al grupo control en la tarea bajo estudio.

REFERENCIAS

- [1] Conte JM, Jacobs RR. Validity evidence linking polychronicity and big five personality dimensions to absence, lateness, and supervisory performance ratings. *Human Performance*. 2003;16(2):107-29.
- [2] Forster, KI, Forster, JC. DMDX: A Windows display program with millisecond accuracy. *Behavior research methods, instruments, & computers*. 2003;35(1):116-24.
- [3] Gordon RL, Fehd HM, McCandliss BD. Does music training enhance literacy skills? A meta-analysis. *Frontiers in psychology*. 2015;6(1):777.
- [4] Gu SLH, Gau SSF, Tzang SW, Hsu WY. The ex-Gaussian distribution of reaction times in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Research in developmental disabilities*. 2013;34(11):3709-19.
- [5] Junco R. Too much face and not enough books: The relationship between multiple indices of Facebook use and academic performance. *Computers in human behavior*. 2012;28(1):187-98.
- [6] Junco R, Cotten SR. No A 4 U: The relationship between multitasking and academic performance. *Computers & Education*. 2012;59(2):505-14.



- [7] Leth-Steensen C, Elbaz ZK Douglas VI. Mean response times, variability, and skew in the responding of ADHD children: a response time distributional approach. *Acta psychological*. 2000;104(2):167-90.
- [8] Luce, RD. Response times: Their role in inferring elementary mental organization (No. 8). Oxford University Press on Demand. 1986.
- [9] Massidda D. Retimes: Reaction time analysis. R package version 0.1-2. 2013.
- [10] Matzke D, Wagenmakers EJ. Psychological interpretation of the ex-Gaussian and shifted Wald parameters: A diffusion model analysis. *Psychonomic bulletin & review*. 2009;16(5):798-817.
- [11] Moreno-Cid A, Moret-Tatay C, Irigaray TQ, Argimon II, Murphy M, Szczerbinski M, Fernández P. The role of age and emotional valence in word recognition: an ex-gaussian analysis. *Studia Psychologica*. 2015;57(2):83.
- [12] Moret-Tatay C, Leth-Steensen C, Irigaray TQ, Argimon I, Gamermann D, Abad-Tortosa D, de Córdoba Castellá PF. The effect of corrective feedback on performance in basic cognitive tasks: An analysis of RT components. *Psychologica Belgica*. 2016;56(4).
- [13] Moret-Tatay C, Lemus-Zúñiga LG, Tortosa DA, Gamermann D, Vázquez-Martínez A, Navarro-Pardo E, Conejero JA. Age slowing down in detection and visual discrimination under varying presentation times. *Scandinavian journal of psychology*. 2017;58(4):304-11.
- [14] Moret-Tatay C, Moreno-Cid A, Argimon IIDL, Quarti Irigaray T, Szczerbinski M, Murphy M, Fernández de Córdoba Castellá P. The effects of age and emotional valence on recognition memory: An ex-Gaussian components analysis. *Scandinavian journal of psychology*. 2014;55(5):420-26.
- [15] West R, Murphy KJ, Armilio ML, Craik FI, Stuss DT. 2002 Lapses of intention and performance variability reveal age-related increases in fluctuations of executive control. *Brain and cognition*. 2002;49(3):402-19.

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	127-136	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	---------	---	-------------------	----------------

Local levels of carbon monoxide in the urban air of San Miguel de Tucumán, Argentina

Niveles de monóxido de carbono en el aire urbano de San Miguel de Tucumán, Argentina

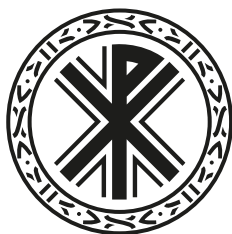
Fecha de recepción y aceptación: 25 de agosto de 2017, 30 de noviembre de 2017

E. A. Khouri¹, A. Elias¹, S. N. González^{1,2} and M. E. Arena^{1,2*}

¹ Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán (UNT).

² Instituto de Biotecnología Farmacéutica y Alimentaria - Centro Científico Tecnológico Tucumán - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (INBIOFAL - CCT CONICET - Tucumán).

* Correspondencia: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (INBIOFAL - CCT CONICET - Tucumán). Instituto de Biotecnología Farmacéutica y Alimentaria. Av. N Kirchner 1900. 4000 Tucumán. Argentina. E-mail: arename@fbqf.unt.edu.ar



ABSTRACT

Carbon monoxide, a highly toxic gas, is one of the most common and widely distributed air pollutants; in San Miguel de Tucumán, Argentina, the main sources of emission are the vehicle engines and the fire produced by the burning of cane fields. The objective was to evaluate the local levels of carbon monoxide (CO) concentration in the urban air of San Miguel de Tucumán during a period of 13 years. Four monitoring stations with high population concentration were selected. Testo 625 measuring instruments with specific probe for CO were used. The measurements were made during the months of September, October and November during the period 2003-2015. The concentrations of CO were compared using Variance analysis of Kruskal & Wallis and Conover post-test at 5 % significance. Minimum, maximum and Percentiles values (P25, P50 and P75) were considered. Results: No significant differences were observed in annual CO concentrations ($p = 0.7177$), with min = 24ppm, P25 = 28 ppm, P50 = 28.9 ppm, P75 = 32 ppm and maximum = 38 ppm. With significant differences in CO concentrations ($p < 0.001$) according to month and sampling season, higher values were detected in the month of November in Station 4 with min=27.0ppm, P25=30.7 ppm, P50=31.0 ppm, P75=33.2 ppm and maximum=38.0 ppm. Conclusion: The City of San Miguel de Tucumán is located in a mountainous area with little air movement, which means it has a notable accumulation of atmospheric pollutants, with high concentrations of CO in the microcenter of this city.

KEYWORDS: *Pollution, Microcenter, CO Concentration, Environmental health.*

RESUMEN

El monóxido de carbono (CO), gas altamente tóxico, es uno de los contaminantes atmosféricos más comunes y ampliamente distribuidos. En San Miguel de Tucumán, Argentina, las principales fuentes de emisión son los motores de vehículos y los incendios producidos por la quema de cañaverales. El objetivo de la presente investigación fue evaluar los niveles locales de concentración de CO en el aire urbano de San Miguel de Tucumán durante un período de trece años. Se seleccionaron cuatro estaciones de monitoreo con alta concentración poblacional. Se emplearon instrumentos de medición Testo 625, con sonda específica para CO. Las mediciones se realizaron

en los meses de septiembre, octubre y noviembre durante el período 2003-2015. Las concentraciones de CO se compararon empleando análisis de la varianza de Kruskal-Wallis y posttest de Conover al 5 % de significación. Se consideraron valores mínimos, máximos y percentiles P25, P50 y P75. Resultados: No se observaron diferencias significativas en las concentraciones anuales de CO ($p = 0,7177$), con $\text{min} = 24 \text{ ppm}$, $P25 = 28 \text{ ppm}$, $P50 = 28,9 \text{ ppm}$, $P75 = 32 \text{ ppm}$ y $\text{máximo} = 38 \text{ ppm}$. Con diferencias significativas en las concentraciones de CO ($p < 0,001$), según mes y estación de muestreo. Los mayores valores fueron detectados en el mes de noviembre en Estación 4, con $\text{min} = 27,0 \text{ ppm}$, $P25 = 30,7 \text{ ppm}$, $P50 = 31,0 \text{ ppm}$, $P75 = 33,2 \text{ ppm}$ y $\text{máximo} = 38,0 \text{ ppm}$. La ciudad de San Miguel de Tucumán se encuentra en zona montañosa, con escaso movimiento de aire, lo que determina una marcada acumulación de contaminantes atmosféricos, con concentraciones de CO elevadas en el microcentro de esta ciudad.

PALABRAS CLAVE: *contaminación, microcentro, concentración de CO, salud ambiental.*

INTRODUCTION

Carbon monoxide, a highly toxic gas, is one of the most common and widely distributed air pollutants. An important emission source is the vehicle engines due to incomplete combustion of hydrocarbons and carbon-containing substances, such as gasoline, diesel, etc. Other important sources of carbon monoxide formation are the fires produced by the burning of cane fields.

The province of Tucumán is considered the nucleus of communications of the Northwest region of Argentina and is located between latitudes of $S26^{\circ} 05'$ and $S28^{\circ} 01'$ and longitudes of $W64^{\circ} 28'$ and $W66^{\circ} 13'$. It has a population of approximately 2 million, with a population density of $64.2 \text{ inhabitants/km}^2$, and in particular $6,102 \text{ inhabitants/km}^2$ in San Miguel de Tucumán [1], which accumulates 81 % of the automotive fleet of the whole province [2] with an important annual increase [Image 1]. The second economic activity is the production of sugar from sugarcane, producing 64.3 % of the national total [3]. The harvest period is concentrated between the months of April and November. Even though there is a prohibition on burning cane plantations as an alternative method of harvesting (provincial law 6253), to date it was not possible to eradicate it, affecting the health of the population of San Miguel de Tucumán [Image 2].

Different investigations warn about the effect of different pollutants on the health of the population such as that published by Barnett et al. [4] where associations between atmospheric pollution and hospital admission for cardiovascular problems were estimated in patients older than 65 years. The study included several cities in Australia (Brisbane, Canberra, Melbourne, Perth and Sydney) and New Zealand (Auckland and Christchurch). Based on these results, of the pollutants considered: NO_2 , CO, suspended particles and O_3 , the most consistent pollutant/disease association corresponded to CO. When their air level differed by 0.9 ppm, they determined significant increases in cardiovascular diseases in general. The heterogeneity between cities with similar pollution was attributed to the different humidity conditions and to the proportion of adults considered in the study.

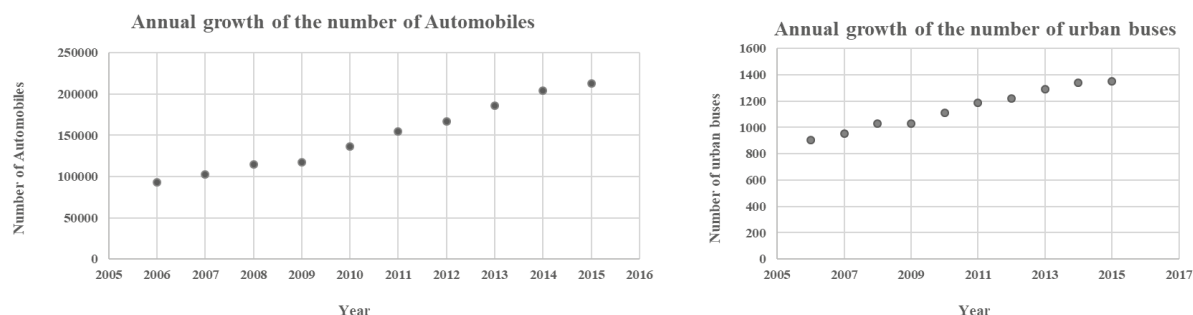


Image 1. Annual growth of the automotive fleet.

Source: National Observatory of Transport Data. Technological Center of Transportation, Traffic and Road Safety- Universidad Tecnológica Nacional de Avellaneda - Province of Buenos Aires. Upgrade. February 2017.

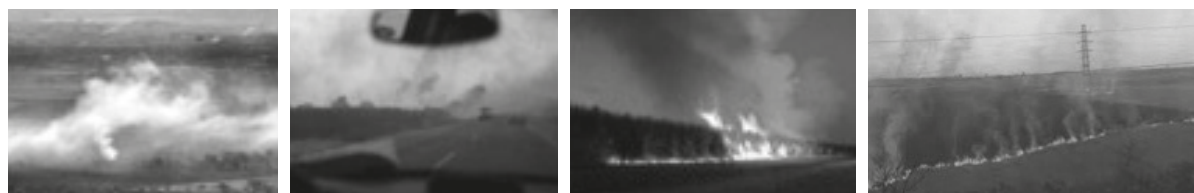


Image 2. Burning of sugar cane in Tucumán in the harvest period and its incidence on environmental pollution in September 2015.

Source: <http://www.lagaceta.com.ar/nota/584190/sociedad/por-polucion-aerea-tucumanos-somos-esclavos-antialergicos.html>.

In Argentina, the main cause of mortality is cardio-vascular diseases, and the fifth cause is chronic respiratory diseases [5]. To date, there are no studies that investigate the possible associations between CO and causes of mortality in Tucumán.

The allowed limit values of CO concentration in Argentina are presented in Table 1.

Table 1. Limit values of CO concentration in Argentina*

Pollutant (unity)	Quality standard of air	Alert	Alarm	Emergency
CO (ppm)	10 ppm – 8h	15 ppm – 8h	30 ppm – 8h	50 ppm – 8h
	50 ppm – 1 h	100 ppm – 1h	120 ppm – 1h	150 ppm – 1h

* Law No. 20,284, Plan for the Prevention of Critical Air Pollution Situations, Buenos Aires, April 16, 1973

Source: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/40000-4999/40167/norma.htm>.

Identifying the levels of maximum tolerable concentration provide the opportunity to take actions to protect the health of the general population. The aim of the present work was to evaluate the levels of carbon monoxide concentration (CO) in 4 stations of San Miguel de Tucumán during the period 2003-2015.

METHODS

Experimental, analytical, comparative and prospective design. Calibrated measuring instruments were used (Testo 625, with specific probe for CO), with a measurement range below 0 ppm and above 500 ppm. In addition, humidity and air temperature, direction and wind speed and solar radiation were considered.

The concentrations of CO were measured every 8 hours and expressed in parts per million (ppm). Four sampling points were selected from the microcenter of San Miguel de Tucumán, identified as E1 (corner of Córdoba and Muñecas), E2 (corner of September 24 and Salta), E3 (corner of Maipú and San Martín) and E4 (corner of May 25 and San Martín) [Image 3].



Image 3. CO sampling points, microcenter of San Miguel de Tucuman.

Source: <https://www.maps.google.com.ar>.

For the comparative study of CO concentrations by Month, week and sampling Point, the coding presented in the following Table was used.

Table 2. Coding by month, week and sampling point

Month and week*	Sampling point**	Month, week and sampling Point
S1	E1	1
S2	E2	2
S3	E3	3
S4	E4	4
O1	E1	5
O2	E2	6
O3	E3	7
O4	E4	8
N1	E1	9
N2	E2	10
N3	E3	11
N4	E4	12

* S: September; O: October; N: November. ** E1 (corner of Córdoba and Muñecas), E2 (corner of September 24 and Salta), E3 (corner of Maipú and San Martín) and E4 (corner of May 25 and San Martín).

Statistical analysis

Exploratory Data Analysis (EDA) techniques were used. For the comparison of the CO values Kruskal & Wallis nonparametric Variance analysis and Conover's Post-test at 5% significance were used.

RESULTS

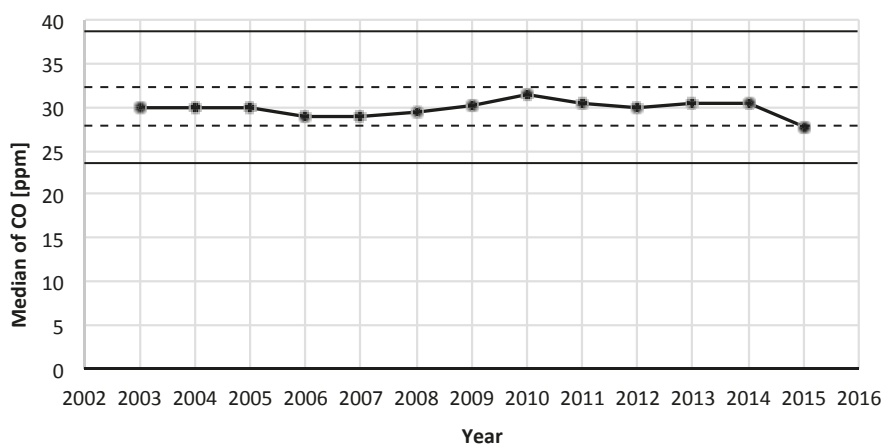


Figure 1. Annual evolution of CO, with bands of 50% of central data and extreme values, period studied 2003-2015. No significant differences between the Median annual CO concentrations were detected (Kruskal & Wallis, $p=0,7177$). With values in the alarm zone according to Table 1. Min. = 24 and Max. = 38. P25 = 28 and P75 = 32.



Table 3. Statistical measures of CO [ppm] concentration discriminated by year

Year	Average	Standard Deviation	Minimum	Maximum	P25	P50	P75
2003	30.6	5.1	21.5	40.0	27.0	29.6	33.2
2004	30.8	5.7	23.5	42.1	26.5	28.9	32.6
2005	30.6	5.1	21.5	40.0	27.0	29.6	33.2
2006	29.4	4.9	22.4	38.2	24.5	28.9	30.7
2007	29.4	4.9	22.3	38.2	24.5	28.9	30.7
2008	30.3	4.2	25.2	39.0	26.5	28.3	33.1
2009	31.1	5.5	25.6	41.4	27.0	29.8	32.1
2010	32.0	4.0	26.1	38.3	28.7	30.4	33.4
2011	29.5	4.2	23.5	36.1	25.0	30.1	31.2
2012	30.4	4.1	23.5	39.3	27.0	28.9	32.1
2013	29.6	2.6	23.5	32.3	27.5	30.3	31.0
2014	30.2	1.9	26.3	32.7	29.3	30.5	31.1
2015	27.9	1.9	24.5	30.5	26.3	27.6	28.9

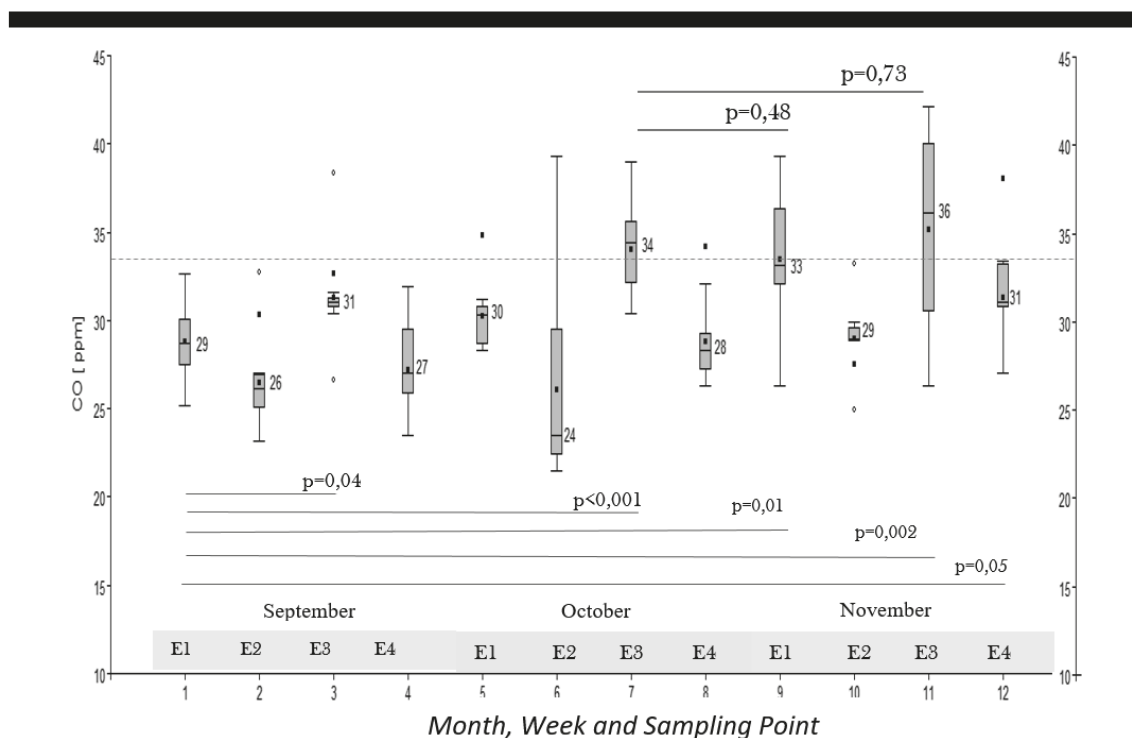


Figure 2. Distribution of CO concentration, according to month, week and sampling Point. Significant differences were observed in the medians of CO (Kruskal & Wallis non-parametric ANOVA and Conover's Posttest); highest concentrations observed in the month of November with values in the alarm zone according to Table 1.

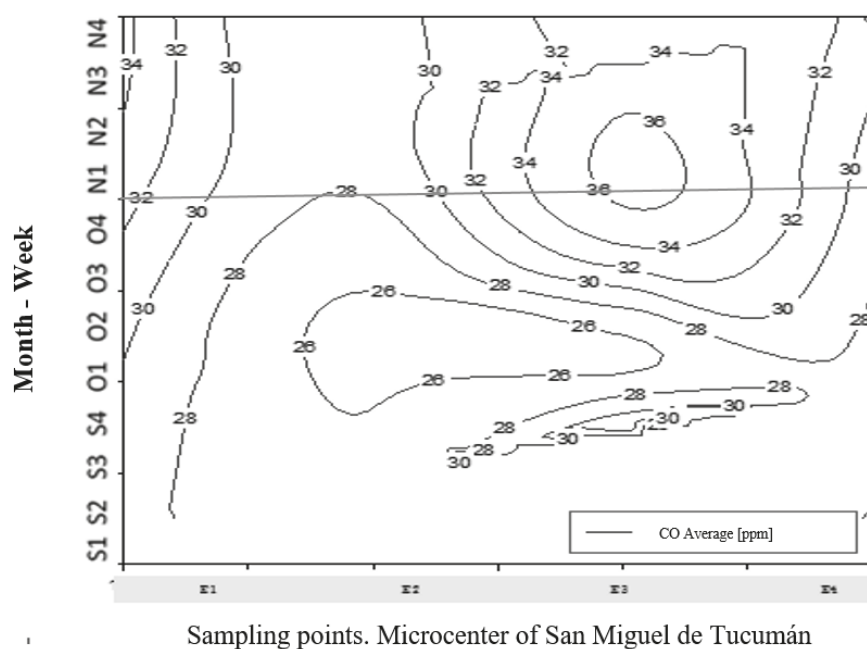


Figure 3. Distribution of CO concentration, according to month, week and sampling point. Highest concentrations observed in the month of November with values in the alarm zone according to Table 1.

Table 4. Statistical measures of CO [ppm] concentration discriminated by month, week and sampling point

Month, week and sampling point*	Average	Standard Deviation	Minimum	Maximum	P25	P50	P75
1	28.8	2.2	25.2	32.6	27.4	28.7	30.1
2	26.4	2.6	23.2	32.7	25.0	26.1	26.9
3	31.3	2.5	26.6	28.3	30.7	31.0	31.3
4	27.2	2.5	23.5	31.9	25.8	27.0	29.5
5	30.3	1.7	28.3	34.8	28.6	30.3	30.8
6	26.0	5.1	21.5	39.3	22.4	23.5	29.5
7	34.0	2.6	30.4	39.0	32.1	34.4	35.6
8	28.8	2.3	26.3	34.2	27.2	28.3	29.3
9	33.4	3.9	26.3	39.3	32.0	33.1	36.3
10	29.0	1.9	24.9	33.2	28.9	28.9	29.6
11	35.2	5.3	26.3	42.1	30.5	36.1	40.0
12	31.3	2.9	27.0	38.0	30.7	31.0	33.2

* Table 2. Month, Week and Sampling Point=9, 10, 11 and 12 correspond to the month of November.



DISCUSSION

International agreements such as the Paris Protocol, among others, contemplate the care of the environment including water and air. In compliance with these agreements, different countries implemented actions to protect the environment. It is possible to mention that for several years in Paris' district 15, a hot air balloon was placed to measure the air quality of this city and its surroundings, in real time changing color according to the level of contamination. Airparif, the organization in charge of weighting air quality in France, has permanent and semi-permanent stations distributed in the French capital and peripheral neighborhoods (<https://www.veoverde.com/2014/08/globo-aerostatico-mide-la-calidad-del-aire-en-paris/>). Nottingham is another city that also has a real-time air quality-monitoring center (<http://aqicn.org/map/united-kingdom/nottingham-centre/>).

In different studies, the levels of CO concentration are associated with vehicle emissions according to the type of fuel used. The use of better quality fuels usually leads to substantially low emissions of pollutants harmful to health and the amount of vehicle in the cities [6].

Fernández-Bremauntz et al. [7] studied the concentrations of CO in Mexico DF to determine the risk of street vendors. The reported values ranged between 2.0 and 70.0 ppm, with an average concentration of 26 ppm.

Another subsequent study by Fernández-Bremauntz and Ashmore [8] concluded that all CO dosages performed inside cars, minivans and minibuses had TWA (time-weighted average) of 35 ppm or more; The median values for the subway were the only ones that never exceeded the value of 35 ppm, which is the standard of air quality during 1 hour of exposure to CO. These results were consistent with data from few studies published in this regard. Cortese and Spengler [9] determined, in Boston, that the type of transport affected the levels of personal exposure to CO; car passengers were exposed to twice as much CO as public transport.

Chan and col. [10] studied the exposure to CO, in public transport, of the inhabitants of the urban area of Guangzhou (China) and determined similar levels (28.7 ppm) to those observed in San Miguel de Tucumán until 2009.

Previous studies denote a lower CO concentration in past decades. A study [1] conducted in Paris in the period 1991-1992 reported an average of 12 ppm of CO in the interior of cars in the center. In addition, the air quality was much better in the subways since they obtained averages of between 2-5 ppm. In the general urban environment, away from automobile traffic, the quantities are lower by a factor of 2 to 3. During the same day, the climatic conditions and the traffic density that affects the amount of gases emanating from vehicle leaks can explain the variations in the concentration of pollutants. The air quality-monitoring network in the region consists of 55 permanent stations located in the general environment or close to the traffic: intersections, sidewalks of narrow streets or avenues. According to this study, the concentrations registered in certain stations exposed to car exhaust pipes represented the exposure suffered by a city inhabitant. In this regard, they consider that the contribution of CO is such that its impact on health should be recorded by biomarkers, for example, CO level in air exhaled by specially exposed persons.

Dhakal [12] published a study on the increase of energy use in 4 relevant cities of China: Beijing Shanghai, Tianjin and Chongqing. The analysis showed that, in 2006, they were responsible for 84% of the total energy consumption of that country. He estimates that their growth will continue and

therefore the consumption of energy will also increase. However, there are no published studies related to the air quality of these cities evaluated with atmospheric CO levels.

The air quality in Nottingham, like that reported for Paris [11] is significantly better than the one determined for San Miguel de Tucumán. However, it should be noted that the studies in Nottingham and Paris date back 20 years and, given the global environmental problems, the current values could be very different.

Georgoulis et al. [13] reported the geometric mean of CO concentrations in different urban areas of Europe and determined values between 0.53 and 2.43 mg/m³ (0.43 and 1.97 ppm) for Helsinki (Finland), Basel (Switzerland), Prague (Czech Republic), Athens (Greece) and Milan (Italy), in ascending order; values significantly lower than those detected in San Miguel de Tucumán.

CONCLUSION

The City of San Miguel de Tucumán is located in a mountainous area, with little movement of air, which means it has a notable accumulation of atmospheric pollutants.

Comparing the initial and final values, obtained in the period studied (2003-2015), for the same time of the year, there was a statistically significant increase of CO in the microcenter of San Miguel de Tucumán.

The explanation of this increase could respond to the growth of the vehicle fleet as well as to the higher height of the recent building structures.

As palliative measures to such an increase and prevention in the future, it would be healthy to establish policies and strategies for control and application of air quality standards, in compliance with the regulations in force for the emission sources.

Special attention must be paid to public and private means of transport to achieve a clean atmosphere and a better quality of life.

The results of this research will serve as a regional and national reference, given the few bibliography on the subject under study and will provide the opportunity to initiate new lines of research, in which other pollutants that threaten environmental health can be considered.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support from the SCAIT-UNT, the Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

REFERENCES

- [1] Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, Presidencia de la Nación. Informes Productivos Provinciales, Tucumán. 2016. Año 1:1. Available in: https://www.economia.gob.ar/peconomica/dnper/fichas_provinciales/informe_productivo_tucuman.pdf



- [2] Dirección Nacional de los registros nacional des de la propiedad del automotor y de créditos prendarios. DNRPA. 2017. Available in: http://www.dnrpa.gov.ar/portal_dnrpa/estadisticas/boletas1/boletin0102/primera_seccion/pagina12.htm#provincia de tucuma.
- [3] Rios L, Perez G, Felipe A. El mercado azucarero Argentino y análisis Económico de la zafra azucarera en Tucumán, Campaña 2016-2017. INTA. 2017. Available in: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-el_mercado_azucarero_argentino_y_analisis_economico_de_la_zafra_azucarera_en_tucuman.pdf.
- [4] Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Best TL, Neller AH, Petroeschevsky AL, Simpson RW. The effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular disease in elderly people in Australian and New Zealand cities. *Environ. Health Perspect.* 2006; 114(7):1018-23.
- [5] Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Dirección Nacional de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades No transmisibles. 2013. Available in: <http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/vigilancia/areas-de-vigilancia/mortalidad>.
- [6] Smith KR, Apte MG, Yuqing M, Wongsekiarttrat W, Kulkarni A. Air pollution and the energy ladder in Asian cities. *Energy* 1994; 19(5):587-600.
- [7] Fernández-Bremauntz A, Ashmore MR, Merritt JQ. A survey of street sellers' exposure to carbon monoxide in Mexico City. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 1993; 3(1):23-35.
- [8] Fernández-Bremauntz A, Ashmore MR. Exposure of commuters to carbon monoxide in Mexico City II. Comparison of in-vehicle and fixed-site concentrations. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 1995; 5(4):497-510.
- [9] Cortese AD, Spengler JD. Ability of fixed monitoring stations to represent personal carbon monoxide exposure. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 1976; 23:1144-50.
- [10] Chan LY, Lau WL, Zou SC, Cao ZX, Lai SC. Exposure level of carbon monoxide and respirable suspended particulate in public transportation modes while commuting in urban area of Guangzhou, China. *Atmos. Environ.* 2002; 36: 5831-40.
- [11] Dor F, Le Moullec Y, Festy B. Exposure of city residents to carbon monoxide and monocyclic aromatic hydrocarbons during commuting trips in the Paris metropolitan area. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 1995; 45(2):103-10.
- [12] Dhakal, S. Urban energy use and carbon emissions from China and policy implications, *Energy Policy*, 37, 4208–4219, 2009.
- [13] Georgoulis LB, Hanninen O, Samoli E, Katsouyanni K, Künzli N, Polanska L, Bruinen de Bruin Y, Alm S, Jantunen M. Personal carbon monoxide exposure in five European cities and its determinants. *Atmos Environ.* 2002; 36(6): 963-74.

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación	10	137-147	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
---	----	---------	--	----------------------	----------------

Análisis de las alteraciones de la cáscara del huevo de gallina

Analysis of the alterations of the hen's egg shell

Fecha de recepción y aceptación: 14 de septiembre de 2017, 18 de diciembre de 2017

Ramiro Soler Castillo^{1*} y Joel Bueso Ródenas¹

¹ Departamento de Producción Animal y Salud Pública. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Departamento de Producción Animal y Salud Pública. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. *E-mail*: ramiro.soler@ucv.es.



RESUMEN

La avicultura de puesta es uno de los sectores ganaderos más importantes en España, donde se consumen alrededor de 210 huevos por persona y año, dato que refleja la gran importancia social de este alimento. El consumidor está cada día más concienciado sobre la calidad y la seguridad alimentaria de los productos que consume. La calidad del huevo se determina por el control de su calidad interna y por la ausencia de defectos externos sobre la cáscara. Las alteraciones de la cáscara van a depender de varios factores: edad de la gallina, manejo y situaciones de estrés, nutrición y patologías. Estos factores van a tener una influencia en el aspecto externo del huevo y en su seguridad alimentaria, lo que, en definitiva, podría suponer su retirada de la cadena de consumo. Este artículo revisa la influencia de la fase productiva de la gallina en la incidencia de presentación de alteraciones en la cáscara de los huevos que vayan a causar una merma de su valor económico.

PALABRAS CLAVE: *metabolismo del Ca, estrés en gallinas, huevo roto.*

ABSTRACT

Poultry farming is one of the most important livestock sectors in Spain, where about 210 eggs are consumed per person per year, a fact that reflects the great social importance of this food. The consumer is more and more aware of the quality and food safety of the products. The quality of the egg is determined by the control of its internal quality and by the absence of external defects on the shell. The alterations of the shell will depend on several factors: age of the hen, handling and situations of stress, nutrition, pathologies. These factors are going to have an influence on the external appearance of the egg and on its food security, which, in short, can mean its withdrawal from the consumption chain. This article makes a review of the influence of the productive phase of the hen in the incidence of presentation of alterations in the shell of the eggs, which will cause a decline in their economic value.

KEYWORDS: *Ca metabolism, stress in hens, cracked egg.*

INTRODUCCIÓN

La avicultura es una de las primeras actividades ganaderas de las que se tiene constancia. Se originó a partir de la domesticación de especies de gallináceas salvajes asiáticas. Estas gallinas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) llegaron a España durante las invasiones celtas. A lo largo de la historia la avicultura ha estado basada en la cría de estas gallinas domésticas en sistemas de producción de tipo familiar de reducido volumen, cuyo mayor objetivo era el autoconsumo [1]. Las instalaciones empleadas y el manejo sanitario, nutricional y reproductivo de los animales hacían que los rendimientos productivos de fueran discretos. En los años cincuenta del siglo xx se produce un rápido desarrollo económico en España, acompañado de un marcado éxodo rural. Esto determina un aumento del consumo por parte de los españoles de productos de origen animal. En este sentido, la especie más desarrollada fue la de los monogástricos, entre ellos la avicultura de puesta, que ofrece un flujo de producción rápido y constante. Además, la intensificación de estos sistemas de producción hace que no necesiten grandes extensiones de terreno para su viabilidad. Rápidamente, tomando como referencia el modelo productivo de EE. UU., la avicultura de puesta en España sufre una serie de transformaciones y, progresivamente, se introducen mejoras en nutrición, sanidad, tecnología para el manejo y genética. Así, se introdujeron aspectos como el empleo de nuevos ingredientes en las raciones, programas de vacunación y de detección de enfermedades, los sistemas de baterías de jaulas y la introducción de estirpes genéticas especializadas en la producción de huevos. En este sentido, nuestro país es uno de los principales productores de huevos de toda la Unión Europea en la actualidad, representando un 12 % de la producción comunitaria [2]. Los huevos se consideran un producto básico en la cesta de la compra, y su consumo mantiene una tendencia bastante constante. Esta importancia se ve reflejada en que en España el consumo per cápita de huevos se sitúa en los 13,7 kg/habitante y año, de los cuales 8,57 kg son consumidos en los hogares, principalmente a modo de huevo fresco [2].

Actualmente, el censo de gallinas ponedoras en España se sitúa en torno a los cuarenta y cuatro millones de aves. Su evolución se ha caracterizado por una estabilidad durante casi diez años, en valores cercanos a los cuarenta y cinco millones de gallinas, aunque se vio afectada por la entrada en vigor de la Directiva 199/74/CE, del 1 de enero de 2012, que regula las condiciones del bienestar de las gallinas ponedoras, lo que provocó la desaparición de muchas explotaciones y, por lo tanto, produjo una caída muy marcada del censo. En los últimos años esta caída se ha ido corrigiendo, con subidas contantes, aproximándose a los valores censales anteriores a 2012.

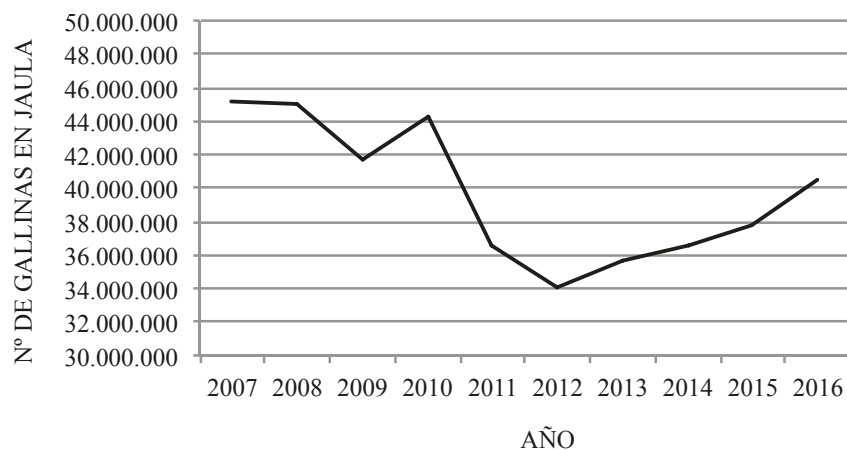


Figura 1. Evolución del censo de gallinas alojadas en jaulas en el intervalo 2007-2016.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos del MAPAMA.

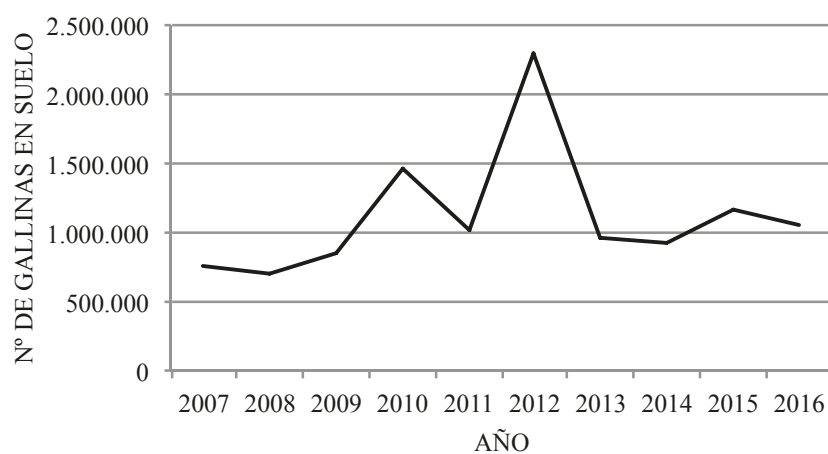


Figura 2. Evolución del censo de gallinas alojadas en suelo en el intervalo 2007-2016.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos del MAPAMA.



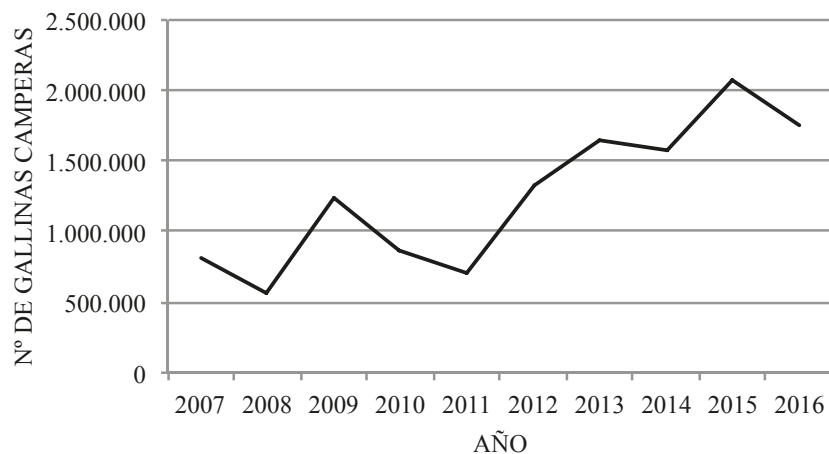


Figura 3. Evolución del censo de gallinas camperas en el intervalo 2007-2016.
Fuente: Elaboración propia a partir de datos del MAPAMA.

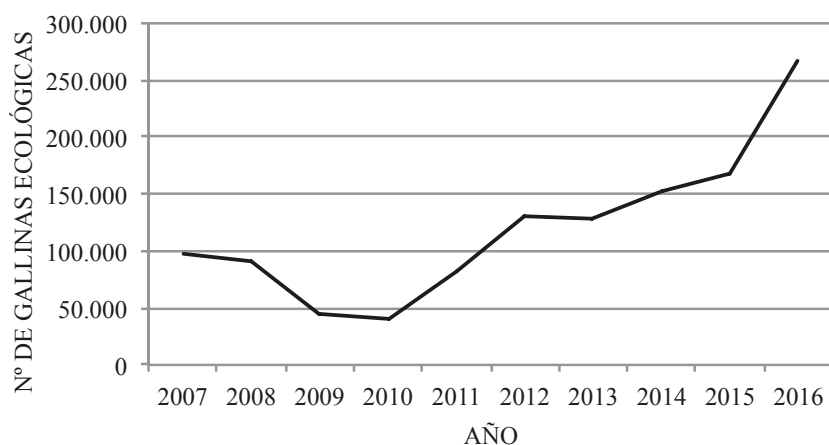


Figura 4. Evolución del censo de gallinas ecológicas en el intervalo 2007-2016.
Fuente: Elaboración propia a partir de datos del MAPAMA.

En la actualidad, la producción de huevos en la UE está basada en cuatro tipos de sistemas: en jaula enriquecida, en suelo, camperas y ecológicas. Los huevos producidos en cada uno de los sistemas se identifican con un dígito, siendo 0 para ecológicas, 1 para camperas, 2 para gallinas criadas en el suelo y 3 para gallinas alojadas en jaulas enriquecidas. El grueso de la producción de huevo lo supone la producción en jaula. La tendencia actual es hacia una mayor preocupación del consumidor por los temas de bienestar de las aves, dato que se ve reflejado en el aumento del censo de gallinas alojadas

en sistemas de cría no convencionales (figuras 3 y 4), con un aumento, en los últimos seis años, del 246,27 % en gallinas camperas y del 327,72 % en gallinas ecológicas (datos del MAPAMA).

Es por ello por lo que la producción de huevo en el futuro inmediato se va a centrar en cuatro pilares básicos [1]:

- Rentabilidad: la producción debe ser rentable desde el punto de vista económico, manteniendo un alto nivel de competitividad en el mercado exterior.
- Sostenibilidad medioambiental: basada en la protección del medio ambiente, el control de residuos y su tratamiento.
- Bienestar animal: centrado en la máxima atención al cuidado de las aves, respetando sus interacciones sociales y la relación con su entorno.
- Seguridad alimentaria: se trata de ofertar al mercado productos sanos, saludables y de calidad, garantizando la seguridad alimentaria y la protección de los consumidores.

FISIOLOGÍA DE LA FORMACIÓN DE LA CÁSCARA DEL HUEVO

El huevo de gallina tiene un periodo de formación de unas veinticinco horas de duración, en las que aquel progresa por las distintas partes del oviducto, siguiendo un cronograma por fases secuencial [3].

Dehiscencia folicular (ovulación)

Los folículos ováricos maduran en series ovulares de 8 a 10 folículos, con un desfase inicial de 24 a 26 horas, que marca la cadencia de maduración. La ovulación está regulada por la acción de la hormona hipofisaria luteinizante (LH) que provoca la liberación del ovocito, con la posterior atrofia y desaparición del folículo vacío. Al contrario que entre los mamíferos, en las gallinas no se forma un cuerpo lúteo secretor de progesterona. Tras la ovulación el ovocito o yema es captado rápidamente por el infundíbulo. En virtud de estímulos externos, como el fotoperiodo, el hipotálamo secreta el factor liberador de las gonadotropinas (GnRH). Esta hormona se libera a la hipófisis, en la que se producen dos hormonas: la hormona folículo estimulante (FSH), la cual, junto con factores de crecimiento, estimula el desarrollo folicular, y la LH, la cual induce a la ovulación. Su secreción se estimula por la progesterona, sintetizada por las células de la granulosa de los folículos de mayor tamaño, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva [3].

Formación de la clara

La clara se forma en el *magnum* y es, básicamente, una solución acuosa de proteínas (ovoalbúmina, avidina y lisozima). El ovocito permanece en este unas tres horas y media, rodeándose de la clara, que se encuentra en él poco hidratada, conteniendo solo 18 g de agua y unos 5 g de proteínas. En esta fase se forman las chalazas, filamentos espirales de clara densa por la torsión de fibras de mucina [4].



Plumping y formación de las membranas testáceas

En el istmo se inicia el *plumping* o proceso de rehidratación de la clara, en el que se duplica el contenido en agua de esta, adicionándose minerales como Na^+ , P, NaHCO_3 . La hidratación del albumen finaliza en el útero [4]. Las membranas testáceas o fáfara son dos finas membranas inseparables que rodean la yema y la clara, formadas por fibras proteicas en el istmo, permeables, y que recubren internamente la cáscara. Sobre ellas se depositan los cristales de CaCO_3 que van a dar lugar a la mineralización de la cáscara [4].

Formación y pigmentación de la cáscara

Se forma en el útero una vez finalizado el proceso de *plumping*. Es un proceso que dura de catorce a quince horas. La deposición de carbonato cálcico es constante, con un ritmo de 0,3-0,35 mg/h, esencialmente en horario nocturno (de las 18 a las 8 horas), ya que comienza unas diez horas después de la ovulación, que se produce generalmente por la mañana. El CaCO_3 se deposita sobre la membrana testácea externa, procediendo de la unión, en el líquido uterino, del Ca con el HCO_3^- , producido en las glándulas calcíferas por hidratación del CO_2 gaseoso en presencia de anhidrasa carbónica [5,6]. La pigmentación de la cáscara está condicionada por la genética de la estirpe. Se produce por depósito de protoporfirinas derivadas de la hemoglobina, al final del proceso de calcificación. La producción de pigmento es mayor en aves jóvenes [7,8].

Ovoposición

Una vez concluida la formación de la cáscara, el huevo abandona el útero, ayudado por las contracciones uterinas, llegando a la vagina. La puesta se realiza a través de la cloaca, pero no hay contacto con ella gracias a un prolapso fisiológico momentáneo. Este proceso está controlado por las prostaglandinas E y F. El huevo abandona la vagina húmedo y a 41-42 °C, con lo que sufre un proceso de enfriamiento que provoca la separación de las membranas testáceas en el polo obtuso, formándose la cámara de aire [4].

ESTRUCTURA DE LA CÁSCARA

En su composición química, la cáscara presenta un 98,4 % de materia seca, de la que únicamente un 3,3 % es orgánica (colágeno). El contenido mineral está predominantemente compuesto por CaCO_3 (98 %), depositado en su forma más estable: la calcita [3]. También incorpora un 1 % de MgCO_3 y un 1 % de CaHPO_4 [5].

De acuerdo con su estructura histológica, la cáscara presenta tres capas [4]: la capa más interna, o capa mamilar, unida a la membrana testácea externa por puentes de queratina (compuesta únicamente por CaCO_3), y que representa un tercio del espesor total, con una estructura de conos sobre los



que se realiza la calcificación; la capa intermedia, esponjosa o en empalizada, formada por cristales de CaCO_3 y Mg, y de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, dispuestos en forma de columnas o empalizada, unidas por fibras colágenas elásticas, siendo importante destacar que estas columnas dejan unos espacios o poros, en número de 7.000 a 15.000, imprescindibles para el intercambio gaseoso; y la capa más externa o cutícula, formada por una membrana orgánica compuesta por glucoproteínas, con función de barrera protectora antimicrobiana, que pierde la humedad y desaparece entre los dos y cuatro días después de la ovoposición.

Revisten especial importancia en el desarrollo de la cáscara la fisiología y el origen del Ca, ya que la formación de la cáscara implica la aportación de unos 2,3 g de Ca por huevo, lo que corresponde a entre 8 y 10 % del contenido corporal de Ca. El 98 % del Ca se encuentra en los huesos, pero la participación de estos últimos está limitada por el aporte directo de Ca alimentario absorbido a nivel intestinal[4]. La principal fuente de Ca la constituye la dieta, almacenándose Ca en los huesos durante los periodos en los que no se está formando la cáscara, a modo de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [5]. Durante el inicio del proceso de formación de la cáscara, la gallina multiplica por dos su capacidad de absorción intestinal de Ca, ayudada por la acción de la vitamina D, pasando durante la formación de la cáscara del 40 al 80 %. La calcificación de la cáscara se produce en el útero, mientras el huevo se encuentra bañado en el fluido uterino. En este fluido uterino, el Ca y los HCO_3^- se encuentran en condiciones de hipersaturación, de modo que es posible la precipitación espontánea de Ca. La finalización de la precipitación y depósito del Ca se produce unas dos horas antes de la ovoposición, y la liberación de P al medio uterino, inhibidor de la formación de calcita, tiene un papel fundamental [4].

PRINCIPALES ALTERACIONES DE LA CÁSCARA

Se considera que la calidad de la cáscara del huevo se determina mediante distintos factores: la textura, el color, la forma, la limpieza y la fortaleza. La cáscara debe ser suave, limpia y libre de roturas, y uniforme en color, forma y tamaño [9].

Las alteraciones más frecuentes, expresadas en porcentaje sobre el total de huevos producidos, son las siguientes:

- grandes roturas (por grandes impactos o impactos sobre cáscaras frágiles; frecuencia entre el 1 y el 5 %);
- microfisuras longitudinales (fisuras no visibles; frecuencia entre el 1 y el 3 %);
- fisuras en estrella (producidas por impactos; frecuencia entre el 1 y el 2 %);
- huevos en fáfara fuente (frecuencia entre el 0,5 y el 6 %);
- huevos rugosos (frecuencia entre el 0 y el 1 %);
- huevos arrugados (frecuencia entre el 0 y el 2 %);
- huevos en torpedo (frecuencia entre el 0 y el 1 %);
- huevos anillados (frecuencia entre el 1 y el 9 %), y
- huevos sucios de sangre, de heces, de uratos o por marcas de la jaula [9].



En un estudio realizado recientemente en gallinas alojadas en jaulas enriquecidas, se observan unas medias de un 5,07 % de huevos sucios y un 3,02 % de huevos fisurados o con roturas, sobre el total de huevos producidos, en gallinas alojadas en jaulas enriquecidas [10].

PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA CÁSCARA

La edad de las gallinas va a ser un factor determinante, ya que las gallinas de más edad, en las fases finales de su curva de puesta, van a dar lugar a una mayor incidencia de cáscaras frágiles, por aumento del tamaño del huevo y por menor eficiencia en el proceso de calcificación. Ello va a provocar roturas, desde fisuras a roturas grandes. También se ve afectado el depósito de protoporfirinas, lo que da lugar a huevos decolorados [11]. En aves jóvenes, con el útero juvenil o inmaduro, se pueden producir huevos en fáfara, por deficiencias del depósito de CaCO_3 [12].

El nivel de bienestar de las gallinas va a condicionar todo el sistema productivo, debido a que el estrés, cualquiera que sea su origen, provoca una gran alteración de la fisiología del ave, afectando muy negativamente a la puesta [12]. La respuesta al estrés va a estar regulada por el sistema neurovegetativo o autónomo, que controla los movimientos involuntarios de los órganos internos, como el corazón y circulación sanguínea, peristaltismo intestinal y genital, micción y defecación, movimientos respiratorios y las secreciones internas [13]. El sistema neurovegetativo se compone de dos grupos de nervios antagónicos: sistema simpático y sistema parasimpático, entre los cuales se establece un equilibrio que no es estable y se altera con facilidad ante situaciones estresantes. Este desequilibrio es, casi siempre, favorable al sistema simpático [13]. En el aparato genital el sistema neurovegetativo no solo controla las ovulaciones y el tránsito del huevo, sino que tiene que regular los periodos o tiempos de espera exactos en cada parte del oviducto para finalmente expulsar el huevo. Estas funciones están gobernadas por un sistema de músculos lisos que son gobernados por el sistema nervioso autónomo, de modo que son posibles situaciones antagónicas, como relajación o espasmo [13]. Este sistema neurovegetativo es muy lábil e incontrolable y sus desórdenes afectarán a la morfología del huevo, calcificación, etc. Se pueden dar situaciones de relajación del útero que provocarán huevos globo, con un índice morfométrico <75 ; espasmos uterinos, que darán lugar a huevos en torpedo, con un índice morfométrico >75 ; secuencias de tránsito rápido, que van a dificultar la calcificación, observándose huevos frágiles, proclives a la rotura; etapas de tránsito lento, incluso con retenciones, que provocarán la aparición de huevos hipercalcificados, que presentan una capa de Ca adicional, bien alrededor de toda la cáscara o solamente en uno de sus extremos; huevos diana, que son el resultado de dos huevos que entran en contacto en el útero, con lo que se interrumpe la calcificación normal, y huevos con cáscara granulosa, con pequeñas protuberancias de material calcificado.

Es posible determinar varios tipos principales de estrés que van a afectar a la producción de huevos:

- Estrés por deficiencias en el alojamiento o en el manejo: las malas condiciones de las instalaciones y su deficiente mantenimiento, así como manejos incorrectos, van a provocar estados alterados en las aves. Se van a producir huevos picados, sucios y débiles.
- Estrés térmico: la temperatura ambiente óptima para la producción de huevos es de 24 °C. Las altas temperaturas ambientales obligan a las aves a aumentar su frecuencia respiratoria hasta



más de doscientos ciclos por minuto, para tratar de refrigerar su organismo, ya que las aves carecen de glándulas sudoríparas. Esta hiperventilación provoca un aumento de la eliminación de CO_2 en sangre, induciendo un estado de alcalosis y aumentando la eliminación de HCO_3^- a través de la orina. Como consecuencia de los anteriores factores, se reduce la concentración disponible de Ca y HCO_3^- , lo que genera la aparición de huevos con cáscaras débiles, delgadas y en fáfara [6].

- Estrés social: el establecimiento de la jerarquía y la competencia entre gallinas provocan situaciones de nerviosismo que dan lugar a huevos picados o manchados de sangre, a consecuencia del picaje y canibalismo entre aves, así como a huevos frágiles por deficiente acceso al pienso.

Los desequilibrios alimenticios condicionan negativamente la formación de la cáscara [14]. Las necesidades energéticas de las gallinas ponedoras se deben determinar correlacionándolas con el balance nitrogenado del ave, utilizándose la energía metabólica aparentemente corregida en nitrógeno fuente (EMA). Las necesidades energéticas dependerán del peso del ave, de la temperatura del gallinero, del aumento del peso corporal de la gallina y de la producción de huevos [15]. Respecto a las necesidades nitrogenadas, en la actualidad se formula según la digestibilidad de los aminoácidos esenciales (Lys, Met, Met+Cys, Trp, Thr). Reviste especial importancia la ingesta de Ca en la dieta, condicionada por la concentración y por su presentación. La gallina debe ingerir entre 3,6 y 4,2 g/día en condiciones normales, a modo de CaCO_3 ; entre el 50 y el 70 % del Ca debe tener una granulometría de 2 a 4 mm de diámetro, debiéndose aportar el resto en forma de polvo, para evitar desmezcla. Los niveles de P, Na, K y Cl deben ser ajustados para evitar la aparición de huevos con cáscaras delgadas y débiles [15].

Las lesiones propias de los procesos patológicos y el estrés resultante de cualquier enfermedad pueden traer como consecuencia una pérdida de calidad del huevo. Las principales enfermedades responsables de alteraciones en la cáscara son:

- Bronquitis infecciosa aviar: se trata de una enfermedad viral, producida por un coronavirus, de curso agudo, caracterizada por alteraciones respiratorias, renales y caídas de producción, con alteración en la calidad de los huevos. Los huevos van a presentar cáscaras débiles, arrugadas y deformadas, debido a una intensa congestión en el oviducto, con pérdida de cilios en su mucosa [16].
- Micoplasmosis aviar: producida principalmente por *Mycoplasma gallisepticum*, cursa con síntomas respiratorios agudos, con una fuerte caída de la puesta, con presencia de huevos débiles, propensos a sufrir roturas, decolorados e incluso en fáfara, debido a la salpingitis, frecuentemente con contenido de exudado espumoso, que provoca este patógeno [17].
- Síndrome de caída de la puesta: causada por el único miembro del subgrupo III de los adenovirus aviáres. Principalmente ocasiona fallo de puesta, con presencia de huevos con la cáscara delgada, frágil o en fáfara. La afectación del útero y del ovario, con edemas e incluso la atrofia de estos, es la lesión característica del proceso [18].
- Laringotraqueitis: producida por un alphaherpesvirus, cursa con intensa disnea, tos, jadeo y expectoración de exudado sanguinolento. Provocará alteraciones en la cáscara similares a las observadas en la micoplasmosis aviar [16].



CONCLUSIONES

La supervisión de las alteraciones de la cáscara representa una parte importante del control de calidad que se debe realizar sobre los huevos destinados a consumo humano.

Las principales causas de alteración de la cáscara, tales como el manejo, el estrés, la alimentación y las patologías, han de ser la base de la actuación veterinaria en las explotaciones de gallinas de puesta.

Son necesarios posteriores estudios que correlacionen la presencia de alteraciones de la cáscara con los diferentes estados de las fases productivas de las gallinas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Estévez R. Avicultura de puesta: Situación productiva actual, adaptación legislativa y perspectivas de futuro. *Selecciones Avícolas*. 2011;53(9):7-11.
- [2] INPROVO. Producción de huevos en España [Internet]. [Consultado: 9 de enero de 2018]. Disponible en: <http://inprovo.com/sector-economico/produccion-de-huevos-en-espana/>.
- [3] Barroeta AC. El huevo de gallina. En: Castelló, JA. Producción de huevos. Arenys de Mar: Real Escuela de Avicultura. 2010:15-41.
- [4] Cepero R. Las bases de la formación del huevo. En: Buxadé, C. *Zootecnia*. Tomo V. Madrid, Mundiprensa. 1995:79-95.
- [5] Jones DR, Musgrove MT, Anderson KE, Thesmar HS. Physical quality and composition of retail shell eggs. *Poult Sci*. 2010;89:582-87.
- [6] Corona JL. Efecto del estrés calórico sobre la fisiología y calidad del huevo en gallinas ponedoras. *REDVET* [Internet]. 2013;7(14). [Consultado: 23 enero de 2018]. Disponible en: <http://veterinaria.org/revistas/redvet/n070713/071308.pdf>.
- [7] Charlton BR, Tiwary AK, Bickford AA, Filigenzi M. Acute depigmentation of fertile brown eggs in a commercial layer operation. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2005;17:286-88.
- [8] Samiullah S, Roberts JR. The location of protoporphyrin in the eggshell of brownshelled eggs. *Poultry Science*. 2013;92:2783-88.
- [9] Coutts JA., Wilson GC. *Optimum Egg Quality: A practical approach*. Sheffield (Great Britain): 5M Publishing. 2007.
- [10] Hernández A. Jaulas enriquecidas y sistemas de detección de calidad de cáscara del huevo: resultados preliminares. Presentado en 50th Spanish WPSA branch symposium. Lleida. Spain. 2013.
- [11] Mertens K, Vaesen I, Loffel, J, Kemps B, Kamers B, Perianu C. *et al*. The transmission color value: a novel egg quality measure for recording shell color used for monitoring the stress and health status of a brown layer flock. *Poultry Science*. 2010;89:609-17.
- [12] Ortiz A, Mallo JJ. Factores que afectan a la calidad externa del huevo. *Rev. Albéitar*. 2013;170:19-20.
- [13] Pradenas CA. Efecto del estrés adrenérgico sobre la calidad de la cáscara del huevo de las gallinas. Tesis doctoral. Santiago de Chile. 2001.
- [14] Lay DC, Fulton RM, Hester PY, Karcher DM, Kjaer JB, Mench JA. Hen welfare in different housing systems. *Poult Sci*. 2011;90(1):278-94.



- [15] Navalon, JL. Nociones de racionamiento en gallinas ponedoras comerciales. En: Buxadé, C. *Zootecnia*. Tomo V. Madrid. Mundiprensa. 1995:283-304.
- [16] Girón J. Enfermedades víricas con sintomatología respiratoria. En: Castelló JA. «Higiene y Patología Aviar». Arenys de Mar. Real Escuela de Avicultura. 2006:131-160.
- [17] Biarnes MM. Micoplasmosis, Coriza y Colibacilosis. En: Castelló JA. «Higiene y Patología Aviar». Arenys de Mar. Real Escuela de Avicultura. 2006:63-77.
- [18] Girón J. Enfermedades víricas generalizadas. En: Castelló JA. «Higiene y Patología Aviar». Arenys de Mar. Real Escuela de Avicultura. 2006:161-87.



<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	149-159	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

Principales patologías causantes de decomisos en ganado equino destinado a consumo humano

Main pathologies causing confiscation of equine livestock intended for human consumption

Fecha de recepción y aceptación: 3 de noviembre de 2017, 4 de febrero de 2018

Carla Ibáñez Sanchis^{1*}, Marta Parra Escribano¹ y Antonio Calvo Capilla²

¹ Departamento de Producción Animal y Salud Pública. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. E-mail: carla.ibanez@ucv.es



RESUMEN

El caballo es un animal herbívoro que se utiliza para diversos fines, siendo uno de ellos la producción de carne destinada a consumo humano. A nivel mundial, la producción de carne de caballo está liderada por Asia, dejando a Europa en tercer lugar. España no es un país con gran tradición de consumo de esta carne, aun así, 18.275 explotaciones se dedican a ello, sacrificando 52.908 caballos al año. Concretamente, en la Comunidad Valenciana se sacrifican 6.368 caballos aproximadamente cada año. El objetivo del presente estudio es poder determinar, mediante la inspección *ante mortem* y *post mortem*, las causas de los principales decomisos producidos en el ganado equino destinado a consumo humano, reconociendo las lesiones y realizando el dictamen pertinente en cada uno de los órganos y partes del animal. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio experimental en el que se han inspeccionado 794 caballos durante el año 2016 y los meses transcurridos de enero a abril de 2017. Se han recogido datos de las inspecciones realizadas durante la jornada laboral en el llamado "Parte diario de inspección de equino", donde se registran cada uno de los decomisos generados y sus causas. Conociendo los sacrificios y la cantidad de decomisos realizados, se observa que el decomiso total queda relegado a un segundo plano y que el decomiso parcial es el predominante. El pulmón es el decomiso parcial más habitual, seguido del hígado. Las principales patologías causantes de decomisos son las neumonías y en un número elevado de casos se decomisan por decisión del veterinario oficial.

PALABRAS CLAVE: *caballo, carne, matadero, decomiso.*

ABSTRACT

The horse is a herbivorous animal that is used for various purposes, one of them is the production of meat intended for human consumption. Worldwide, horse meat production is led by Asia, leaving Europe in third place. Spain is not a country with a great tradition of consumption of this meat, even so, 18,275 farms are dedicated to it, sacrificing 52,908 horses per year. Specif-

ically, 6,368 horses are slaughtered approximately in a year in the Valencian Community. The objective of the present study is to determine, through *antemortem* and *postmortem* inspection, the causes of the main seizures produced in equine livestock destined for human consumption, recognizing the lesions and taking the pertinent decision in each of the organs and parts of the animal. To this end, an experimental study was carried out in 794 horses in 2016 and during the months from January to April 2017. Data have been collected from the inspections carried out during the working day in the so-called “Daily Equine Inspection Part”, where each of the generated seizures and their causes are recorded. Knowing the sacrifices and the amount of seizures made, it is observed that total confiscation is relegated to a second plane and partial seizure is the predominant one. The lung is the most common partial seizure, followed by the liver. The main pathologies causing seizures are pneumonias, and a large number of cases are seized by decision of the official veterinarian.

KEYWORDS: *horse, meat, slaughterhouse, seizure.*

INTRODUCCIÓN

Los caballos son animales herbívoros que tienen un consumo constante de alimentos de origen vegetal y grandes cantidades de fibra bruta. A diferencia de la mayoría de los herbívoros domésticos, estos solípedos domésticos no son rumiantes y tienen la peculiaridad de que son animales monogástricos que poseen un sistema digestivo compuesto por un estómago relativamente pequeño y un intestino grueso que en su conjunto representa alrededor del 60 % del tracto digestivo, ocupando solo el ciego el 25-30 % de este, aproximadamente [1].

En la actualidad, el caballo es un animal que se utiliza para diversos fines. En los países en vías de desarrollo es utilizado como medio de transporte o de trabajo, mientras que en los países más avanzados se utiliza para carreras, deporte, entretenimiento, usos medicinales e incluso su carne es destinada para consumo humano.

Hasta el siglo XIX, rara vez en los países desarrollados el caballo era utilizado como alimento, ya que su uso principal era servir de medio de transporte y de tiro. Su comercialización a estos efectos comenzó en algunos países europeos a principios de dicho siglo, particularmente en Francia, y aunque a lo largo de la historia la producción de carne de caballo ha ido fluctuando continuamente, en los últimos años se ha observado una tendencia al alza en su demanda.

El elevado coste de producción que supone este tipo de carne en comparación con la carne de ovino o bovino, junto con la escasa demanda que existe por parte del consumidor, que prefiere las carnes *blancas*, como la de pollo o pavo, frente a las *rojas*, entre las que se encuentra la carne de caballo [2], ha provocado que la producción de este tipo de carne sea reducida y los productores sean pequeños, sin que se aporte por lo tanto una gran cantidad de animales para su posterior venta y consumo. A pesar de que la carne de caballo presenta una baja extensión a nivel estatal, España sigue siendo uno de los países europeos con más censo de equinos y mayor calidad genética en razas puras, especialmente en la pura raza española.

Los rasgos más característicos de la carne de caballo son el color, la ternura y el sabor. El color depende de la edad del animal, así como del músculo del que se trate, de modo que la carne de potro es más rosada que la de un caballo adulto, que presenta tonos más intensos. Con respecto a la ter-



nura, esta carne resulta más tierna que la de otras especies, por la particular distribución del tejido conjuntivo. El elevado porcentaje de glucógeno que contiene hace que el *rigor mortis* aparezca más lentamente que en otras especies, de manera que la carne se mantiene elástica durante más tiempo. Esta característica mejora con la edad, por lo tanto un animal adulto tiene la carne más tierna que un animal joven.

Respecto a su valor nutritivo, la carne de caballo contiene una gran cantidad de agua, cerca del 80 % de su composición. El segundo componente mayoritario son las proteínas, lo cual tiene un elevado valor biológico, ya que posee alrededor de un 40 % de aminoácidos esenciales. Tras la muerte del caballo, los hidratos de carbono se degradan a glucosa y las grasas se encuentran en muy baja cantidad, lo que contribuye a que el aporte calórico de 100 g de carne de caballo no llegue a las 100 Kcal, valor inferior al de otras carnes, como la de cerdo, la carne de vacuno o la de pollo. Otra característica destacable es que constituye la mayor fuente dietética de hierro y una buena fuente de zinc. También es importante su contenido en fósforo y en vitaminas, especialmente del grupo B, como la tiamina, riboflavina, niacina, B6 y B12 [3].

Dentro de las razas más utilizadas para consumo humano destacamos el caballo de pura raza española. Es la raza más extendida en España y se distribuye por todas sus comunidades autónomas. Son animales de líneas suaves y redondeadas, eumétricos, mesolíneos y de perfil subconvexo a recto, de conformación proporcionada y buena forma física, debido a su sistema de producción en explotaciones semiextensivas [4].

Producción cárnica mundial

La producción de carne de caballo a nivel mundial, según los datos de la FAO [5], está liderada por Asia con un 41 %, seguido de América, con un 31 %, Europa con un 23 % y, finalmente, Oceanía y África, con un 3 y 2 %, respectivamente.

A pesar de que Europa ocupa el tercer lugar en cuanto a producción de carne, es el principal continente importador de caballos. Los principales países europeos importadores de caballos vivos con destino a matadero son: Francia, con 3.990 animales al año (59 % del total); Portugal, con 2.482 cabezas (37 %); Irlanda, con 186 (3 %), y Reino Unido con 69 (1 %). En cuanto a las exportaciones de caballos vivos destinados a matadero, el principal país es Italia, con 535 animales exportados al año (lo cual representa el 90 % del total); Francia se encuentra en segunda posición, con 60 cabezas de ganado (10 %), y el resto de países europeos presentan cifras insignificantes.

España no es un país de gran tradición en consumo de carne de caballo, ya que esta representa el 0,2 % del total del consumo de carnes. En general, los caballos criados en el país se faenan alrededor del año de edad, con pesos vivos que varían entre 360 y 550 kilos y con un rendimiento entre el 61 y el 63 % (canales de 219-350 kilos). La carne de caballo no solo se consume como carne fresca sino también como carne picada en hamburguesas, salchichas, salchichón, chorizo fresco y productos curados [6].

En España existen 187.546 explotaciones de ganado equino, de las cuales el 9,7 % se dedican a la producción de carne, es decir, aproximadamente 18.275 explotaciones están destinadas a la producción de carne de caballo. En contraposición, el 15,9 % de las explotaciones son de uso particular



(29.812 explotaciones). El censo de ganado equino de España se sitúa en los 632.366 animales, de los cuales 52.908 son sacrificados para la producción de carne [7].

Los principales productores de carne de caballo en España son Navarra, seguida de Aragón y Cantabria, quedando la Comunidad Valenciana en cuarto lugar, tal y como se puede observar en la tabla 1. Como se ha mencionado anteriormente, por parte de los consumidores hay una mayor demanda de carne blanca que de carne roja, lo cual también se refleja en dicha tabla. Hay un mayor consumo de carne de ovino (9.960.176), bovino (2.333.895) o de ave (736.455), en comparación con la especie equina [8].

En la Comunidad Valenciana existen 3.648 explotaciones de ganado equino, de las cuales 50 son destinadas a la producción de carne [7]. Como se muestra en la tabla 2, los caballos destinados a carne en esta comunidad son 6.368, de los cuales 225 son sacrificados en la provincia de Alicante y 2.411 en la de Castellón; en Valencia el número de animales sacrificados asciende a 3.732 [8].

Tabla 1. Encuesta anual de sacrificio de ganado en mataderos de España en el año 2015

CC. AA.	Bovino	Ovino	Caprino	Porcino	Equino	Aves	Conejos	TOTAL
Galicia	398.778	35.829	7.780	920.992	417	85.461	9.656	96.481.257
Asturias	59.708	10.764	1.560	87.717	3.621	0	0	163.370
Cantabria	35.380	619	558	925	6.600	0	98	142.222
País Vasco	43.651	49.995	1.140	9.502	473	9.605	1.447	11.157.042
Navarra	19.918	342.930	4.941	420.059	11.843	52.065	2.330	55.194.786
La Rioja	11.722	316.861	24.210	22.175	90	2.859	576	3.809.950
Aragón	113.331	936.920	19.502	4.796.951	8.710	3.690	4.332	13.896.996
Cataluña	499.169	1.232.293	139.608	19.854.375	6.034	206.814	12.166	240.712.001
Baleares	9.422	165.776	3.425	138.317	81	640	2	958.506
Castilla y León	433.185	3.198.639	91.039	6.384.116	5.477	62.988	6.152	79.253.182
Madrid	97.704	143.458	28.397	884.286	0	22.793	0	23.947.134
Castilla La Mancha	164.960	1.227.735	85.914	3.692.142	0	21.550	4.526	31.246.520
Comunidad Valenciana	172.303	693.813	34.846	1.303.084	6.368	97.187	2.250	101.647.132
Murcia	69.795	740.515	129.737	3.393.682	54	10.434	470	15.238.219
Extremadura	105.797	338.465	65.673	526.700	6	37.262	0	38.298.229
Andalucía	91.486	516.719	362.542	3.379.869	3.134	116.813	77	121.243.666
Canarias	7.586	8.845	209.397	75.632	0	6.294	130	6.726.195
TOTAL	2.333.895	9.960.176	1.210.269	45.890.524	52.908	736.455	44.214	840.116.406

Tabla 2. Encuesta anual de sacrificio de ganado en mataderos de la Comunidad Valenciana en el año 2015

PROVINCIA	Bovino	Ovino	Caprino	Porcino	Equino	Aves	Conejos	TOTAL
Alicante	10.941	324.167	15.658	49.263	225	16.172	119	16.691.274
Castellón	5.119	214.109	16.183	97.018	2.411	18.201	1.596	20.132.382
Valencia	156.243	155.537	3.005	1.156.803	3.732	62.814	534	64.823.476
TOTAL	172.303	693.813	34.846	1.303.084	6.368	97.187	2.250	101.647.132

Inspección oficial en mataderos

Una vez que los animales han cumplido su vida media de producción y han alcanzado el peso óptimo, son destinados al matadero. En la Comunidad Valenciana hay cinco mataderos que realizan el sacrificio de solípedos, tres de los cuales se encuentran en la provincia de Valencia. Dichos mataderos son: el matadero Frigorífico L'Horta, sito en Picassent; el matadero de Mercavalencia, en la propia Valencia; el matadero Asencio Cerisuelo, en Burjassot; el matadero Orihuela, en esta misma ciudad, y el matadero Complejo Cárnico de la Plana, en Burriana [9].

La vigilancia sanitaria llevada a cabo por el inspector veterinario de matadero tiene como objetivo principal evitar posibles zoonosis por consumo de alimentos de origen animal, además de poder llevar a cabo un registro de la prevalencia y el comportamiento o tendencia de las patologías más comúnmente detectadas en los animales. Esta vigilancia se lleva a cabo mediante controles oficiales en los que se realiza una inspección *ante mortem* de los animales y una inspección *post mortem* de las canales y sus vísceras.

La finalidad de la inspección *ante mortem* en el matadero es diferenciar los animales vivos sanos de aquellos que presentan síntomas, signos o lesiones que indican que son portadores de algún peligro para la salud humana o la salud animal. Los animales a los que se les da el dictamen de no apto para consumo humano en la inspección *ante mortem* no entran a formar parte de la cadena alimentaria y, por tanto, no se les puede realizar la inspección *post mortem* [10]. Aquellos animales a los que se les da el dictamen de apto en la inspección *ante mortem* entran en la cadena de sacrificio, se faenan adecuadamente y al final se someten a la inspección *post mortem*. Con esta inspección se garantiza que la canal y las vísceras de los animales que van a consumo humano están exentas de enfermedades que suponen un riesgo para la salud del consumidor, ya que el veterinario inspector tiene la obligación de velar por la salud pública y debe decomisar todas aquellas canales enteras, partes de la canal o vísceras que presentan patologías. Determinar cuáles son estas patologías que causan los principales decomisos en el ganado equino destinado a consumo humano es el objetivo del presente estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se lleva a cabo en un matadero de la Comunidad Valenciana en la provincia de Valencia. El periodo de estudio comprende el año 2016 y los meses de enero a abril de 2017; concretamente



durante los lunes, miércoles y viernes, que son los días en los que se realiza el sacrificio de la especie equina, ya que dicho matadero no está destinado exclusivamente al sacrificio de caballos.

La población de estudio se corresponde con el número total de caballos que llegan a este matadero en el periodo mencionado, lo que asciende a 794 caballos inspeccionados.

Para desarrollar el trabajo se recoge la información de las inspecciones realizadas durante la jornada laboral en el documento “Parte diario de inspección de equino”, de la Dirección General de Salud Pública de la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública, y posteriormente los datos son registrados en el programa ISSA (Integración de Sistemas de Seguridad Alimentaria) [11] para permanecer guardados en la base de datos de la Conselleria de Sanitat, considerando posibles futuras consultas y/o auditorías.

Durante la inspección *ante mortem* y la inspección *post mortem*, el inspector veterinario de matadero cumplimenta dicho parte diario, dejando constancia del número de decomisos generados durante la jornada laboral, así como la causa de dichos decomisos.

El estudio se centra, por lo tanto, en identificar las patologías que causan estos decomisos en los solípedos sin tener en cuenta características intrínsecas del animal, tales como la raza, la edad o el sexo, ni la época de sacrificio.

Cada causa de decomiso viene representada en el parte diario mediante un código que refleja el hallazgo o la patología detectado en el animal o en sus órganos. Los códigos utilizados para el dictamen de no aptitud para el consumo humano, enumerados a continuación, están regulados por el Procedimiento A12-P27-ASA de la Dirección General de Salud Pública:

P8 → Degeneraciones

U → Criterio veterinario

P26 → Inflammaciones

P1 → Abscesos

S → Contaminación

H7 → Presencia de *Fasciola hepática*

Conociendo los sacrificios totales que se han llevado a cabo, tanto en el año 2016 como en los meses de enero a abril de 2017, y habiendo registrado la cantidad de decomisos generados por cada una de las posibles patologías, se procede al análisis estadístico descriptivo de los datos, utilizando como herramienta de trabajo el programa Microsoft Excel 2010, y se determina, por lo tanto, cuáles son las enfermedades que causan mayor cantidad de decomisos en esta especie animal en el matadero de la provincia de Valencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el año 2016 se sacrificaron 615 caballos, de los cuales, durante la inspección *ante mortem*, ningún animal fue rechazado como no apto para el sacrificio. En la inspección *post mortem* la mayoría de los decomisos generados en el matadero fueron de tipo parcial, es decir, ciertas partes del animal sacrificado fueron retiradas del consumo humano [12], y solo en un caso se registró un deco-

miso total. La presencia de melanosis fue el motivo por el cual se retiró del consumo humano la canal entera del animal y sus vísceras comestibles. Los decomisos parciales se reflejan en la tabla 3, donde se observa que el 33,3 % de los caballos sacrificados presentaban problemas pulmonares, el 22,6 % problemas hepáticos y el 12,7 % cardíacos. En el caso de los riñones, 40 se declararon no aptos, y el porcentaje más bajo se registró en otras zonas del animal no descritas en el parte diario. Por lo tanto, los decomisos parciales predominantes en el año 2016 fueron los pulmones (205 casos), seguidos por el hígado (139) y el corazón (78).

Analizando de forma más específica los datos obtenidos, el 50 % de los hígados decomisados fueron por decisión del veterinario, bien porque detectara un riesgo o bien por cualquier otra razón que bajo su criterio hizo que esa víscera no fuera apta para consumo humano. El 41 % de los hígados fueron retirados por la presencia de degeneraciones, entre las que cabe destacar la calicosis como principal degeneración. El 3,6 % de estos fueron decomisados por la presencia de contaminaciones debidas a roturas del tracto gastrointestinal, lo que implica la presencia de contenido digestivo en algunas zonas o vísceras del animal. El 2,1 % de los hígados se decomisaron por fasciolosis, y el 1,4 % se corresponden con inflamaciones y abscesos, siendo estas las causas menos representativas.

En el caso de los pulmones, el 63 % fueron decomisados por la presencia de inflamaciones. El 34 %, por motivos declarados bajo criterio del veterinario oficial, y un 2,4 % por presencia de contaminaciones.

Por otro lado, sobre el total de corazones decomisados, el 90 % fueron debidos a la decisión del veterinario. Un 6,4 % de los decomisos en este órgano fueron por contaminaciones, y tan solo un 3,8 % por presencia de inflamaciones.

En el caso de los riñones, del total de decomisos registrados, el 87,5 % fueron por decisión veterinaria, como ocurre en la mayoría de los órganos anteriores, y el 12,5 % por inflamaciones.

Por último, del total de decomisos que se observaron en otras zonas del animal, el 80 % se corresponde con la presencia de contaminaciones, y un 20 % con inflamaciones.

Tabla 3. Causas de decomiso en ganado equino en el año 2016

NÚMERO TOTAL DE CABALLOS = 615							
	Degeneración (P8)	Criterio veterinario (U)	Inflamaciones (P26)	Abscesos (P1)	Contami- nación (S)	Fasciolosis (H7)	TOTAL
Hígado	57	70	2	2	5	3	139
Pulmón		70	130		5		205
Corazón		70	3		5		78
Riñón		35	5				40
Otros			4	16			20
TOTAL	57	245	144	18	15	3	

En el año 2017 el estudio se realizó durante los meses de enero a abril, donde fueron sacrificados un total de 179 caballos, no declarándose ningún animal como no apto para el sacrificio durante la inspección *ante mortem*. Los decomisos generados durante la inspección *post mortem* en el matadero



fueron todos de tipo parcial, no registrándose ningún caso de decomiso total. Como se observa en la tabla 4, el 25,7 % de los caballos que fueron sacrificados presentaban problemas pulmonares, el 24,6 % problemas a nivel hepático y un 11,7 % del corazón. En el caso de los riñones, 18 se declararon no aptos, y el porcentaje más bajo se registró en otras zonas del animal. Por lo tanto, los decomisos parciales predominantes en el año 2017 fueron los pulmones (46 casos), seguidos del hígado (44) y el corazón (21).

Concretamente, sobre el total de hígados decomisados, el 47,7 % se debieron a degeneraciones, y el 41 % fueron retirados de la cadena alimentaria por decisión del veterinario oficial. El 6,8 % presentaron lesiones provocadas por la presencia de *Fasciola hepática*, y el 4,5 % se correspondió con decomisos por la formación de abscesos.

En el caso de los pulmones, el 60,9 % fueron decomisados por la presencia de inflamaciones, y el 39,1 % por motivos declarados bajo criterio del veterinario.

Por otro lado, sobre el total de corazones decomisados, el 85 % se retiró por decisión del veterinario, y el 14,3 % por inflamaciones.

En el caso de los riñones, todos los decomisos realizados fueron por decisión del veterinario oficial, y del total de decomisos que se observó en otras zonas, el 100 % de los casos se corresponde con la presencia de abscesos.

Tabla 4. Causas de decomiso en ganado equino en el año 2017 (del 1 de enero al 31 de abril)

NÚMERO TOTAL DE CABALLOS = 179							
	Degeneración (P8)	Criterio veterinario (U)	Inflamaciones (P26)	Abscesos (P1)	Contami- nación (S)	Fasciolosis (H7)	TOTAL
Hígado	21	18		2		3	44
Pulmón		18	28				46
Corazón		18	3				21
Riñón		18					18
Otros				9			9
TOTAL	21	72	31	11	0	3	

Durante el desarrollo del estudio, de los análisis de triquina practicados en el músculo de todos los solípedos domésticos sometidos al estudio se obtuvieron resultados negativos.

Tanto en el año 2016 como en los meses transcurridos durante el año 2017, los decomisos parciales predominaron frente a los decomisos totales. Con respecto a los decomisos parciales, los pulmones fueron los órganos más decomisados en ambos años, y las principales enfermedades encontradas a lo largo del presente estudio fueron las siguientes:

- Decomisos totales
 - Melanosis
- Decomisos parciales
 - Degeneraciones (calicosis)



- Fasciolosis
- Abscesos
- Inflamaciones
 - Hepatitis
 - Miocarditis y pericarditis
 - Nefritis
 - Neumonías
- Criterio veterinario
 - Animales de desvieje
 - Xantomatosis
 - Empiema de las bolsas gutrales
 - Acúmulo de metales pesados

Comparando dichos datos con el estudio realizado por Fàbregas [13], en el que fueron analizados un total de 327 caballos desde el año 1992 hasta febrero del 1993 en Barcelona, se observa que, efectivamente, los decomisos totales son esporádicos. Los decomisos totales alcanzados en el trabajo de Fàbregas suponen un 0,9 %, ya que solo detectaron dos casos de melanosis y un caso de ictericia, dato similar al 0,1 % de decomisos totales obtenidos en el presente estudio por un caso de melanosis. En Barcelona, al igual que en el matadero de Valencia, los decomisos predominantes fueron los decomisos parciales. Los órganos más decomisados por Fàbregas fueron los hígados (17,7 %), dato que difiere ligeramente si lo comparamos con los hígados decomisados en nuestro estudio (23,04 %). En referencia a los pulmones, se decomisaron el 14 %, en comparación al 31,6 % de los casos obtenidos en el matadero valenciano estudiado. Como se puede interpretar de ambos estudios, el hígado y los pulmones son las vísceras con más cantidad de decomisos. La búsqueda de triquina realizada en Barcelona dio resultados negativos, al igual que en nuestro trabajo.

En varios estudios realizados en Chile, tanto en el año 1986 como en el año 2014, la causa predominante de decomisos en el ganado equino fue la fasciolosis. En el año 1986 [14], el estudio se llevó a cabo en varias regiones en las que la primera causa de decomisos fue la presencia de problemas hepáticos, seguida de los hallazgos en los pulmones y los riñones. Dentro de los problemas hepáticos, la causa predominante fue la presencia de *Fasciola hepática* en el hígado. Lo mismo que ocurrió en el año 2014 [15], donde fueron sacrificados un total de 52.611 caballos, de los cuales 10.326 animales presentaban dicho parásito.

Las condiciones de saneamiento ambiental y de manejo durante la cría de los animales se deben tener en cuenta a la hora de comparar estudios, ya que dichas condiciones pueden favorecer la aparición de determinadas patologías. En Chile no existen explotaciones para la producción de carne equina, sino que se llevan a matadero animales de desvieje provenientes de otras actividades, tales como carreras o caballos de tiro. Además, es frecuente la cría en libertad de caballos en estos países, lo que ocasiona que la *Fasciola hepática*, que está presente en los pastos, entre en contacto con los animales de forma continua y provoque sus lesiones características en mayor grado, de ahí que la prevalencia sea mayor que en nuestro estudio.



CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos del presente estudio muestran que apenas se producen dictámenes no aptos en la inspección *ante mortem* de solípedos domésticos, que los decomisos parciales son más frecuentes que los decomisos totales y que los pulmones son los órganos más decomisados, seguidos por el hígado, el corazón y los riñones.

Los resultados obtenidos reflejan a su vez que las principales patologías causantes de decomisos en ganado equino destinado a consumo humano son las neumonías, seguidas por un número elevado de vísceras decomisadas por decisión y criterio del veterinario oficial. Cabe destacar también la retirada de vísceras de la cadena alimentaria por la presencia de degeneraciones y contaminaciones.

Todas las lesiones detectadas durante el periodo de estudio son características de cada una de las enfermedades descritas, no encontrándose por tanto hallazgos anormales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la dirección y al personal del matadero sito en Valencia toda la ayuda proporcionada para la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Equisan. Veterinaria Equina Integral [Internet]. equisan.com. [citado 9 de junio de 2017]. Disponible en: <http://equisan.com/images/pdf/digestiones.pdf>.
- [2] Marina J, Jaime L, Manuel H, Manuel L. Producción de carne de equinos. Producción animal. 2016;18:1-3.
- [3] MAPAMA: Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente [Internet]. [actualizado 2014; citado 10 de junio de 2017]. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/caballo_tcm7-315385.pdf.
- [4] Razas de ganado del catálogo oficial de España. 1st ed. Madrid, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino; 2010.
- [5] FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. Fao.org [citado 9 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>.
- [6] Castelli JL. El caballo en Europa para producción de carne. Producción animal [Internet]. 2004. [citado 10 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ceibesnomonte.com/varios/documentos/carne.pdf>.
- [7] El sector equino en cifras. Subdirección general de productos ganaderos [Internet]. 2016. [citado 9 de junio de 2017]; 40: 14-31. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectorequino2015_tcm7-386080.pdf.



- [8] MAPAMA: Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente [Internet]. [actualizado 2014; citado 10 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestassacrificio-ganado/>.
- [9] AECOSAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [Internet]. [citado 12 de junio de 2017]. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. Disponible en: http://rgsa-web-aesan.msssi.es/rgsa/resultado_principal.jsp.
- [10] Instrucciones sobre los controles específicos de inspección veterinaria en matadero. [Internet]. Andalucía [actualizado 27 de julio de 2012; citado 10 de junio de 2017]. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Instruccion.115-2012_Inspeccion_veterinaria_matadero.pdf.
- [11] Integración de Sistemas de Seguridad Alimentaria (Decisión UE 2015/2240 del Parlamento Europeo y del consejo de 25 de noviembre de 2015), por el que se establece un programa relativo a las soluciones de interoperabilidad y los marcos comunes para las administraciones públicas, las empresas y los ciudadanos europeos como medio de modernización del sector público.
- [12] Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.
- [13] Fàbregas i Comandran X. Causas de decomiso en la inspección sanitaria de equinos. [Internet]. [citado 11 de junio de 2017]; 3: 1-3. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/pub/artpub/2001/71007/02122731n22p703.pdf>.
- [14] María AM, Juan Ll. Beneficios y causales del decomiso de ovinos, porcinos, equinos, caprinos y camélidos en Chile. Avances en ciencias veterinarias [Internet]. 1995 [citado 11 Jun 2017]. Disponible en: <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4757/4642>.
- [15] Informe beneficio y hallazgos patológicos en mataderos nacionales 2014. SAG [Internet]. 2015. [citado 11 de junio de 2017]; 27: 12-18. Disponible en: http://www.sag.cl/sites/default/files/informe_decomisos_mataderos_2014.pdf.



<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	161-176	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

Identificación de cultivos de levaduras noruegas y estudio de sus propiedades de fermentación

Identification of Norwegian yeast cultures and study of their fermentation properties

Fecha de recepción y aceptación: 6 de octubre de 2017, 9 de enero de 2018

Paula Izquierdo Sesa¹, Mónica Díez-Díaz^{1*} y Per Bruheim²

¹ Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Noruega (NTNU).

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. *E-mail*: monica.diez@ucv.es



RESUMEN

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en el proceso de fermentación de alimentos. Son de especial importancia en el proceso de fermentación de la cerveza, ya que es la bebida fermentada más consumida del mundo. En este proyecto se investigaron cuatro cepas distintas de levaduras provenientes de granjas de los municipios de Noruega, Ål y Hornindal, en concreto NFAY 29, NFAY 30, NFAY 31 y NFAY 32. Por otro lado, se emplearon cuatro controles, uno de ellos cedido por la colección nacional de levaduras de Reino Unido (NCYC 456), otros dos por WhiteLabs (WLP013 y WLP500) y el último por una granja noruega (G561). El objetivo fue realizar una identificación genética de cada una de estas cepas y el estudio de sus propiedades de fermentación. Para llevar a cabo los análisis genéticos se realizó una clasificación taxonómica basada en la subunidad grande 28 S del ribosoma (LSU), para averiguar el género, y en la región interna espaciadora transcrita (ITS), para identificar la especie a la que pertenecían. Para el estudio de las propiedades de fermentación contamos con las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con inyección en espacio de cabeza (HS/GC-MS), la cual reveló claras diferencias entre fermentaciones a distintas temperaturas. También realizamos un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), con la que determinamos la capacidad de utilizar maltotriosa, uno de los principales sustratos que utilizan las levaduras para crecer.

PALABRAS CLAVE: *química de alimentos, levadura, fermentación, cerveza.*

ABSTRACT

Yeasts are the microorganisms mostly used in the fermentation process of food and beverages. They are especially important in the process of beer fermentation, which is the most consumed fermented beverage in the world. In this project, four different strains of yeasts from farms in Norway's municipalities Ål and Hornindal, specifically NFAY 29, NFAY 30, NFAY 31, NFAY 32, were used. Besides, we used four controls; one of them was provided by the National Yeast Collection of UK (NCYC 456), two of them by WhiteLabs (WLP013 and WLP500) and the last

one by a farmhouse in Norway (G561). The objective was to perform a genetic identification of each of these strains and the study of their fermentation properties. To carry out the genetic analysis, a taxonomic classification was made, based on the large subunit 28S ribosomal RNA (LSU) to find out the genus, and in the transcribed internal space region (ITS) to identify the species to which they belonged. To carry out the study of the properties of fermentation, we used the techniques of gas chromatography coupled mass spectrometry with head space injection (HS/GC-MS) which revealed clear differences between fermentations at different temperatures; and analysis of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), which allowed us to determine the ability to use maltotriose, one of the main substrates used by yeasts to grow.

KEYWORDS: *Food Chemistry, Yeast, Fermentation, Beer.*

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son hongos unicelulares que en biotecnología tienen gran relevancia en los sectores alimentario, farmacéutico, químico, agrícola y medioambiental, entre otros. Son el grupo de microorganismos eucariotas más importante utilizado en el proceso de fermentación de comidas y bebidas. Cabe destacar algunas de las características de las cepas de especial interés, como su capacidad de supervivencia en ausencia de oxígeno, su desarrollo gracias a la presencia de azúcares y su gran facilidad para la propagación en el laboratorio. Además, poseen un genoma de pequeño tamaño, lo que las hace atractivas para estudios genómicos evolutivos y funcionales [1-3].

El fenotipo del sabor es una propiedad extremadamente importante cuando se seleccionan levaduras. Los componentes que influyen en el sabor están afectados principalmente por características poligenéticas que tienen efecto sobre la tolerancia al alcohol, la temperatura o la tasa de fermentación. Las levaduras cerviceras se clasifican en dos especies: *Saccharomyces pastorianus* y *Saccharomyces cerevisiae* [4,5].

Las cepas industriales hoy en día son el resultado de siglos de domesticación humana y son genética y fenotípicamente distintas de las cepas salvajes. La domesticación consiste en la selección humana de especies silvestres para obtener variantes que prosperen en ambientes artificiales. Esta domesticación ha llevado a una pérdida de habilidades de supervivencia fuera de un ambiente artificial de medios ricos, y a la aparición de rasgos deseables como la utilización de la maltotriosa, la cual es importante para el desarrollo de las levaduras [6].

MÉTODOS

Obtención y desarrollo de levaduras puras

Las cepas de levaduras utilizadas en el presente trabajo fueron NFAY 29, NFAY 30, NFAY 31 y NFAY 32, donadas por granjas noruegas. Por otra parte, se emplearon cuatro controles. Uno de ellos fue cedido por la colección nacional de levaduras de Reino Unido (NCYC 456, *Saccharomyces*



Pastorianus), otros dos por WhiteLabs (WLP013 y WLP500, ambas *Saccharomyces cerevisiae*) y el último por una granja noruega (G561 *S. cerevisiae*).

Se sembraron las cepas de levadura en placas Petri en medio Wort de la compañía Fluka Analytical, posteriormente se aislaron colonias, mediante la técnica de siembra de triple estria, y se obtuvieron cepas puras. Esta técnica se practicó cuatro veces, dejando periodos de cuatro días entre siembras para permitir el crecimiento.

Una vez obtenidas las cepas puras, se inocularon en medio Malt Extract (ME) al 5 %, de la casa comercial VWR, el cual es muy favorable para el desarrollo de las levaduras.

También se realizaron pruebas adicionales con distintos medios, como Wallerstein Laboratories Nutrient Agar (WLN) y Wallerstein Laboratories Differential Agar (WLD), de la compañía Sigma Aldrich.

El primero de ellos nos permitió observar el crecimiento de organismos como levaduras y bacterias, mientras que el segundo fue indicativo de presencia de bacterias. En cuanto a su composición, se trataban de dos medios con la misma composición, a excepción de la cicloheximida, componente que inhibe la síntesis proteica en organismos eucariotas, que solamente se encontraba en WLD. La incubación aeróbica de estos medios se realizó a 27 °C.

Producción de cerveza y fermentación

Se añadieron las distintas levaduras al mosto obtenido (tal y como se describe en la receta, anexo A), y se realizó la fermentación a dos temperaturas, 22 y 35 °C, para estudiar las diferencias. El proceso de fermentación se llevó a cabo durante catorce días.

Análisis genéticos

La región interna espaciadora transcrita (ITS) ha sido seleccionada como diana de referencia para la identificación de la especie en hongos. La subunidad grande (LSU) 28S de las levaduras permite averiguar el género al que estas pertenecen. LSU contiene dos regiones hipervariables, LSU1 (pares de bases de la 127 a la 264) y LSU 2 (pares de bases de la 423 a la 636), que fueron analizadas [7-10].

Por otro lado, las levaduras de cerveza, especialmente las domesticadas, muestran una alta capacidad de metabolizar maltotriosa, una fuente de carbono específica encontrada en la cerveza. Los transportadores conocidos de α -glucósido en *S. cerevisiae* permiten una utilización eficiente de la maltosa y maltotriosa. MALL 11 es uno de estos transportadores, el cual posee un alelo específico, AGT1, cuya presencia se correlaciona con una eficiente utilización de la maltotriosa por parte de las levaduras. Por todo esto, también se decidió realizar un análisis del transportador de alfa glucósido (AGT1) [11].

Las regiones de interés se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para cada amplificación se hizo uso de unos cebadores específicos, los cuales se detallan en la siguiente tabla.



Tabla 1. Cebadores utilizados en los análisis genéticos

REGIÓN	CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	PROVEEDOR
ITS	ITS1-F_KYO2 (F)	TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA	Sigma-Aldrich
-	ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Sigma-Aldrich
LSU1	LSU1 (F)	TTGCCTTAGTAACGGCGA	Sigma-Aldrich
-	LSU1 (R)	TTGTGCACCTCTTGCGAG	Sigma-Aldrich
LSU2	LSU2 (F)	GGGTTGATATGATGCCC	Sigma-Aldrich
-	LSU2 (R)	TTCCCCTTGTCCTGACC	Sigma-Aldrich
AGT1	AGT1 (F)	TTGCTTTACAATGGATTGGC	Sigma-Aldrich
-	AGT1 (R)	CTCGCTGTTTTATGCTTGAGG	Sigma-Aldrich

Los parámetros de la PCR variaron según la región que se analizaba. Para las regiones LSU1 y LSU2 se realizó un ciclo de desnaturalización de 10 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 45 s; hibridación a 52 °C 45 s; elongación a 72 °C 1 min, y por último un ciclo de elongación final de 72 °C durante 10 min.

Para la región ITS se realizó un ciclo de desnaturalización a 95 °C 10 min, 35 ciclos de: desnaturalización 94 °C 20 s; hibridación a 47 °C 30 s; elongación a 72 °C 40 s, y por último un ciclo de elongación final de 72 °C durante 7 min.

Para AGT1 un ciclo de desnaturalización a 94 °C 3 min, 35 ciclos de: desnaturalización 94 °C 1 min, hibridación 58 °C 2 min, elongación 72 °C 2 min, y por último un ciclo de elongación final de 72 °C durante 10 min.

La presencia de ADN en las muestras tras la PCR se comprobó mediante electroforesis. Los geles se visualizaron utilizando el transiluminador UV-Visible G: BOX de Syngene y el software GeneSnap.

A continuación se purificaron los amplicones con el *kit* QIAquick PCR Purification de la casa comercial Qiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas por la empresa GATC Biotech.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se procesaron con el programa CloneManager para obtener la secuencia nucleotídica definitiva, que fue analizada con las herramientas del Proyecto de base de datos ribosomal (RDP). En concreto, 16SrRNA training set 16 para LSU1 y LSU2 y Warcup Fungal ITS trainset 2 para ITS.

En cuanto a AGT1, se analizó con el programa Seaview para analizar si el gen estaba presente o defectivo.

Análisis químicos

Cromatografía de gases acoplada a espectrofotomería de masas con inyección en espacio de cabeza (HS/GC-MS)

La cromatografía de gases con inyección en espacio de cabeza, o *HeadSpace* (HS/GCMS), es una técnica ideal para el análisis cualitativo o cuantitativo de especies volátiles. En cerveza resulta muy



útil, ya que revela la identidad y concentración de aquellos componentes volátiles que son responsables del sabor [12,13].

El método del estándar interno (ISTD) proporciona una cuantificación muy precisa y por lo tanto es el método más comúnmente utilizado. El estándar interno corrige las pérdidas durante las etapas de separación y concentración, además de la variación en la cantidad de muestra inyectada [14].

Las condiciones experimentales para realizar HS-GC/MS se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Condiciones experimentales de HS-GC/MS

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS
Tipo de columna	Aglient J&W DB-624 UI, 30 m x 0,25 mm, 1,4 µm
Gas portador	Helio, flujo constante, 1,8 ml/min
Horno	35 °C (5,66 min), 8,8 °C/min a 100 °C (1,7 min), 13,3 °C/min a 220 °C (3,39), 22,1 °C/min a 250 °C (3,43 min)
Temperatura de la fuente	230 °C
Temperatura cuadrupolo	150 °C

Para preparar el ISTD se utilizó una solución de 4-metilpentan-2-ol a una concentración de 100 µg/ml.

Se prepararon las series de calibrado A (tabla 3), B (tabla 4) y C (tabla 5), que contenían los componentes volátiles que queríamos cuantificar en nuestras muestras.

Tanto a las muestras como a las series de calibrado se les añadió el ISTD.

Tabla 3. Preparación de la serie de calibrado A

	A	Peso (mg)	Volumen (ml)
1	Propan-1-ol	45-50	20 (EtOH/H ₂ O, 50:50, v/v)
2	Etanoato de etilo	45-55	
3	2-metilpropan-1-ol	35-45	
4	3-metilbutan-1-ol	65-75	
5	2-metilbutan-1-ol	40-50	

Tabla 4. Preparación de la serie de calibrado B

	B	Peso (mg)	Volumen (ml)
6	Butan-1-ol	35-45	20 (EtOH/H ₂ O, 80:20, v/v)
7	Propionato de etilo	30-40	
8	Acetato de propilo	20-30	
9	1,1- Dietoxietano	20-30	
10	Acetato de isobutilo	20-30	



Tabla 5. Preparación de la serie de calibrado C

	C	Peso (mg)	Volumen (ml)
11	1-Butirato de etilo	20-30	20 (EtOH/H ₂ O, 50:50, v/v)
12	Acetato de isoamilo	18-25	
13	Hexanoato de etilo	18-25	
14	Octanoato de etilo	20-30	
15	Decanoato de etilo	40-50	

El instrumento utilizado para analizarlas fue el Sistema 7890A GC, acoplado con el sistema GC-MS 7000 Series Triple Quadrupole, de la casa comercial Agilent. El software para conseguir y analizar los datos fue MassHunter.

Los resultados obtenidos en ng/ml fueron transformados a partes por millón (ppm) para una mejor interpretación.

Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS) para el análisis de azúcares

Un sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS) contiene una interfaz que transfiere los componentes separados de la columna cromatográfica a la fuente de iones MS. La interfaz es necesaria porque los dispositivos LC y MS son fundamentalmente incompatibles, ya que la fase móvil en un sistema de LC es un líquido presurizado y en los analizadores de MS se opera normalmente bajo vacío [15].

Gracias a esta técnica es posible realizar un análisis de los componentes líquidos en la fermentación de la cerveza, analizando así la presencia de azúcares como la maltotriosa, el segundo azúcar más abundante del mosto de cerveza, que es utilizado por las levaduras para crecer y desarrollarse y producir así el proceso de fermentación [6].

Las condiciones experimentales para realizar la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Condiciones experimentales de LC-MS

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS
Tipo de columna	ACQUITY UPLC® BEH Amida. Columna de 1.7µm
Temperatura de la columna	35 °C
Solvente A	H ₂ O/ACN(70/30)+0,1 %NH ₄ OH
Solvente B	ACN/H ₂ O(80/20)+0,1 %NH ₄ OH
Método de espectrometría de masas	Ms escaneo y MSE, en modo negativo, escanear 50-2000 m/z, 4 escaneados/segundo
Fuente	Capilar 2,80 kV, cono de muestreo 25
Temperaturas	Fuente 120 °C, desolvatación 350 °C



Se utilizó un control de calidad (QC), consistente en una mezcla de todas las muestras que se iban a analizar, proporcionando así un promedio de todos los metabolitos contenido en ellas. También realizamos un blanco, el cual solo contenía agua. Y por último, una mezcla de azúcares, cuya composición se puede observar en la tabla 7. Todos estos preparados debían ser inyectados cada diez muestras.

Tabla 7. Composición de la mezcla de azúcares

COMPONENTE	g/mol	COMPONENTE	g/mol
Glucosa	180,16	Maltotriosa	504,40
Maltosa	342,30	Maltotetraosa	666,60
Sucrosa	342,30	Maltopentosa	828,70
Fructosa	180,16	Maltohexosa	990,90
Lactosa	342,30	Maltoheptosa	1153,00
Galactosa	180,16		

En la preparación de las muestras que debían analizarse se añadía acetonitrilo puro, para la eliminación de proteínas. Las muestras eran almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivos de levaduras

A partir de la observación de las cepas puras tuvimos sospechas de que la cepa NFAY 31 no era levadura, puesto que las escasas colonias eran casi invisibles y demasiado pequeñas, teniendo así una forma más parecida a la de la bacteria. Desde ese momento dejamos a esta cepa fuera del experimento.

Para los cultivos NFAY 29, NFAY 30 y NFAY 32 se obtuvieron colonias con aspecto propio de levadura, de las cuales se escogieron distintas colonias para comprobar que los resultados eran reproducibles. Por lo tanto, al final obtuvimos tres cepas de NFAY 29 (NFAY 29.1, NFAY 29.2 y NFAY 29.3), otras tres de NFAY 30 (NFAY 30.1.1, NFAY 30.1.2 y NFAY 30.2) y cuatro de NFAY 32 (NFAY 32.1.1, NFAY 32.1.2, NFAY 32.2.1 y NFAY 32.2.2).

El color y la morfología de las levaduras en el medio Wallerstein Laboratories Nutrient Agar (WLN) no son decisivos para clasificarlas, pero sí que ofrecen una ligera idea acerca de con qué cepas se está trabajando. Analizando las placas se podía intuir que todas ellas eran del género *Saccharomyces*, por sus colores y morfologías. Sin embargo, podrían pertenecer a distintas especies. Por su color verde claro-blanco, podíamos aventurar que todas las cepas del cultivo NFAY 32 y los controles WLP500 y G561 eran *Saccharomyces cerevisiae*. Sabíamos previamente que WLP013 y WLP500 eran *S. cerevisiae*, lo cual nos proporcionó una mayor fiabilidad [16].

En cuanto a NFAY 30 y WLP013, observamos un color verde botella que es indicativo de levaduras fenólicas, es decir, levaduras que producen fenoles, compuestos orgánicos aromáticos.

Las cepas del cultivo NFAY 29 y NCYC 456 poseían un aspecto aplanado, lo que podía significar que no pertenecían a la especie *cerevisiae*. Sabíamos que esto era acertado, al menos para NCYC 456,



ya que era un control correspondiente a *Saccharomyces pastorianus*, lo cual concordaba con el resultado de la placa [17].

En cuanto a las placas preparadas con Wallerstein Laboratories Differential Agar (WLD) no se obtuvo ningún tipo de colonia, por lo que no tuvimos motivos para sospechar que ninguna de las muestras contuviese bacteria.

Análisis genéticos

Para realizar los análisis genéticos se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN. Se obtuvo banda de ADN en gel de electroforesis para las regiones ITS, LSU1 y LSU2 de todas las cepas. Sin embargo, para AGT1 se obtuvo banda de ADN para todas excepto la NFAY 32.2.1.

Los resultados de la secuenciación para las regiones LSU 1 y LSU 2 fueron concluyentes para todas las cepas. Pertenecían al género *Saccharomyces* con una fiabilidad mayor del 99 %.

En cuanto a ITS, para las muestras del cultivo NFAY 29 no se consiguieron buenos resultados. Que la secuenciación del ADN de la región ITS en NFAY 29 fuese fallida podía deberse a que se tratara de una cepa híbrida, ya que como Kopecká *et al.* [18] sugirieron, múltiples tipos de regiones ITS en cepas de cerveza híbridas pueden hacer que su análisis sea más costoso.

Sin embargo, se observó con una fiabilidad mayor del 98 % que NFAY 30 pertenecía a *Saccharomyces boulardii*.

Se trataba de un resultado muy interesante, ya que Czerucka *et al.* [19] demostraron en su trabajo que *S. boulardii* es una levadura potencial para la fabricación de probióticos.

En lo que respecta al cultivo NFAY 32, se trataba de *S. cerevisiae* con una fiabilidad mayor del 90 %. Además, este resultado concordaba con las pruebas anteriormente realizadas con el medio WLN, donde ya podíamos intuir que correspondía a *S. cerevisiae*.

En cuanto al análisis de AGT1, sabíamos que la expresión potenciada de AGT1 estaba relacionada con una mayor captación de maltotriosa en levaduras Ale, mientras que en Lager está mutado [11].

Las levaduras Lager tienen mutaciones de desplazamiento de marco de lectura en AGT1. Para analizar si nuestras cepas poseían la mutación o no estudiamos la posición número 1183, posición que Vidgren, Ruohonen y Londesborough [20] describieron como el lugar donde comienza la mutación que produce el cambio de marco de lectura.

En la tabla 8 se puede ver de manera clara si el gen está presente, ausente o defectivo, es decir, presente pero mutado.

Como hemos mencionado, no obtuvimos resultado de banda de ADN en el gel de electroforesis para NFAY 32.2.1, lo cual resultaba extraño, ya que las demás cepas provenientes del mismo cultivo sí lo poseían. Esto nos hizo pensar que quizás hubo algún problema en el análisis genético, aunque era poco probable, ya que las cepas tenían un aspecto morfológico similar. Este resultado también pudo ser debido a que fuesen cepas distintas y poseyese, en lugar de AGT1 como transportador principal de maltotriosa, otro transportador [21].

Respecto al resto de muestras, las provenientes del cultivo NFAY 29 y NCYC 456 tenían la T adicional, lo que las convertía en cepas mutadas.



En concreto, NCYC 456 se trata de una cepa comercial domesticada, por lo que no es de extrañar que posea la mutación, puesto que se ha descrito que la delección de este gen es propia y beneficiosa para levaduras Lager [22].

En cuanto a NFAY 29, Gallone *et al.* [6] obtuvieron en su estudio que alrededor del 25 % de sus levaduras *S. cerevisiae* (Ale) también poseían la T extra, lo que nos llevaba a reafirmar la teoría que está tomando cada vez más consideración, que esta mutación, aunque sí es más característica de Lager, no es exclusiva de estas.

Tabla 8. Presencia de AGT1 en las muestras

MUESTRA	AGT1	MUESTRA	AGT1
NFAY29.1	M	NFAY 32.1.2	P
NFAY29.2	M	NFAY 32.2.1	N
NFAY29.3	M	NFAY 32.2.2	P
NFAY30.1.1	P	G561	P
NFAY30.1.2	P	NCYC 456	M
NFAY30.2	P	WLP013	P
NFAY32.1.1	P	WLP500	P

*P = presente; M = mutado; N = no presente.

Identificación de componentes volátiles tras la fermentación

Con objeto de examinar los componentes volátiles que contribuyen al aroma y sabor de la cerveza se realizó HS-GC/MS en las muestras tras la fermentación a 22 y 35 °C para cuantificar 15 compuestos diferentes: butan-1-ol, acetato de propilo, 1,1 dietoxietano (más comunmente conocido como acetato), propionato de etilo, acetato de isobutilo, butirato de etilo, 3-metilbutan-1-ol acetato, propano-1-ol, acetato de etilo, 2-metilpropan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, etil hexanoato, etil octanoato y etil decanoato. En cuanto a los tres últimos componentes, T. Zambrano y M. Raigón [23] los identifican en su estudio como componentes relevantes en la fermentación de la cerveza. Sin embargo, en nuestro experimento no se obtuvo suficiente cantidad en las muestras para que fuese representativo.

Gracias a los trabajos de Baxter y Hughes [24] y Maarse [25] sabemos qué aroma produce cada componente, por lo que podemos deducir qué tipo de aroma producirá cada una de nuestras levaduras de acuerdo con el tipo de componentes que producen.

De forma general, hay sabores que no suelen ser deseables, mientras que hay otros por los que se puede tener preferencias. Entre los sabores que podemos encontrar indeseables se encuentran los sabores ácidos, como el que puede producir la manzana en ocasiones, o el sabor amargo.

Las cervezas Ale tienden a ser afrutadas, y los ésteres son los que proporcionan mayoritariamente este aroma, por lo que es de esperar que nuestras muestras contengan gran cantidad de ésteres [26].

Pudimos observar que WLP500 fermentó mejor a 22 °C. A esta temperatura se obtuvo una clara influencia de ésteres que aportan aromas de banana, piña o pera, es decir, un aroma más afrutado. Sin embargo, a 35 °C tenía más concentración de componentes que proporcionan aroma manzana,



que como ya hemos mencionado puede desembocar en un sabor desagradable. De esta cepa control conocíamos que su fermentación óptima era alrededor de 20 °C, hecho que pudimos corroborar tras realizar el experimento [16].

De acuerdo con la compañía White Labs, pudimos afirmar que WLP013 fermentaba mejor a 22 °C, produciendo a 35 °C una concentración alta de acetal, lo que podría desembocar en un sabor amargo [16].

NCYC 456 obtuvo una fermentación baja en comparación con las demás. Sin embargo, el simple hecho de que fermentase fue sorprendente, ya que las levaduras Lager no soportan temperaturas de 35 °C [18].

G561 se trataba de una cepa silvestre, por lo que no teníamos datos previos. El resultado fue una buena fermentación sin diferencias destacables entre ambas temperaturas experimentales, con posibilidad de obtener un sabor amargo por la presencia de acetal en ambas.

Pese a que las cepas de NFAY 29 fermentaron todas de manera muy similar, podríamos destacar que lo hicieron mejor a 35 °C. Los componentes que predominaron son los que ofrecen aromas afrutados.

En cuanto a las cepas de NFAY 30 produjeron una fermentación similar a 22 y a 35 °C. Sin embargo, podríamos destacar una mayor presencia de acetal a 35 °C, lo que podría ser indicativo de un sabor más amargo a esta temperatura que a 22 °C.

Por último, respecto a las cepas del cultivo NFAY 32 podemos decir que fermentaron mejor con carácter general a 35 °C, ya que produjo más altas concentraciones de los componentes.

Determinación de maltotriosa en la cerveza

Procesamos los resultados con el programa Progenesis y pudimos obtener información de todos los componentes líquidos presentes en la cerveza. Para la interpretación de los resultados realizamos un diagrama de análisis de componentes principales (PCA), realizado con el software Unscrambler X, que podemos observar en la figura 1. El algoritmo utilizado fue el de Descomposición en valores singulares (SVD). El PCA nos ayudó a apreciar de manera global cómo utilizaron las cepas los azúcares presentes en la cerveza. En él pudimos observar la presencia de las muestras, los controles, los controles de calidad (QC), la mezcla de azúcares y los blancos.

Los puntos blancos estaban muy alejados de las muestras, alguno de ellos incluso fuera del rango de metabolitos, lo cual fue positivo, ya que su composición era exclusivamente agua. En cuanto a las mezclas de azúcares, los obtuvimos dentro del rango de metabolitos, lo que era esperado ya que contenía los azúcares que debían analizarse. Por otro lado, es importante señalar que el hecho de que no se encontrasen cerca de las muestras no fue indicativo de que las muestras no poseyeran azúcares, sino de que las muestras no contuvieran exclusivamente azúcares, pues también poseían otros compuestos hidrosolubles.

En lo que respecta a las muestras, que estuvieran todas solapadas y dentro del rango de metabolitos era indicativo de que, en general, tenían la misma fracción hidrosoluble. Las cepas control y la mayoría de controles de calidad (QC) no se podían apreciar porque estaban solapadas por debajo de las muestras. En la figura 2 encontramos el mismo PCA con ampliación en la zona de las muestras, para así observar las cepas control y QC.



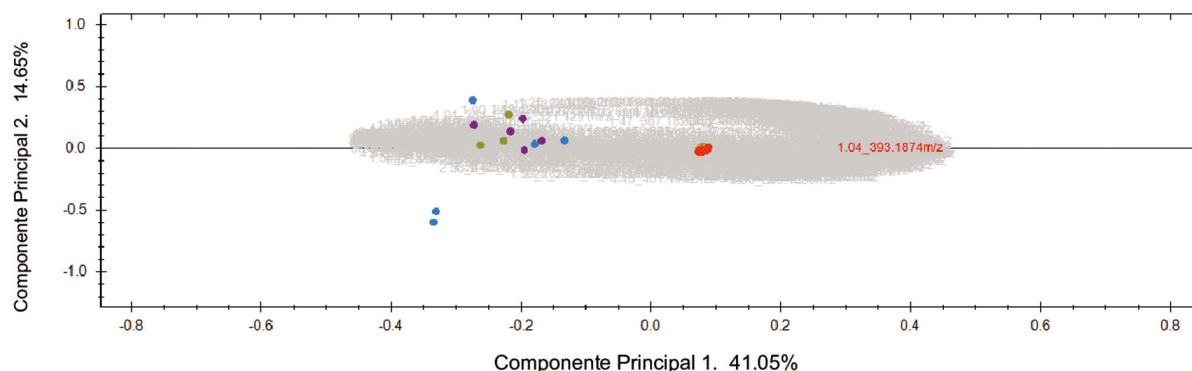


Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes analizados por LC-MS. Naranja, muestras NFAY; verde, control de calidad (QC); morado, mezcla de azúcares; azul, blanco con agua.

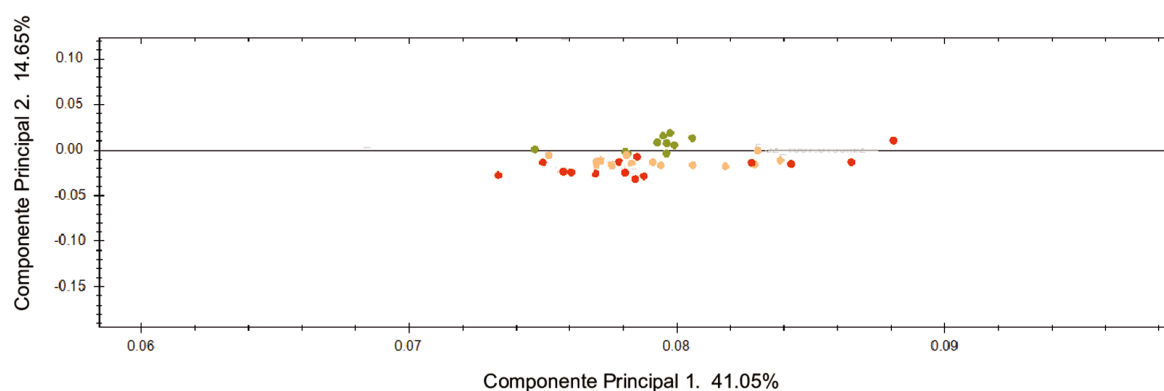


Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) con ampliación de tamaño. Podemos identificar las muestras (naranjas), los controles de calidad (verdes) y las cepas control (rosa claro).

En el PCA ampliado pudimos observar la presencia de las muestras, las cepas control y los controles de calidad. Que las cepas experimentales y las cepas control estuvieran solapadas significaba que tenían la misma fracción hidrosoluble. Puesto que los QC consistían en una mezcla de todas las muestras, era lógico que se encontraran cerca de estas.

Realizamos además otro PCA para el análisis de los cien componentes más abundantes de las muestras (figura 3). Esto nos reveló que la fracción líquida de la cerveza era diferente para las muestras que habían fermentado a 22 °C y las que lo habían hecho a 35 °C.

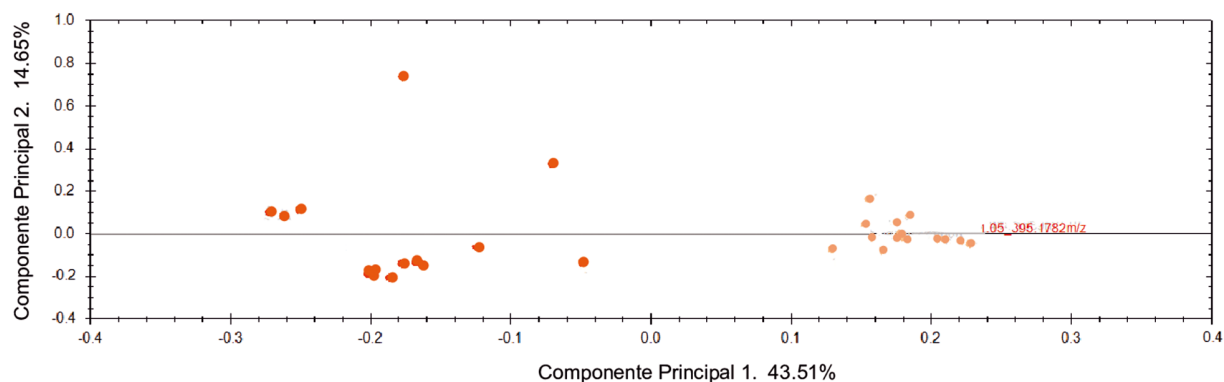


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) de los 100 componentes más abundantes presentes en las muestras a 22 y 35 °C. *Naranja = 22 °C; rosa claro = 35 °C.

Por otro lado, se analizó exclusivamente el componente de la maltotriosa con el programa *Progenesis*, lo que resultó de gran interés puesto que habíamos realizado previamente análisis genéticos del transportador de alfa glucósido (AGT1).

Se examinó de este modo qué muestras tenían más maltotriosa presente y, por lo tanto, la utilizaban menos en la fermentación. Este análisis se puede ver en la siguiente figura.

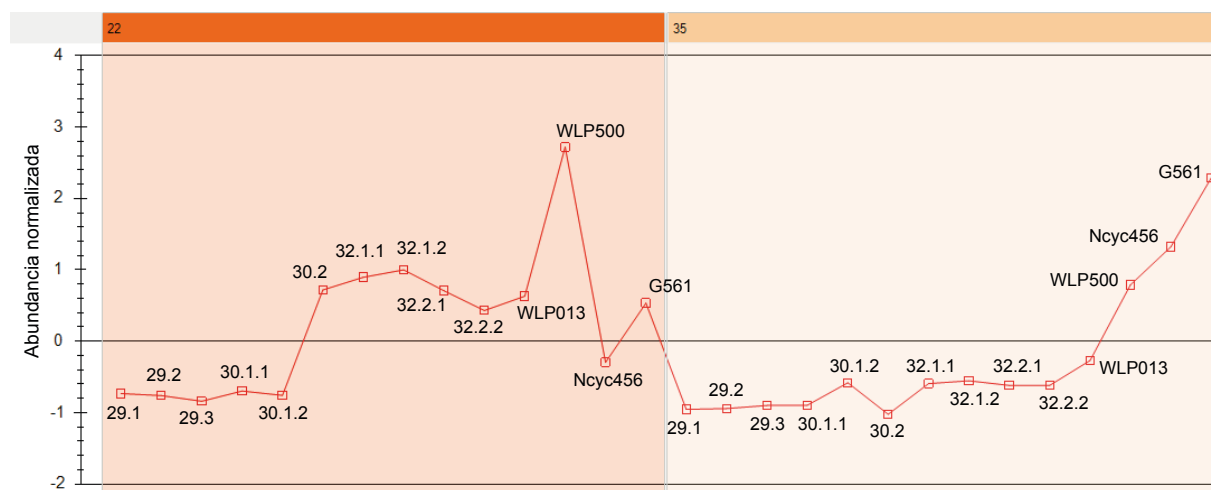


Figura 4. Representación ofrecida por el programa Progenesis de la abundancia normalizada de maltotriosa en las muestras. *Naranja = 22 °C; rosa claro = 35 °C.

Estos perfiles de abundancia normalizados no eran cuantitativos, pero fueron útiles para comparar las muestras entre ellas.



Las cepas del cultivo NFAY 29 fueron las que utilizaron la maltotriosa de un modo más eficiente en la fermentación a ambas temperaturas. Esto fue muy interesante porque sabíamos que tenían AGT1 mutado. No averiguamos la especie a la que pertenecían y podrían ser Lager, lo cual tendría sentido porque significaría que otro transportador diferente a AGT1 sería el encargado de la maltotriosa. Sin embargo, esto fue dudoso, ya que las cepas del cultivo NFAY 29 fermentaron mejor a 35 °C y las Lager fermentan mejor a temperaturas más bajas.

En cuanto a las cepas del cultivo NFAY 30, todas ellas utilizaban la maltotriosa igual de eficientemente a ambas temperaturas, exceptuando NFAY 30.2, que a 22 °C no la utilizó.

Las cepas del cultivo 32 utilizaron notoriamente la maltotriosa de manera más eficaz a 35 que a 22 °C. Durante los análisis genéticos concluimos que la cepa NFAY 32.2.1 no poseía AGT1. Sin embargo, pudimos observar que utiliza la maltotriosa con igual eficacia que el resto de cepas de su cultivo, lo que reforzaba la teoría que ha tomado más fuerza recientemente, que la mutación en AGT1 no es exclusiva de Lager pues algunas levaduras Ale pueden poseerla también.

En las muestras fermentadas con la levadura G561 se encontró presente una cantidad considerable de maltotriosa, lo que indicaba que no la utilizó de un modo óptimo.

El resultado de NCYC 456 nos informó de que utilizó la maltotriosa mejor a 22 °C. Este resultado era el esperado, puesto que se trata de una cepa Lager, y aunque tenía AGT1 mutado, se han encontrado otros tres tipos de transportadores de maltotriosa en levadura Lager.

CONCLUSIONES

Mediante la identificación de las cepas podemos llegar a la conclusión de que las cepas pertenecientes al cultivo NFAY 30, que corresponden a *Saccharomyces boulardii*, podrían ser muy prometedoras en el sector de creciente interés de los alimentos probióticos. Al tratarse de una cepa de levadura probiótica, podría emplearse para la fabricación de una cerveza probiótica, que conferiría propiedades beneficiosas para la salud.

También es muy interesante el hecho de que existen levaduras que son generalmente capaces de fermentar la maltotriosa pero que contienen varias mutaciones de desplazamiento de marco de lectura en MAL11, como es el caso de NFAY 29. Además, con el resultado obtenido de la cepa NFAY 32.2.1, apoyamos la teoría de que la mutación en AGT1 no es exclusiva, aunque sí predominante, de levaduras Lager.

Por otro lado, la influencia de la temperatura en el perfil del sabor es notoria. Las cepas NFAY producen componentes volátiles que podrían aportar sabores únicos gracias a su buena fermentación a 35 °C. También podemos destacar la diferencia entre la utilización de maltotriosa por parte de las cepas a ambas temperaturas, siendo también mejor a altas temperaturas.

Como propuesta de futuro sería muy interesante analizar, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), componentes como el glicerol y ácido acético, ya que se ha descrito que son componentes producidos en abundancia en la cerveza y tienen gran influencia en el sabor y aroma. Finalmente se propondría estudiar si existe una correlación entre los resultados experimentales y las propiedades organolépticas de la bebida obtenida.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Buzzini P, Vaughan-Martini A. *Yeast Biodiversity and Biotechnology. Biodiversity and Eco-physiology of Yeasts*. Berlin, Springer. 2014.
- [2] Sicard D, Legras J. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Elsevier. 2011;334(3):229-36.
- [3] Borneman A, Pretorius I. Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex. *Genetics*, 2015;199(2):281-91.
- [4] Carrau C, Gaggero, P, Aguilar S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends in Biotechnology*. 2015;3(33):148-54.
- [5] Kopecká J, Němec M, Matoulková D. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of Ale and Lager brewing yeast. *Sfam*. 2016;120(6):1561-73
- [6] Gallone B, Steensels J, Prah T, Soriaga L, Saels V, Herrera-Malaver B *et al*. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. 2016;166(6):1397-1410.
- [7] Qiong W, George M, James M, James R. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. AEM. 2007;73(16):5261-67.
- [8] Wrent, P. Desarrollo de métodos moleculares para la detección y tipificación de cepas de levaduras con interés industrial. UCM. 2016.
- [9] Mukha D, Wiegmann B, Schal C. Biochemistry of Insects and Molecular Biology. Evolution and phylogenetic content of ribosomal information from the DNA replication unit in Blattodea. Elsevier. 2002;32(9):951-60.
- [10] Kuan L, Porras A, Kuske C, Eichorst S, Xie G. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 2012;78(5):1523-33.
- [11] Alves S, Herberts R, Hollatz C, Miletto L, Stambuk B. Maltose and Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society of Brewing Chemists*. ASBC. 2007;65(2):99-104.
- [12] Chromacademy. Disponible en: <http://www.chromacademy.com/chromatography-headspace-GC.html>.
- [13] CromLab. Disponible en: <http://www.cromlab.es/>.
- [14] Sparkman O, Penton D, Kitson F. Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide. Burlington: Academic Press. 2011.
- [15] Harman K., Koohang A. Learning objects: standards, metadata, repositories and LCMS. California: IS. 2007.
- [16] Chris White. White Labs. EEUU: Chris White y asociados. Disponible en: <http://www.whitelabs.com/>
- [17] Colección Nacional de Cultivos de Levadura. Parque de investigación de Norwich: Carmen Nueno-Palop. Disponible en: <http://www.ncyc.co.uk/>.
- [18] Kopecká J, Němec M, Matoulková D. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. *Applied Microbiology*. Sfam. 2016;120(6):1561-73.



- [19] Czerucka D, Piche T, Rampal P. Yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii* AP&T. 2007;26(6):767-78.
- [20] Vidgren V, Ruohonen L, Londesborough J. Characterization and functional analysis of the MAL and MPH Loci for the use of maltose in some strains of yeast ale and lager. *Applied and environmental microbiology*. ASM. 2005;71(12):784657.
- [21] Yoshihiro N., Takeshi K., Takehiko I., Yukiko K., Sandra R., Norihisa N *et al.* Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA research*, DNA res. 2009;16(2):115-29.
- [22] Pérez L. Obtención, estabilización y selección de levaduras híbridas de *Saccharomyces* de interés enológico. Valencia, UV. 2015.
- [23] Zambrano T, Raigón M. Evaluación de compuestos aromáticos en cervezas de producción ecológica y convencional. UPV. Disponible en: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/60755/TFM %20TMZN_14485614336646101639562764350802.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/60755/TFM%20TMZN_14485614336646101639562764350802.pdf?sequence=1).
- [24] Batxer E, Hughes P. Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects. UK, RSC paperbacks. 2001.
- [25] Maarse H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. NY, Marcel Dekker. 1991.
- [26] Mencia G, Pérez R. Desarrollo de cerveza artesanal Ale y Lager con malta de maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare*), carbonatada con azúcar y miel de abeja. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 2016.



ANEXO

Receta para la producción de cerveza

MSc2017 IPA

American IPA (14 B)

Type: All Grain**Batch Size:** 44,00 l**Boil Size:** 55,34 l**Boil Time:** 90 min**End of Boil Vol:** 47,84 l**Final Vol:** 43,00 l**Fermentation:** Ale, Two Stage**Taste Notes:****Data:** 13 Feb 2017**Brewer:****Asst Brewer:****Equipment:** Braumeister 50 L**Efficiency:** 74,00 %**Est Mash Efficiency:** 77,6 %**Taste Rating:** 30.0

Ingredients

Amt	Name	Type	#	%IBU
55.00 l	Jonsvalnet, Trondheim IPA	Water	1	-
22.00 g	GYPSum (Calcium Sulfate) (Mash 60.0 mins)	Water Agent	2	-
5.50 g	Baking Soda (Mash 60.0 mins)	Water Agent	3	-
5.50 g	Chalk (Mash 60.0 mins)	Water Agent	4	-
1.10 g	Epsom Salt (MgSO ₄) (Mash 60.0 mins)	Water Agent	5	-
0.00 kg	CIATCAU PALC ALC (0.5 CDC)	Grain	6	70.0 %
1.75 kg	WHeat (6.0 EBC)	Grain	7	13.7 %
1.50 kg	Caramel /Crystal Malt – 30L (59.1 EBC)	Grain	8	11.8 %
0.50 kg	Corn Sugar (Dextrose) (0.0 EBC)	Sugar	9	3.9 %
0.02 g	Zinc Sulfate (ZnSO ₄ x 7H ₂ O) (Boil 90,0 mins)	Water Agent	10	-
100.00 g	Target (9.00%) – Boil 60.0 min	Hop	11	46.6 IBUs
50.00 g	Chinook (13.00%) – Boil 15.0 min	Hop	12	16,7 IBUs
2.0 pkg	Safale American (DCL/Fermentis #US -0.5) (50.28 ml)	Yeast	13	-
150.00 g	Chinook (13.00%) – Dry Hop 7,0 Days	Hop	14	0.0 IBUs

Gravity, Alcohol Content and Color

Est Original Gravity: 1.066 SG**Est Final gravity:** 1.011 SG**Estimated Alcohol by Vol:** 7.5 %**Bitterness:** 63.3 IBUs**Est Color:** 19.8 EBC**Measured Original Gravity:** 1.046 SG**MEasured Final Grvity:** 1.010 SG**Actual Alcohol by Vol:** 4.7 %**Calories:** 427.1 kcal/l

Mash profile

Mash Name: Single Infusion, Light Body, No**Mash Out****Sparge Water:** 35,66 l**Sparge Temperature:** 75.6 C**Adjust Temp for Equipment:** TRUE**Total Grain Weight:** 12.75 kg**Grain Temperature:** 22.2 C**Trun Temperature:** 22.2 C**Mash PH:** 5.20

Mash Steps

Name	Description	Sted Temperature	Step Time
Mash in	Add 32,45 l of water at 77.7 C	65.6 C	75 min

Sparge: Fly sparge with 35.66 l water at 75.6 C**Mash Notes:** Simple single infusión mash for use with most modern well modifiedd grains (about 95% of the time).

Carbonation and Storage

Carbonation Type: Bottle**Pressure / Weight :** 252.93 g**Keg/Bottling Temperautre:** 21.1 C**Fermentation:** Ale, Two Stage**Volume of CO₂:** 2.3**Carbonation Used:** Bottle with 252.93 g Corn Sugar**Age for:** 30.00 days**Storage Temperature:** 18.3 C

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	177-195	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

Diccionario etimológico de protistología

Etymological dictionary of protistology

Fecha de recepción y aceptación: 19 de septiembre de 2017, 16 de diciembre de 2017

Enrique Carbonell Baldoví^{1*} y Ramiro Soler Castillo²

¹ Departamento de Ciencias Experimentales y Matemáticas. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Producción Animal y Salud Pública. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Departamento de Ciencias Experimentales y Matemáticas. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. *E-mail*: enrique.carbonellb@ucv.es.



RESUMEN

Cerca de 170 vocablos se han analizado sobre su origen. La mayoría están relacionados con palabras extraídas de programas y textos de protistología de interés médico veterinario. Como cabía esperar, la mayor parte son de origen griego, siguiendo el latín y los nombres propios de investigadores relacionado con los protistas en cuestión.

El número total de vocablos analizados fue 168, de los cuales más de la mitad son de origen griego, que casi siempre pertenecen a prefijos. Un 24 % son de origen latino y la mayor parte corresponden a sufijos. Los restantes hacen referencia a investigadores y/o descubridores del agente en cuestión (10 %), distribución geográfica, nombres de órganos diana, síntomas y nombres autóctonos.

PALABRAS CLAVE: *protista, terminología, etimología.*

ABSTRACT

Over 170 words have been analyzed about their origin. The majority are related to words extracted from programs and texts of Protistology of veterinary medical interest. As expected, most are of Greek origin, following the Latin and the proper names of researchers related to the protists in question.

The total number of words analyzed was 168, of which more than half are of Greek origin, which almost always belong to prefixes. 24 % are of Latin origin and most correspond to suffixes. The rest refer to researchers and / or discoverers of the agent in question (10 %), geographical distribution; names of target organs, symptoms, local names.

KEYWORDS: *protista, terminology, etymology.*

INTRODUCCIÓN

La nomenclatura binomial de los seres vivos fue ideada y aplicada por el naturalista sueco Carlos Linneo a todos los organismos conocidos durante los años 1753 (plantas) y 1758 (animales) (Linneo, 1758). Desde entonces, todos los seres han sido nominados con un nombre (género) y un apellido (especie). En este sentido, las lenguas griega y latina han sido vitales para las nominaciones, destacando el uso de la primera en los géneros y de la segunda en las especies.

Desde el punto de vista docente, el conocimiento etimológico de todos y cada uno de los nombres y de los vocablos relacionados sirve de gran ayuda pedagógica, ya que los nombres de géneros y especies, así como de los taxones superiores, hacen referencia a particularidades morfológicas, funcionales, ecológicas, geográficas, etc. Este sistema ha sido aceptado, desde el principio, de forma universal, y raro es el día que no se descubran nuevos géneros y especies.

El material utilizado se ha extraído especialmente de los programas de protistología de la especialidad de Parasitología para Veterinarios (Georgi, 2011), de Parasitología médica (García Rodríguez, 2016) y de Lom & Dikova (1992).

En 1969, Whittaker propuso la creación de cinco reinos para clasificar todos los organismos vivos, quedando excluidos los virus por razones obvias. En este esquema, los protozoos son reemplazados por protistas como reino y trasladando myxozoa al reino animal y microspora al reino de los hongos.

RESULTADOS

Se han analizado, sobre su origen, 168 vocablos extraídos de programas de parasitología, concretamente de protistas parásitos. La mayoría de vocablos griegos pertenecen a los prefijos, mientras que las palabras de origen latino se corresponden a los sufijos.

Número total de vocablos	168
Origen griego (prefijos)	59 %
Origen latino (sufijos)	24 %
Nombres de investigadores	10 %
Varios (distribución geográfica, nombre síntomas, enfermedad, nombres autóctonos, etc.).	7 %



DICCIONARIO ETIMOLÓGICO

A

Acanthamoeba

Acantha = espina, amoeba = ameba.

Ameba que emite pseudópodos puntiagudos (acantopodios).

Patógena de peces, *A. polyphaga*, en branquias y digestivo de peces (poly = muchos, phagos = comer).

Foronte (vector) de *Legionella*, hongos y virus.

Meningoencefalitis amebiana del hombre.

Alveolata

Alveol = alveolo, ata = grupo de animales.

Conjunto de protistas que durante su desarrollo presentan cavidades alveolares en disposición periférica.

Comprende tres filos:

- Dinoflagellida alveolo = capas externas de celulosa.
- Apicomplexa alveolo = membrana interna.
- Ciliophora alveolos = cavidades mitocondriales.

Amebozoa

Amoeba = ameba, zoon = animal.

Filo de protistas que engloba los organismos llamados amebas.

Amoeba

Amoeba = cambiar.

Protistas que carecen de membrana citoplásmica, lo que les permite cambiar de forma, emitiendo pseudópodos para desplazarse e ingerir alimentos (fagocitosis).

Amyloodinium

Amyl = almidón, ood = huevo, idium = diminutivo.

Dinoflagelado, agente causal de la enfermedad del terciopelo, que afecta a gran número de peces marinos (eurixeno). Afecta a branquias y piel; tienen forma ovalada y su citoplasma está repleto de vacuolas con amilosa. La especie *A. ocellatum* (ocellatum = ocelo) lleva una especie de mancha ocular que corresponde a un cloroplasto.

Aparato parabasal

Para = al lado de, basal = base (base de los flagelos).

Se trata de un aparato de Golgi adaptado a funciones específicas de los tricomonádidos y otros grupos como clase parabasalía.



Apicomplexa

Api = apical, complexa = complejo.

Filo del grupo alveolata, parásitos obligados de los enterocitos y células sanguíneas de los vertebrados, incluido el hombre.

Un conoide y, sobre todo, dos a cuatro roptrías permiten la entrada de los parásitos (esporozoitos) en las células hospedadoras.

Tres clases:

- Gregarina, epitelio intestinal de invertebrados, principalmente artrópodos.
- Coccidia, epitelio intestinal de vertebrados.
- Haematozoa (haemosporida), eritrocitos de mamíferos y aves.

Axostilo

Axo = eje, stilo = estilo.

Microtúbulos empaquetados en una estructura rígida que rodea el núcleo y recorre ventralmente todo el cuerpo, saliendo al exterior en forma de punzón. Constituye un eje esquelético longitudinal en los tricomonádidos y otros flagelados parabasales y los oxymonádidos hypermastiginos del intestino de termitas y escarabajos de la madera.

B

Babesia

Babes, Víctor (1854-1926), bacteriólogo rumano.

Género de piroplasma con especies parásitas de los hematíes de las vacas (*B. bovis*), perros y gatos (*B. canis*, *B. cati*), équidos (*B. caballi*), *Babesia bigemina* (Bi = dos, geminis = gemelos) y *B. equi*.

Además de al ganado puede infectar al hombre.

Balantidium

Balant = bolsa, idium = diminutivo.

Ciliados con ciliatura uniforme. Litostomea, Vestibulifera.

B. coli (coli = intestino grueso). Requiere inmunoalteraciones. Ciliado que habita el colon del cerdo y del hombre.

Bradizoides

Bradi = lento, zoito = diminutivo de animal.

Merozoitos de multiplicación lenta, que facilitan la formación de quistes, a partir de los taquizoitos iniciales. Toxoplasma y otros coccidios afines. Formas extraintestinales crónicas que aparecen en músculos y cerebro de mamíferos y hombre.

Brooklinella

Brooklinella hostilis, *B. clownfish*.

Brooklin, ella = diminutivo de Brooklin, hostilis = hostil, clownfish = pez payaso.



Dermatitis mucosa en peces marinos.
 Filo Ciliophora, clase Phyllopharyngea.
 Phyllae = cintas microtubulares, pharyngea = citofaringe.
 Barras o nematodesmas alrededor de la boca.

C

Caryon

Karion = nuez, núcleo
 Hace referencia al núcleo de todas las células.

Chilodonella

Chil = mil, odon = dientes, ella = diminutivo
 Filo Ciliophora, clase Phyllopharyngea.
 Phyllae = cintas, pharyngea = citofaringe.
 En peces de agua dulce : *Chilodonella uncinata*.
 Chilodon = mil, ella = diminutivo, uncinata = gancho.
 Tienen una especie de pico en la cara ventral.

Ciliophora

Cilium = cilio, pestaña, phora = llevar.
 Filo del grupo alveolata, que engloba todos los protista recubiertos, total o parcialmente, de cilios.
 Vida libre, comensales, parásitos y mutualistas.
 Subfilo Intramacronucleata.
 Intra = dentro, macronucle = macronúcleo, ata = grupo de animales.
 Sistemática de las especies de interés veterinario.
 Clase Litostomatea

Subclase Trichostomatia
 Orden Vestibulifera
 Géneros Balantidium. Isotricha, Dsytrica

Clase Phyllopharyngea
 Orden Cyrtophorida
 Géneros *Chilodonella*. *Brooklinella*
 Subclase Hymenostomatia
 Géneros *Ichthyphthirus*, *Tetrahymena*, *Cryptocaryon*
 Subclase Scuticulociliata
 Géneros *Philasterides*, *Uronema*, *Pleuronema*
 Subclase Peritricuia
 Orden Mobilida
 Género *Trichodina*
 Orden Sessilida



Citoprocto

Cito = célula, procto = ano.

Vacuola de los ciliados que funciona como ano.

Citostoma

Cito = célula, stoma = boca.

Nombre de la abertura oral en flagelados y ciliados.

Coccidia

Coccus = grano, idia = pequeño.

Clase del Filo Apicomplexa, que comprende parásitos endocelulares obligados del epitelio intestinal y otros epitelios.

Conoide

Cono = cono, eidos = parecido, semejante.

Apicomplexa. Estructura rígida para la penetración de esporozoitos y merozoitos en las células diana.

Con conoide (conoidosida): gregarinia y coccidia.

Conoide atrófico (aconoidosida): Haematozoa (Haemosporida).

Costa

Fibrilla corta que une la membrana ondulante de las tricomonas con el cuerpo celular.

Cryptocarion

Krypto = oculto, escondido, karyon = núcleo.

Ciliado responsable de la enfermedad marina del punto blanco.

ICH marino. Es complicado encontrar ejemplares con el macronúcleo visible.

Cryptocarion irritans en piel y branquias de lubina, dorada y otros peces marinos.

Cryptosporidium

Krypto = escondido, spor = espora, idium = pequeño.

C. parvum (parvum = pequeño), especie cosmopolita que afecta al intestino de los vertebrados, incluido el hombre. Coccidio pequeño difícil de observar. Una tinción especial de frotis fecales permite identificarlo.

Cyrtophorida

Cyrto = curvado, phorida = llevar.



D

Dasytricha

Dasy = arrugados, tricha = cabellos.

Ciliados mutualistas del rumen con actividad celulolítica.

Dientamoeba

Di = dos, enta = interno, amoeba = ameba.

Ameba intestinal, comensal, que tiene dos núcleos.

Dientamoeba fragilis, intestino grueso del hombre.

Actualmente se la considera un tricomonádido por haber perdido secundariamente los flagelos.

Dinoflagellida

Dino = movimiento, flagel = flagelo, ida = sufijo de filo.

Filo de alveolata, donde los alveolos darán lugar a glándulas que segregan placas externas de celulosa. Marinos y dulceacuícolas. Dinosporas móviles mediante dos flagelos. Branquias y piel de peces.

Amyloodinium ocellatum, en peces marinos. ICH marino.

Piscinoodinium pillularis, en peces de agua dulce. ICH dulceacuícola.

Diplomonadida

Diplo = doble, mona = indivicuo, uno, unidad.

Individuos gemelares parásitos intestinales de peces (*Hexamita*) y carnívoros y hombre (*Giardia*).

Ver Fornicata.

División

Separar en dos o más partes:

División binaria sin eje	Amebozoa
División binaria longitudinal	Flagelados (Excavata)
División binaria transversal	Ciliados
División nuclear múltiple	Apicomplexa, Dinoflagelida
División simple con intercambio	Conjugación (ciliados)

Durina

Al dourin = impuro.

Enfermedad del caballo que afecta al área genital con la expulsión de exudados patológicos. Agente causal: *Trypanosoma equiperdum*.



E

Eimeria

Eimer, Theodor (1843-1898), zoólogo alemán.

Género de coccidios con especies en todos los vertebrados.

Aves: *Eimeria tenella*, *E. necatrix*.

Conejos: *Eimeria* máxima (la mayor), *E. stiedae* (Stieda, Ludwig; médico alemán, 1837-1918).

Terneros y otros herbívoros: *Eimeria bovis*, ganado vacuno; *E. ovis*, corderos; *E. capri*, cabritos.

Équidos: *Eimeria equi*, potros.

Endodiogenia

Endo = dentro, di = dos, genia = nacer.

En el interior de un individuo nacen dos réplicas del original. Ocurre en ciertos merozoitos de los apicomplejos.

Entamoeba

Enta = interna, amoeba = ameba.

Intestino de casi todos los vertebrados de vida libre, comensales y parásitos.

Especies parásitas.

Entamoeba histolytica.

Enta = dentro, amoeba = ameba, histo = tejido y lisis = destruir

Intestino grueso del hombre y perro. Disentería amebiana. Metástasis a tejidos (hígado, pulmones, cerebro y úlceras cutáneas) con lesiones necróticas.

E. invadens (invadens = invadir)

Especie invasiva de los reptiles. Disentería amebiana de las serpientes y lagartos cautivos.

Especies comensales

E. dispar (dispar = diferente). Acompaña a *E. histolytica*. Más pequeña, saprofita.

E. gingivalis (gingive = encía). Comensal en cavidad oral, en los espacios peridentales.

Hombre, primates, carnívoros, équidos.

E. coli (*coli* = intestino grueso). Hombre, primates, perros.

E. bovis (*bovis* = *vacuno*). Intestino grueso del ganado vacuno. Ovejas y cerdos.

E. gallinarum (*gallinarum* = de las gallinas). Ciegos de las gallinas.

E. gadi (*Gadus* = bacalao). Intestino del bacalao.

Esquizogonia

Skizo = dividir, gonía = nacer, generar.

División asexual de los apicomplejos en la que múltiples divisiones del núcleo generan réplicas del individuo original.

Esquizonte

Skizo = dividir, onte = ser, ente.

Una división nuclear múltiple da lugar a tantos individuos replicados (esquizozoitos, merozoitos) como porciones del núcleo se han dividido.



Esquizozoito

skizo = dividir, zoito = animal diminutivo.

Cada uno de los individuos generados en una esquizogonia. Sinónimo de merozoito.

Euglena

Eu = verdadero, glena = pupila, ojo.

Flagelado de vida libre que presenta una mancha ocular en la parte anterior, en la base del flagelo.

Euglenozoa

Eu = verdadera, glena = pupila, zoon = animal.

Filo que comprende parte de los antiguos flagelados.

Clase Kinetoplastea (trypanosomas y afines).

Excavata

Excav = excavado, ata = grupo de animales.

Conjunto de protistas que poseen una excavación o estría ventral por donde ingresan los alimentos (citostoma).

Antiguos flagelados: mastigophora

Mastigos = látigo, phora = llevar

Filos :

Metamonada. Clases: parabasalia y fornicata

Euglenozoa. Clase: kinetoplastea

Extrusoma

Extru = hacia fuera, soma = cuerpo.

Se trata de ciertos orgánulos intracelulares que bajo ciertos estímulos, físicos o químicos, descargan su contenido al exterior. En amebas y otros protistas.

F**Fornicata**

Fornix = arco, bóveda, ata = grupo de animales.

La mayoría son planos y cóncavos, actuando la cara ventral como una gran ventosa. Durante el Imperio romano los *fornix* eran lugares abovedados, en puentes y callejuelas, donde se practicaba la prostitución. Diplomonádidos.

G**Giardia**

Giard, Alfred (1840-1908), biólogo francés.



Lambl, Vilem Dusan (1842-1896), médico checo que descubrió el flagelado que luego se llamó *Giardia lamblia*.

Diplomonádido plano y cóncavo. Hombre y perro. Parasita el duodeno del hombre.

Tres grupos:

<i>G. agilis</i>	Anfibios
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos, reptiles y aves
<i>G. muris</i>	Roedores, aves

Gregarina

Gregarium = vivir agrupados.

Apicomplejos que parasitan el intestino de numerosos artrópodos.

En relación con los coccidios son mucho más grandes, hasta 500 micras.

H

Haemosporida

Haemos = sangre, spora = espora, ida = sufijo de orden.

Orden de coccidios sanguíneos intraeritrocíticos de mamíferos y hombre. Sin. Haematozoa.

Plasmodium = masa citoplásmica multinucleada (esquizontes).

Babesia. Piroplasma. De Babes.

Theileria.

Hammondia

Hammond, William (1828-1900). Neurólogo norteamericano.

Coccidios del perro y gato con roedores como hospedadores intermediarios.

Hepatozoon

Hepato = hígado, zoon = animal.

Coccidio con fase intestinal y fase hepática. *H. canis* y *H. muris*. Lesiones en hígado, bazo y ganglios linfáticos.

Factores inmunodepresivos: *Ehrlichia canis*, microfilarias, virus moquillo, *Haemobartonella*.

Hexamita

Hexa = seis, mita = filamentos.

Diplomonádido con tres pares de flagelos.

Hexamita salmonis, intestino de salmón con cuadros diarreicos.

Hipnozoito

Hipno = sueño, zoito = diminutivo de animal.

Fase de reposo hepático de los esquizontes de *Plasmodium vivax* y *P. ovale*.



Histomonas

Histo = tejido, monas = individuo, uno, unidad.

Histomonas meleagridis, parásito intestinal (ciegos) del pavo (= meleagridis) y otras aves, con lesiones en otros tejidos (hígado), enterohepatitis infecciosa, enfermedad de la cabeza negra del pavo.

Hymenostomatida

Hymen = membrana, stoma = boca, ida = sufijo de orden.

Los cilios peribucles se fusionan formando pequeñas membranas alrededor del citostoma.

Orden de la clase Oligohymenophorea (Ciliophora).

ICH marino y dulceacuícola.

Tetrahymena thermophila, de gran interés en biología experimental.

Tetra = cuatro, hymen = membrana, thermo = calor, phila = afin, amigo.

I**Ichthyophthyrus**

Ichthyus = pez, phtyrus = piojo.

Agente de la enfermedad del punto blanco en peces de agua dulce.

(ICH dulceacuícola). Hymenostomatida.

Isospora

Iso = iguales, spora = espora; se refiere a los dos esporoblastos que hay en cada ooquiste.

Coccidio de los carnívoros y hombre.

Isospora canis, I. felis, I. belli.

Isotricha

Iso = iguales, tricha = cabellos.

Ciliados mutualistas del rumen con actividad celulolítica.

L**Leishmania**

Leishman, William Boog. Médico inglés (1865-1926).

LEISHMANIOSIS CUTANEA. BOTON DE ORIENTE

Viejo Mundo, vector: *Phlebotomus* spp.

Phlebo = venas, tomus = cortar.

Díptero hematófago. Flebotomo, mosca de loa arenales, beatilla.

L. major. La más grande.

L. tropica. Del trópico africano.

L. aethiopica. De Etiopía.



LEISMANIOSIS MUCOCUTÁNEA

Nuevo Mundo, vector: *Lutzomya* spp.

Lutz = zoóloga brasileña, mya = insecto.

Díptero hematófago del continente americano.

L. mexicana. De Méjico.

L. braziliensis. De Brasil.

LEISMANIOSIS VISCERAL. KALA AZAR

Viejo Mundo, vector: *Phlebotomus* spp.

L. donovani. Donovan, Edward. Farmacéutico inglés (1789-1837).

Nuevo Mundo. Vector: *Lutzomya* spp.

L. chagasi. Chagas, Carlos. Médico brasileño (1879-1934).

Litostomatia

Litos = pétreo, stoma = boca.

Depredadores de *Paramaecius* = Haptorios.

Trichostomatia. Trichos = cabellos, stoma = boca.

Mechones de cilios largos alrededor de la boca.

Balantidium coli, único parásito del hombre y cerdo, en condiciones inmunoalteradas.

M**Mastigophora**

Mastix, gos = látigo, phora = llevar.

Junto con sarcodina, antiguo filo que comprendía los flagelados y las amoebas.

Merogonia

Mero = porción o trozo, gonos = generar.

Sinónimo de esquizogonia.

Meronte

Sinónimo de esquizonte.

Merozoito

Mero = porción, zoito = animal diminutivo.

Sinónimo de esquizoito.

Metamonada

Meta = más avanzado, mona = individuo, uno, unidad.

Filo del grupo Excavata que comprende anaerobios, comensales, parásitos y mutualistas. Tres clases:

Fornicata: flagelados cóncavos.

Parabasalía: flagelados con aparato parabasal.

Preaxostyla: un preaxostilo cerca del axostilo.



Microspora

Micro = pequeño, espora.

Antiguos protozoos, hoy fungi por contener una capa de celulosa en la pared de la espora. Esporas muy pequeñas, 2-4 micras.

Parásitos obligados en células gigantes (xenomas de peces).

Xenoma. Xeno = extraño, oma = tumor.

Mobilida

Ciliados peritricos móviles, parásitos oportunistas de peces.

Trichodina spp. Doradas y otros peces marinos.

Mucosoma

Extrusomas que descargan mucus y otros materiales para formar quistes en amebas, flagelados y otros protistas.

Myxozoa

Myxo = moco, zoa = animal.

Antiguos protozoos, hoy metazoos por su carácter pluricelular y formación de células germinales.

Parásitos obligados de peces. En sistema muscular, piel y otros tejidos forman abscesos con exudados mucosos.

N**Naegleria**

Naegleria fowleri Naegler = Karl Naegler. Médico que descubrió la ameba (1909).

Fowler = Thomas Fowler, médico inglés (1736-1801).

Ameba de aguas estancadas responsable de la meningoencefalitis amebiana del hombre.

Nagana

Nagana = sin fuerzas.

Enfermedad del ganado producida por el *trypanosoma brucei brucei*.

Nematocistos

Nematos = hilo, cistos = quiste.

Extrusomas que contienen filamentos con diferentes funciones.

Microspora: inyección de amébulas.

Muxozoa: fijación esporas.

Neospora

Neo = nuevo, espora.

Neospora canis, nuevo coccidio de los perros.



O

Oligohymenophorea

Oligo = poco, hymeno = membrana, phorea = llevar.

Clase de ciliados que tienen pocas membranas peribucuales.

Enfermedad del punto blanco y otros procesos oportunistas de peces marinos y de agua dulce.

Subclases:

Hymenostomatia: *Tetrahymena*, ICH.

Peritrichia.

Scuticulociliatia.

Oonicetos

Oo = huevos, myke = hongos.

Protistas filamentosos.

Saprolegnales.

Oportunistas de peces (Enfermedad del algodón).

Ooquineto

Oo = huevo, kinetos = movimiento.

Huevos móviles de los apicomplejos de la sangre, que tras la esporulación forman cientos de esporozoitos, que emigran desde el intestino de los mosquitos a las glándulas salivales y cavidad oral.

Ooquiste

Oo = huevo, quiste = ídem.

Forma infectiva y de resistencia de los apicomplejos, excepto las formas sanguíneas (haematozoa), como resultado de la gametogonia, que contienen de 4 a 16 esporozoitos.

Los huevos van protegidos con una doble membrana rígida y resistente al ambiente.

P

Parabasalialia

Para = al lado, cerca-del núcleo, basalia = aparato basal.

Grupo de protistas que contienen aparato parabasal. Tricomonádidos. *Histomonas*, *Dientamoeba*.

Paramoeba

Para = cerca, al lado, amoeba = ameba.

Una estructura densa aparece cerca del núcleo.

Paramoeba pemaquidensis, en branquias de salmones.

Pentatrichomonas

Penta = cinco, trichos = cabello, monas = individuos.

Pentatrichomonas hominis, flagelado comensal del intestino del hombre.



Perítricos

Peri = alrededor, trichos = cabellos.

Ciliados con cilios alrededor de la campana o disco oral.

Oportunistas.

Fijos, sésiles	Sessilida	<i>Epystilis spp.</i>
Móviles	Mobilida	<i>Trichodina spp.</i>

Peroxisomas

Extrusomas en forma de vesículas presentes en células eucariotas que intervienen en el metabolismo lipídico, acortando los ácidos grasos de cadena larga, que contienen oxidasa y catalasa. Forman agua oxigenada para aturdir o matar bacterias (fagocitosis).

Philasterides

Phil = apetencia, amigo y aster = astro.

Los cilios se disponen como en un objeto estrellado. *Philasterides dicentrarchi* (*dicentrarchi* = lubina), especie histófaga que produce graves lesiones en cerebro, hígado, músculos etc., en cultivos de lubina, rodaballo y otros peces planos.

Phlebotomus

Phlebo = vena, tomus = cortar.

Insecto díptero hematófago, hospedador intermediario y vector de la leishmaniosis de Eurasia y África. Por la posición al picar se le llama beatilla y mosca de los arenales por su hábitat. Por la presión urbanística se ha adaptado a zonas muy alejadas del mar.

Piroplasmida

Pirum = pera, plasma = obra, modelo.

Los trofozoitos intraeritrocíticos semejan llamas de fuego de un cirio o peras (piriformes).

Dos géneros: *Babesia* y *Theileria*.

Ganado, animales carnívoros y hombre.

Piscinoodinium

Piscin = sentido de agua dulce, oo = huevo, forma aovada, idium = pequeño.

Enfermedad del punto blanco en peces de agua dulce.

Plasmodium

Plasma = obra, modelo, idium = diminutivo.

Masa citoplásmica multinucleada.

Hace referencia a los esquizontes multinucleados (inmaduros).

P. vivax Trofozoitos móviles.

P. ovale Microgametocitos con núcleo oval.

P. falciparum Microgametocito curvado, en forma de hoz.

Malaria = mal aire. Paludismo, paludis = laguna.



Hábitat de los vectores *Culex, culicis* = Lat. mosquito.

Tercianas benignas *Pl. vivax* y *Pl. ovale*.

Cuartanas benignas *Pl. malaræ*.

Tercianas malignas *Pl. falciparum*.

Aves *Pl. relictum*.

Pleuronema

Pleuro = lado, costado, nema = hilo.

Ciliado relacionado con la escuticulociliatosis del rodaballo.

Tienen un filamento largo en uno de los costados.

Protistas

Primerísimos, primordiales.

Protoctista

Los primerísimos, primigenios.

Protozoos

Proto = primeros, zoos = animales.

Nombre en desuso de los primeros organismos eucariotas, que aparecieron después de las bacterias, hace unos 1.500 millones de años. Actualmente no se les considera como animales, se engloban en un Reino llamado protistas.

Q

Quinetoplasto

Kineto = movimiento, plasto = sentido de orgánulo.

Estructura formada por un centriolo y una pequeña poción de la mitocondria, propia de los monoflagelados. Kinetoplastia.

S

Sarcocystis

Sarco = carne, músculo, cystis = quiste.

Género *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia*.

Las especies se nominan mediante dos vocablos latinos; el primero se refiere al hospedador secundario, herbívoro (fase muscular), y el segundo al hospedador principal, carnívoro (fase intestinal).

Ejemplos:

Sarcocystis bovi hominis (ternera-hombre).

Sarcocystis ovi canis (oveja-perro).



Sarcodina

Sarcos = carne, dina = que se mueve.

Junto con Mastigophora constituyen el filo Sarcomastigophora, filo antiguo que se ocupaba de amebas y flagelados.

Scuticulociliatia

Ver Philasterides.

Sessilina

Ciliados peritricos fijos, oportunistas de peces.

Epystilis spp.

Surra

Surra = corrupto.

Enfermedad del ganado producida por *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma suis*

T**Taquizoito**

Taqui = rápido, zoito = diminutivo de animal.

Bradizoitos por rotura de los quistes, de multiplicación rápida y agudización hasta formar pseudoquistes, de *Toxoplasma gondii* y otros coccidios afines. Fase extraintestinal aguda en mamíferos y hombre.

Tetrahymena

Tetra = cuatro, hymen = membrana.

Ciliado comensal oportunista indicador de la calidad del agua.

Theileria

Theiler, Arnold, (1836-1936). Veterinario sudafricano

T. annulata, en forma de anillo

T. equi, de los caballos

T. microti, de los roedores

Toxoplasma

Toxo = romo, plasma = organización, modelo, forma.

Toxoplasma gondii.

Gondii = grupo de roedores norteafricanos, en los que se descubrieron los pseudoquistes en músculos y cerebro.

Coccidio del gato que forma quistes en hombre y ganado y otros animales. Especialmente patógena para los fetos (hembras preñadas).



Trichodina

Tricho = cabello, dina = movimiento.

Perítrico, con movilidad, que parasita la piel y branquias de peces marinos.

Son, más bien, ectocomensales, y su presencia indica mala calidad de las aguas. Se observan también sobre crustáceos y moluscos.

Trichodinella

Tricho = cabello, ella = diminutivo.

Enfermedad cutánea en peces semejante a la trichodinosi.

Trichomonas

Tricho = cabellos, mona = individuo, uno.

Cinco flagelos, cuatro libres y uno con membrana ondulante.

Excavata Parabasalia con una sola especie: *Trichomonas vaginalis*, que parasita los genitales de la mujer y el hombre.

Tritrichomonas

Tri = tres, tricho = cabellos, mona = individuo.

Excavata Parabasalia con tres flagelos libres y uno con membrana ondulante.

T. foetus, var. *Bovis*. Genitales ganado vacuno. Abortos.

T. foetus, var. *Cati*. Intestino grueso del gato.

Otras variedades son saprofitas o comensales de caballos y cerdos.

Trofozoito

Tropho = crecer, zoito = diminutivo de animal.

Forma vegetativa de los protistas que se alimentan y crecen.

Trypanosoma

Trypano = taladro, soma = cuerpo.

Flagelado con piezas bucales dispuestas para trepanar la piel.

Los tripomastigotes infectivos se concentran en el digestivo anterior (Salivaria) o en el recto (Stercoraria).

<i>T. brucei brucei</i>	Bruce, David. Cirujano inglés (1855-1931).
<i>T. b. gambiense</i>	Enfermedad del sueño crónica, Gambia.
<i>T. b. rhodesiense</i>	Enfermedad del sueño aguda, Rhodesia.
<i>T. lewisi</i>	Sangre de ratas. Pulgas.
<i>T. evansi</i>	Surra = corrupto.
<i>T. equinum</i>	Equi = caballo.
<i>T. equiperdum</i>	Durina. Al dourin = impuro.
<i>T. suis</i>	Suis = cerdo.
<i>T. cruzi</i>	Cruz, Oswaldo. Médico brasileño (1871-1917). Enfermedad de Chagas. Vector: Hemípteros (Triatomus).



Trypanosoma percae. *T. triglae*.

Peces. Vector: Hirudíneos.

U

Uronema

Uro = cola, nema = hilo.

Scuticulociliado. Presentan un filamento caudal característico.

Enfermedad del pez payaso, en el que es muy frecuente. Afecta a la piel de numerosos peces de agua salada, en forma de úlceras y otras lesiones, a veces sangrantes.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dwight DB. Georgis Parasitología para Veterinarios. ELSEVIER, Madrid. 2006.
- [2] García Rodríguez, JN. Compendio de Microbiología. ELSEVIER. Madrid. 2011.
- [3] Lomm, J, Diková I. Protozoan parasites of fishes. Amsterdam, Elsevier. 1992.
- [4] Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations and better represented by new classifications than by traditional two kingdoms. Science. 1969;163:150-60.
- [5] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains of Archaea, Bacteria and Eucarya. Proceedings of National Academy of Science. U.S.A. 1990;87:4576-79.
- [6] Yarza F, Yarza S. Diccionario griego-español. Barcelona, Ed Sopena. 1972.



<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	197-198	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

NORMAS DE ADMISIÓN Y PRESENTACIÓN DE LAS COLABORACIONES ADMISSION AND PRESENTATION STANDARDS FOR CONTRIBUTIONS

Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación
Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation

1. Los trabajos, que deben ser originales (artículos científicos y revisiones bibliográficas), no pueden estar presentados a otra publicación simultáneamente. Debido a su dimensión nacional e internacional, los artículos pueden redactarse en español o preferentemente en inglés. Se aplicará el software EPHORUS para la detección de plagios.

2. El autor debe registrarse en la plataforma <http://revistas.ucv.es/index.php/Nereis> para enviar el trabajo y seguir todo el proceso de publicación.

3. Los trabajos se remitirán cumplimentando la plantilla de la *Revista Nereis* en formato doc, docx o en formato odt.

<http://revistas.ucv.es/index.php/Nereis/about/submissions#authorGuidelines>

Se adjuntarán además, en documentos separados, tablas y figuras en formato tif, jpg o png. No se aceptarán imágenes, figuras y tablas de baja calidad (inferiores a 300 puntos por pulgada).

4. Los originales se presentarán en A4 con márgenes de 3 cm y justificación completa, en letra Times o Times New Roman de 12 puntos.

5. En la primera página se hará constar el título del artículo en castellano y en inglés con el nombre, la afiliación del autor o autores (seis autores como máximo) y la correspondencia postal y electrónica del autor principal. El cuerpo del texto deberá ir precedido necesariamente de dos resúmenes en castellano y en inglés, y no exce-

1. Work submitted should be original (scientific articles and bibliographic reviews) may not be submitted simultaneously to another publication. Owing to their national and international scope, articles may be written in Spanish or preferably in English. EPHORUS plagiarism detection software is applied.

2. Authors must register <http://revistas.ucv.es/index.php/Nereis> to send their work and follow the entire publication process.

3. Work must be submitted by completing the Nereis Journal template in doc, docx or odt format.

<http://revistas.ucv.es/index.php/Nereis/about/submissions#authorGuidelines>

Any tables or figures should be attached as separate documents in tif, jpg or png format. Poor quality images of figures or tables below 300 dpi (dots per inch) will not be accepted.

4. Original work should be submitted in A4 format with 3 cm margins and full justification, in Times or Times New Roman 12-point font.

5. The first page should show the title of the article in Spanish and in English, together with the name and affiliation of the author/s (maximum six authors) and the lead author's postal and e-mail addresses. The body of the text must be preceded by two abstracts in Spanish and in English and should not exceed 20 pages including figures, tables, notes, bibliography, summaries and key words.



derá las 20 páginas incluyendo figuras, tablas, notas, bibliografía, resúmenes y palabras clave.

6. Las palabras clave deben ser en minúsculas y no superar las seis palabras en el idioma original del artículo y en inglés.

7. La cursiva se utilizará para resaltar expresiones, palabras de otros o palabras en un idioma diferente.

8. Las referencias dentro del texto, citación de autores y bibliografía final seguirán la normativa Vancouver, tal como aparecen en la plantilla.

9. Las imágenes utilizadas deben indicar en todos los casos su procedencia en el pie de foto con todos los datos precisos para su identificación (autor, obra, año, URL, etc.) según sea el caso.

10. La revista se publica en marzo de cada año. Los trabajos serán valorados por dos revisores anónimos, ajenos al consejo de redacción según el sistema de revisión por pares (doble ciego). Se enviará la aceptación o rechazo motivado a los autores antes de 90 días naturales. La revista se reserva el derecho de cambiar, parcialmente, el estilo o el formato de los trabajos presentados.

11. Cada autor se compromete a seguir las sugerencias de los revisores para modificar los trabajos aceptados. Después de la publicación, recibirá un ejemplar de la revista y un archivo pdf con el formato definitivo.

12. La declaración de autoría y cesión de derechos se dará por aceptada por el autor, o por los autores, en el momento en que se acepta la casilla a tal efecto. <http://revistas.ucv.es/index.php/Nereis/about/submissions#authorGuidelines>

6. Key words must be in lower case and should include no more than six words in the original language of the article and in English.

7. Italics must be used to highlight expressions, the words of others and words in a different language.

8. References in the body of the text, citations and end bibliography should follow the Vancouver system, as shown in the template.

9. The source of any images used should be indicated in all cases in the caption, with full and accurate details for their identification (author, work, year, URL, etc.) as applicable.

10. The journal is published in March each year. Work will be reviewed by two anonymous referees who do not belong to the editing board, following the double blind peer review system. Authors will be informed within 90 calendar days whether their work has been accepted or not (with the reasons for rejection). The journal reserves the right to partially change the style or format of work submitted.

11. Authors undertake to follow the suggestions made by reviewers for changes to work accepted for publication. Following publication, authors will receive a copy of the journal and a pdf file with their work in its final format.

12. The statement of authorship and granting of rights is deemed to be accepted by the author/s when they tick the acceptance box. <http://revistas.ucv.es/index.php/Nereis/about/submissions#authorGuidelines>





Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir

PETICIÓN DE INTERCAMBIO /
EXCHANGE REQUEST

Institución
Institution

Dirección Postal
Address

País
Country

Teléfono
Telephone

Correo electrónico.....
E-mail

Estamos interesados en recibir su revista
We are interested in receiving your Journal

- ☐ Revista Anuario de Derecho Canónico / Facultad de Derecho Canónico
- ☐ Revista Edetania
- ☐ Revista Fides et Ratio
- ☐ Revista Liburna
- ☐ Revista Nereis
- ☐ Revista Scio
- ☐ Revista Therapie

Para mayor información visitar la página web <https://www.ucv.es>
For more information visit the website

Números que desea recibir.....
Issues you want to receive

Indique el nombre de la(s) revista(s) de su institución por la que quiere iniciar el intercambio
Indicate the name of your institution's journal(s) for which you want to start an exchange

Dirección de Intercambio
Exchange Address

**Servicio de Intercambio.
Biblioteca de Santa Úrsula
Calle Guillem de Castro, 94
E-46001 Valencia (España)
+ 34 96 363 74 12
intercambio.pub@ucv.es**

