



REPORTES CIENTÍFICOS

D E L A F A C E N

ISSN 2078-399X (impreso)

ISSN 2222-145X (online)

Volumen 15

Número 1

2024

Detección y cuantificación de la norfloxacin en carne de pollos comercializadas en supermercados del Gran Asunción.

Cadenas de markov ocultas discretas y los experimentos mendelianos.

Perfil fitoquímico y actividad biológica in vitro del extracto crudo etanólico y fracciones de las raíces de *Eryngium horridum* Malme, del departamento de Cordillera, Paraguay.

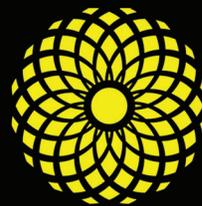
Cálculo de órbitas periódicas mediante la Teoría del Promedio.

Ensayo de inhibición en medio líquido con placa multipocillo de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay contra *Listeria monocytogenes*.

Efectividad del Agua Destilada-Esterilizada Tres veces (ADTE) como alternativa de conservación del hongos fitopatógenos.

Influencia del turismo para el desarrollo local en Carmelo Peralta.

Gestión de una fuente radiactiva de Sr90 en desuso en la Comisión Nacional de Energía Atómica. Aspectos técnicos de seguridad radiológica.



FACEN

Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales

PUBLICACIÓN CIENTÍFICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN-PARAGUAY

REPORTES CIENTÍFICO DE LA FACEN



Reportes Científicos de la FACEN, es una revista de acceso libre y gratuito y es la publicación científica oficial de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción. Es emitida semestralmente y publica artículos originales, artículos de revisión, tópicos actuales, reportes de casos, comunicaciones cortas y cartas al editor, en las áreas de Biología, Química, Física, Matemática Pura, Matemática Estadística, Geología, Biotecnología y Tecnología de Producción. Los trabajos y opiniones publicados en la revista son de exclusiva responsabilidad de los autores.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Prof. Dra. Zully Vera de Molinas
Rectora

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Prof. Constantino Nicolás Guefos Kapsalis, MAE
Decano

Dirección Web

www.facen.una.py

REPORTES CIENTÍFICOS DE LA FACEN

Dirección postal

Reportes Científicos de la FACEN, Dirección de
Investigación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Campus Universitario, Casilla de Correo 1039, San Lorenzo,
Paraguay

Teléfono/Fax

595 21 585600 interno 237

E-mail

reportescientificos@gmail.com

Dirección web

<https://www.facen.una.py/es/reportes-cientificos/>

Editor en Jefe

Prof. Dr. Fernando José Méndez Gaona, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Comité Editorial Nacional

Dr. Bolívar Rafael Garcete Barrett
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Lic. Nery López
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Dra. Celeste Vega
Centro para el Desarrollo de Investigación Científica

Dra. Miriam Rolon
Centro para el Desarrollo de Investigación Científica

Dra. Antonieta Rojas de Arias
Organización Panamericana de la Salud - Paraguay

Comité Editorial Internacional

Dr. Robert Owen
Texas Tech University - Estados Unidos

Dra. Ana Honfi
Universidad Nacional de Misiones - Argentina

Dr. Julio Daviña
Universidad Nacional de Misiones - Argentina

Dr. Nicolás Niveiro
Universidad Nacional del Nordeste - Argentina

Dra. María Paula Badenes
Universidad Nacional de La Plata - Argentina

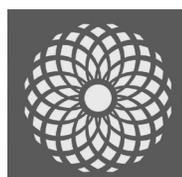
Dr. José Seguinot
Universidad de Puerto Rico - Puerto Rico

Dr. Ángel Vara Vela
Universidad de São Paulo - Brasil

Dr. Fábio Luis Teixeira Gonçalves
Universidad de São Paulo - Brasil

Dr. Víctor Velázquez
Universidad de São Paulo - Brasil

Dr. Sebastián Simondi
Universidad Nacional de Cuyo - Argentina



FACEN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Rep. cient. FACEN	San Lorenzo (Paraguay)	Vol. 15, Nº 1	Enero - Junio de 2024	ISSN 2078-399X (versión impresa) ISSN 2222-145X (versión online)
-------------------	------------------------	------------------	--------------------------	---

REPORTES CIENTÍFICOS

DE LA FACEN

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Rep. cient. FACEN	San Lorenzo (Paraguay)	Vol. 15, Nº 1	Enero - Junio de 2024	ISSN 2078-399X (versión impresa) ISSN 2222-145X (versión online)
-------------------	------------------------	------------------	--------------------------	---

- 3–14 **Julio César Benítez-Villalba, Raúl Alejandro Silva Peña, Oscar Daniel Cristaldo-López, Arturo Iván Bogado-Fernández & Liliana Antonia Arrúa-Martínez.** Detección y cuantificación de la norfloxacin en carne de pollos comercializadas en supermercados del Gran Asunción. *[Artículo original]*.
- 15–32 **César Daniel Amarilla.** Cadenas de markov ocultas discretas y los experimentos mendelianos. *[Artículo original]*.
- 33–43 **Elsa Beatriz Cárdenas, Cristina Mayumi Sasaki & Francisco Paulo Ferreira.** Perfil fitoquímico y actividad biológica in vitro del extracto crudo etanólico y fracciones de las raíces de *Eryngium horridum* Malme, del departamento de Cordillera, Paraguay. *[Artículo original]*.
- 44–49 **María del Carmen Rolón Machuca.** Cálculo de órbitas periódicas mediante la Teoría del Promedio. *[Artículo original]*.
- 50–56 **Matías Policani, Camila Ayala, Sandra Álvarez, Yadira Parra, Gabriela Ulke, Danilo Fernández & Tomás López.** Ensayo de inhibición en medio líquido con placa multipocillo de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay contra *Listeria monocytogenes*. *[Artículo original]*.
- 57–65 **Axel Aníbal Marsal von Glasenapp, Vicente Gabriel Gaona Duarte, Paola Ester Fretes Moreno, Andrea Alejandra Arrúa Widmer, Juliana Moura Mendes Arrúa, & Cinthia Carolina Casal-Martínez.** Efectividad del Agua Destilada-Esterilizada Tres veces (ADTE) como alternativa de conservación del hongos fitopatógenos. *[Artículo original]*.
- 66–76 **Mario Gustavo Leiva Enrique, Eliane Elizabeth Alderete Garcete & Mónica C. Balbuena Portillo.** Influencia del turismo para el desarrollo local en Carmelo Peralta. *[Artículo de revisión]*.
- 77–82 **Richard Florentin Cano, Fredy Doncel Invernizz & Francisco Navarro.** Gestión de una fuente radiactiva de Sr90 en desuso en la Comisión Nacional de Energía Atómica. Aspectos técnicos de seguridad radiológica. *[Reporte de caso]*.



Detección y cuantificación de la norfloxacina en carne de pollos comercializadas en supermercados del Gran Asunción

Detection and quantification of norfloxacin in chicken meat marketed in supermarkets of Grand Asuncion

Julio César Benítez-Villalba^{1,*}, Raúl Alejandro Silva Peña¹, Oscar Daniel Cristaldo-López¹, Arturo Iván Bogado-Fernández¹ & Liliana Antonia Arrúa-Martínez¹.

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: juliobenitez@facen.una.py.

Resumen: Este artículo científico se centra en investigar la presencia de la Norfloxacina, un antibiótico de amplio espectro, en productos de carne de pollo comercializados en la Gran Asunción. El uso de este antibiótico en medicina humana y veterinaria puede llegar a la cadena alimentaria, lo que representa un riesgo para la salud pública. Por lo tanto, es importante determinar y cuantificar los niveles de este compuesto en los alimentos. Para llevar a cabo el estudio, se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La técnica de extracción sólido-líquido para aislar la Norfloxacina de las muestras. Se demostró que el método utilizado es altamente sensible, con un límite de detección (LD) de 0,9526 µg/mL y un límite de cuantificación (LC) de 2,8867 µg/mL. Esto significa que el método puede detectar y cuantificar Norfloxacina en concentraciones extremadamente bajas en las muestras de carne de pollo. Además, se estableció la linealidad del método con un coeficiente de correlación (R^2) del 99,4%. Los resultados revelaron concentraciones de Norfloxacina en la carne de pollo que oscilaron entre 888,0512 y 7809,442 µg/Kg. Estos hallazgos son relevantes para la comunidad científica y pueden contribuir a la generación de políticas y medidas para garantizar la seguridad alimentaria en relación con el uso de antibióticos en la cría de aves de corral.

Palabras clave: *Norfloxacina, Pollos, Cromatografía de líquido de alta resolución HPLC.*

Abstract: This scientific article focuses on investigating the presence of Norfloxacin, a broad-spectrum antibiotic, in chicken meat products marketed in Gran Asunción. The use of this antibiotic in human and veterinary medicine can reach the food chain, posing a risk to public health. Therefore, it is important to determine and quantify the levels of this compound in food. To carry out the study, high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed as the technique. The solid-liquid extraction technique was used to isolate Norfloxacin from the samples. It was demonstrated that the method used is highly sensitive, with a limit of detection (LOD) of 0.9526 µg/mL and a limit of quantification (LOQ) of 2.8867 µg/mL. This means that the method can detect and quantify Norfloxacin at extremely low concentrations in chicken meat samples. Additionally, the linearity of the method was established with a correlation coefficient (R^2) of 99.4%. The results revealed concentrations of Norfloxacin in chicken meat ranging from 888.0512 to 7809.442 µg/Kg. These findings are relevant to the scientific community and can contribute to the generation of policies and measures to ensure food safety regarding the use of antibiotics in poultry farming.

Keywords: *Norfloxacin, Chickens, High-performance liquid chromatography (HPLC).*

Introducción

La resistencia bacteriana representa una preocupación significativa para nuestra salud. Su origen se atribuye tanto a nuestro uso de antimicrobianos en medicina humana como en medicina veterinaria y agricultura (Martínez, 2008; O'Neill *et al.*, 2016). En particular, el uso indiscriminado de antibióticos en la cría intensiva de aves ha llevado al aumento de

bacterias resistentes, lo que plantea un riesgo para nosotros como consumidores a través de alimentos contaminados y el contacto directo (Van Boeckel *et al.*, 2015; Marshall & Levy, 2011). Estas bacterias resistentes pueden limitar nuestras opciones de tratamiento para enfermedades, ya que presentan resistencia a una amplia gama de antibióticos (Ventola, 2015).

Editor responsable: Nery López Acosta*

Recibido: 10/07/2023

Aceptado: 20/02/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

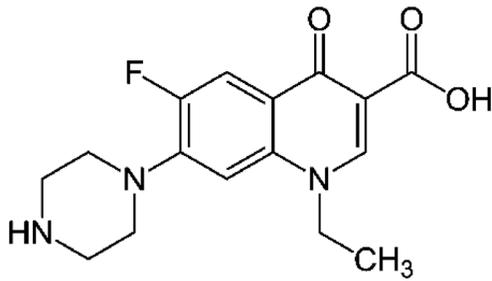


Figura 1. Estructura química de la Norfloxacin.

La industria farmacéutica ofrece una variedad de medicamentos para tratar enfermedades infecciosas en animales destinados a nuestro consumo (Heuer *et al.*, 2009; Hermans *et al.*, 2011). El uso de antibióticos, ya sea en combinación o de manera individual, desempeña un papel en la selección y propagación de resistencia en las poblaciones bacterianas presentes en estos animales (Zhang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2019). Entre los numerosos antibióticos utilizados, la Norfloxacin (Fig. 1), perteneciente a la clase de las fluoroquinolonas, es ampliamente empleada en los seres humanos para tratar infecciones bacterianas en el tracto urinario, así como infecciones gastrointestinales y de las vías respiratorias. Es un polvo cristalino de color blanco a amarillo claro con un peso molecular de 319,331 g/mol, soluble en agua y ligeramente soluble en solventes orgánicos como etanol y cloroformo. Se mantiene estable en condiciones de almacenamiento, pero debe protegerse de la luz debido a su fotosensibilidad y de la humedad para mantener su efectividad.

En este contexto, nuestro estudio se enfoca en investigar el contenido de Norfloxacin en la carne de pollo comercializada en los supermercados de la Gran Asunción. Se ha utilizado las técnicas de cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) y extracción sólido-líquido para extraer el analito de la matriz. Al abordar este tema, esperamos contribuir al conocimiento sobre la presencia de Norfloxacin en este alimento que consumimos y evaluar posibles implicaciones para nuestra salud pública.

Mediante el análisis de la Norfloxacin en muestras de carne de pollo, obtenemos informa-

ción relevante sobre el uso de antibióticos en la producción avícola en nuestro país y su potencial impacto en la resistencia bacteriana. Estos resultados proporcionan fundamentos científicos para adoptar medidas reguladoras y políticas que garanticen nuestra seguridad alimentaria y la eficacia de los tratamientos médicos en el contexto de nuestra salud (Varela *et al.*, 2019).

Nuestro estudio tiene como objetivo investigar la presencia de este antibiótico en las carnes de pollo comercializadas en los supermercados de la Gran Asunción. Mediante el uso de técnicas analíticas avanzadas, ofrecemos información valiosa que contribuya a la comprensión de esta problemática y permita tomar decisiones informadas por parte de las autoridades de salud pública. De esta manera, se podrá mitigar los riesgos asociados a la resistencia bacteriana en la cadena alimentaria y en nuestra salud.

Materiales y métodos

Productos químicos y reactivos

Para nuestro estudio de investigación, hemos utilizados reactivos de grado analítico. El patrón de Norfloxacin fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se ha preparado una solución madre del analito una sola vez, a una concentración de 1000 µg/mL, y fue almacenado a 4 °C en frascos de vidrio oscuro. Utilizamos acetonitrilo de grado cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemania) y ácido fosfórico para la preparación de la fase móvil. El agua destilada se obtuvo en un equipo (QUIMIS, Brasil) y posteriormente purificada en un equipo Barnstead™ MicroPure™.

Instrumentación y Software

Para la extracción de la Norfloxacin de la matriz estudiada, se empleó la técnica de extracción sólido-líquido utilizando una variedad de materiales de vidriería como vasos de precipitados, embudos y varilla de vidrio, entre otros. Además, se utilizaron equipos especializados como un vortex marca LW Scientific, un baño de ultrasonido de la marca Sonorex Suoer RK 106 S y una centrífuga de mesa de la marca Presvac DCS-16 RV. Para la detección

y cuantificación del analito, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC-FDL. La detección se realizó a una longitud de onda de 275 nm, y la separación cromatográfica se logró mediante el uso de una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm).

El instrumento utilizado fue controlado mediante el software LCsolution.exe (versión 1.0) así como la detección e integración de los picos. El peso de los estándares, reactivos y muestras se realizó utilizando una balanza analítica Radwag (modelo 310.R2) fabricada en Polonia (UE). Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el software Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics, Rockville, MD, EE. UU., 2000). Además, para la elaboración y organización de los resultados, se utilizaron los paquetes de Microsoft® Office: Word®, Excel® y PowerPoint® 2010. El uso de estos materiales y equipos garantizó la precisión y reproducibilidad en la extracción, detección y cuantificación de la Norfloxacin en la matriz de estudio, lo cual es crucial para obtener resultados confiables y significativos en este contexto científico.

Optimización de las condiciones cromatográficas HPLC

Inicialmente, se procedió a la optimización de las condiciones cromatográficas del sistema HPLC. Para lograr esto, se utilizó una solución acuosa que contenía Norfloxacin a una concentración de 75 µg/mL como muestra de estudio. Dado que el analito presenta características específicas, se decidió emplear la cromatografía en fase reversa, en la cual la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. En base en las propiedades fisicoquímicas de la Norfloxacin, se seleccionó una columna con relleno de tipo C18 Zorbax Eclipse XDB de dimensiones 250 mm x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm.

Se realizaron investigaciones exhaustivas sobre las principales variables que afectan la separación cromatográfica y la intensidad de la señal. Se evaluaron diversas combinaciones de fases móviles en función de la naturaleza del analito, tales como diferentes proporciones de Acetonitrilo y Agua,

como (30:70), (20:80) y (15:85). Además, se agregó 1 mL de H₃PO₄ al agua antes de la mezcla con el acetonitrilo para mejorar las características de la fase móvil. Adicionalmente, se estudió el impacto del caudal, la temperatura de la columna y los volúmenes de inyección en el proceso de separación cromatográfica. Se probaron velocidades de flujo en el rango de 0,5 a 1,5 mL/min, temperaturas de columna que variaron entre 30 °C y 50 °C, y volúmenes de inyección que oscilaron entre 5 y 30 µL. Mediante esta exhaustiva exploración de las condiciones cromatográficas, se logró optimizar el método para la determinación precisa de Norfloxacin. Estas etapas de optimización son cruciales para obtener resultados confiables y reproducibles en el análisis cromatográfico de este compuesto en las muestras analizadas.

Toma de muestras

La técnica de muestreo utilizada fue el no probabilística y del tipo conveniencia. Las muestras de pollos fueron obtenidas de supermercados ubicados en el área metropolitana de Asunción. Se seleccionaron tres marcas comerciales diferentes, así como dos muestras de origen casero: una adquirida en el mercado 4 de Asunción y otra criada en el interior del país. Durante la selección de las muestras, se tuvieron en cuenta diversos factores, como la disponibilidad de los productos en los establecimientos y la representatividad de las marcas en el mercado local. Se verificó que las muestras de pollo estuvieran en buen estado visual, sin signos evidentes de deterioro o contaminación. Una vez recolectadas las muestras, estas fueron trasladadas al laboratorio de manera inmediata y se les asignó un código único para su identificación. Posteriormente, se almacenaron en refrigeración a una temperatura constante de -20°C, con el fin de mantener su integridad y prevenir la proliferación microbiana hasta el momento de su análisis. Es importante destacar que se siguieron estrictas medidas de higiene y bioseguridad durante todo el proceso de muestreo, manipulación y almacenamiento de las muestras, a fin de evitar cualquier tipo de contaminación cruzada y asegurar la validez de los resultados obtenidos.

Preparación de las muestras patrones

Se preparó una disolución patrón de Norfloxacin mediante la disolución de 100 mg de la sustancia en un matraz de 100 mL utilizando una fase móvil compuesta por ACN (acetonitrilo), agua y 1 mL de H_3PO_4 en una proporción de 15:85. La disolución se llevó a cabo en condiciones cuidadosamente controladas de temperatura y agitación para garantizar la homogeneidad de la mezcla. Como resultado, se obtuvo una concentración final de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A partir de la mencionada disolución patrón, se prepararon seis niveles adicionales de concentración para construir una curva de calibrado precisa y confiable.

Las concentraciones seleccionadas fueron de 5, 15, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Para cada nivel de concentración, se tomaron volúmenes adecuados de la disolución patrón y se diluyeron cuidadosamente con la correspondiente fase móvil para obtener las concentraciones deseadas. Cabe destacar que se siguieron estrictos procedimientos de manipulación y mezcla para asegurar la precisión y la reproducibilidad en la preparación de las soluciones de concentración conocida. Además, se realizaron duplicados de cada dilución para evaluar la consistencia del método. La preparación de estas soluciones de concentración conocida es de vital importancia para la construcción de una curva de calibrado confiable, que posteriormente será utilizada para la cuantificación precisa de la Norfloxacin en las muestras analizadas.

Tratamiento de las muestras

Se pesaron 5 gramos de muestra de las diferentes marcas de pollos, incluyendo los pollos caseros obtenidos del Mercado 4 y del interior del país. Las muestras se colocaron en vasos de precipitado y se les añadió una disolución de 5 mL de la fase móvil utilizada en el método cromatográfico, compuesta por ACN (acetonitrilo), agua y 1 mL de H_3PO_4 en una proporción de (15:85). A continuación, se llevó a cabo la extracción de las muestras en un baño de ultrasonido durante 30 minutos, con el objetivo de obtener los componentes deseados. Una vez finalizada la extracción, los extractos se centrifugaron durante 15 minutos a una velocidad de 3220 g. El

sobrenadante resultante se filtró utilizando filtros minisart de 0,45 μm y se transfirió a viales de vidrio de HPLC para su posterior análisis cromatográfico. Este procedimiento permitió obtener los extractos de las muestras listos para ser sometidos a la lectura cromatográfica, con el fin de cuantificar y analizar la presencia de Norfloxacin en las muestras de pollo.

Validación del método analítico

En este trabajo de investigación, se realizó la validación del método analítico propuesto siguiendo las directrices establecidas en la "Guía de validación para métodos bioanalíticos" proporcionada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Se evaluaron diversos parámetros de validación utilizando la curva de calibración, incluyendo la linealidad (Analytical Methods Committee, 1994), los límites de detección y cuantificación, el rango dinámico lineal, la sensibilidad analítica y la exactitud del método expresada en términos de precisión y veracidad (USP 29, 2005).

Los requisitos para la validación del método analítico se establecieron de la siguiente manera: **a) Linealidad:** se definió que el coeficiente de determinación (R^2) debía ser igual o superior a 0,999, y la desviación residual máxima debía ser inferior al 25%. **b) Precisión:** se determinó la precisión como la desviación estándar relativa DER (precisión entre días), la cual debía ser $\leq 30\%$. **c) Veracidad:** se estableció que la veracidad, expresada como recuperación media, debía estar en el rango del 70% al 120%. **d) Límite de cuantificación (LC):** se estableció que el LC debía cumplir con los requisitos de precisión y veracidad mencionados anteriormente. Estos requisitos se alinean con la Decisión 2002/657/CE de la Comisión de la Comunidad Europea (Benítez-Villalba *et al.*, 2013).

Para evaluar la calidad y confiabilidad del método analítico, se determinaron los parámetros fundamentales que garantizan la precisión y exactitud en la determinación del analito en la matriz estudiada. Estos parámetros son: linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), rango dinámico lineal (RDL), sensibilidad analítica,

exactitud y precisión del analito

La calidad, fiabilidad y consistencia de un método analítico validado se evalúan mediante diferentes parámetros, como la sensibilidad, linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud y precisión del analito en estudio (González *et al.*, 1996). Para lograrlo, se prepararon 6 disoluciones estándar a partir de una solución madre con una concentración de 1000 µg/mL, obteniendo así disoluciones con concentraciones de 5, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL, utilizando la fase móvil como disolvente, y se detalló su preparación en el apartado de Preparación de las muestras patrones.

Cada uno de estos parámetros de validación se define de la siguiente manera: **la linealidad** se refiere a la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito o analitos en una muestra dentro de un rango específico; **el límite de detección (LD)** corresponde a la cantidad más baja del analito en una muestra que puede ser detectada mediante una única medición, con un nivel de confianza determinado, aunque no necesariamente cuantificada con un valor exacto; **el límite de cuantificación (LC)** es la cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una precisión aceptable; **el Rango Dinámico Lineal (RDL)** se define como el intervalo de concentraciones que abarca desde el límite de cuantificación del método hasta el límite superior del rango de concentraciones al que se ha aplicado el método analítico (IUPAC, 1978); **la sensibilidad analítica** de un método mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito y se expresa mediante la pendiente de la curva de calibración (González *et al.*, 1996); **la exactitud** se refiere a la proximidad del acuerdo entre el valor aceptado como verdadero o de referencia y el valor obtenido; **y la precisión** se refiere a la proximidad del acuerdo entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de una muestra homogénea bajo las condiciones establecidas.

Los parámetros de validación se determinaron

de la siguiente manera:

Linealidad: se realizó un análisis utilizando seis concentraciones estándar en el rango de 5-100 µg/mL. Se construyó una curva de calibración trazando la señal generada por el analito en función de su concentración. La regresión lineal se calculó utilizando el método de los mínimos cuadrados. Se obtuvieron el coeficiente de correlación y el intercepto para la Norfloxacin.

Límite de detección (LD): se determinó mediante la fórmula $LD = 3,3 \times S_o$, donde "So" representa la desviación estándar de la regresión, "n" es el número de puntos de calibración, y "b" es la pendiente de la curva.

Límite de cuantificación (LC): se calculó utilizando la fórmula $LC = 10 \times S_o$, donde "So" se determina como $S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}}$ ($S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, b = pendiente, n = puntos de calibración (Benítez-Villalba *et al.*, 2018).

Rango Dinámico Lineal (RDL): se estableció como el intervalo de concentraciones que abarca desde el límite de cuantificación del método hasta el límite superior del rango de concentraciones en el cual se aplicó el método.

Sensibilidad analítica ($S_{Analítica}$): se evaluó la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, expresada mediante la pendiente de la recta de calibración (González *et al.*, 1996).

Exactitud del Método, Precisión y Veracidad: Para evaluar la exactitud del método en términos de veracidad, se realizó un estudio de recuperación utilizando tres niveles de concentración (15, 50, 75 µg/mL). Las muestras se analizaron siguiendo el procedimiento descrito en el artículo, y la concentración del analito se determinó mediante interpolación en la curva de calibración dentro del rango dinámico lineal.

La recuperación se calculó utilizando la fórmula: $\text{recuperación (\%)} = S1 / (S2 + S3) \times 100$, donde S1 es la cantidad encontrada (µg/mL) en la muestra enriquecida, S2 es la cantidad presente originalmente en la muestra no enriquecida, y S3 es la cantidad (µg/mL) de analito agregado a la muestra.

Para evaluar **la exactitud del método en térmi-**

nos de precisión, se investigó la repetibilidad (precisión "intra-día") y la reproducibilidad (precisión "inter-día"). Se realizaron múltiples réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de veracidad, tanto en un mismo día como durante tres días consecutivos. Cada muestra dopada o enriquecida se extrajo y analizó por triplicado en el mismo día para evaluar la variabilidad "intra-día".

Resultados y discusión

Condiciones cromatográficas HPLC

Se realizaron optimizaciones de las condiciones cromatográficas utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC. La fase móvil seleccionada fue una proporción de (15:85) Acetonitrilo:agua que mostró resultados prometedores. Se añadió 1 mL de H_3PO_4 al agua antes de su mezcla con el acetonitrilo, lo cual mejoró notablemente las características de la fase móvil y resultó en una señal analítica de alta calidad. La velocidad de flujo óptima se determinó en 2 mL/min, lo cual tuvo un impacto significativo en la resolución y la forma del pico cromatográfico, así como en la intensidad de respuesta y el tiempo de retención. Se encontró que una temperatura de columna de 40 °C proporcionó una excelente forma del pico. En cuanto al volumen de inyección, se determinó que el valor óptimo era de 10 μ L. La detección se llevó

Tabla 1. Valores óptimos de las condiciones cromatográficas

Fase estacionaria	Zorbax (C18) 250 mm x 4.5 mm x 5 μ m
Fase móvil	ACN (acetonitrilo), agua y 1 mL de H_3PO_4 en una proporción de (15:85)
Modalidad	Isocrática
Flujo	2 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Temperatura de la columna	40 °C
Detección	275 nm

a cabo a una longitud de onda de 275 nm.

Los resultados obtenidos de estas condiciones óptimas se resumen en la Tabla 1, la cual muestra los valores relevantes. Además, se adjunta en la Fig. 2 el cromatograma obtenido a partir de estas condiciones óptimas, ilustrando de manera visual los resultados obtenidos. Estas optimizaciones permitieron obtener resultados satisfactorios en el análisis cromatográfico, asegurando una separación adecuada de los componentes de interés y una detección precisa. Los valores óptimos obtenidos

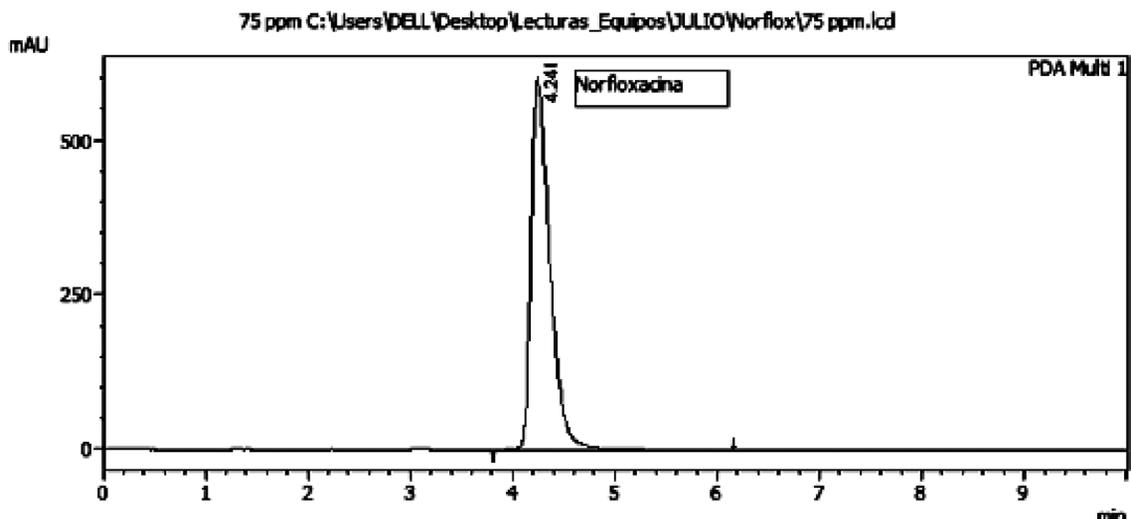


Figura 2. Cromatograma de la Norfloxacin con las condiciones óptimas estándar 75 mg/mL.

en este estudio proporcionan una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en el ámbito científico y analítico.

Validación del método analítico

En este estudio, se llevaron a cabo la validación y cuantificación de Norfloxacin en muestras de carne de pollo obtenidas de supermercados ubicados en la Gran Asunción. La extracción del analito se realizó utilizando la técnica de extracción sólido-líquido mediante el uso de un baño de ultrasonido. Posteriormente, se procedió a validar el método analítico y a detectar y cuantificar la presencia de Norfloxacin utilizando la técnica de cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC). En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de calibración de la técnica analítica utilizada en este estudio. Estos parámetros incluyen el coeficiente de correlación (% R²), que indica la calidad de ajuste de la curva de calibración, el número de puntos de calibración (n), la pendiente de la curva de calibración (b) y su desviación estándar (Sb), el intercepto de la curva de calibración (a) y su desviación estándar (Sa), la desviación estándar de la regresión (Sy/x), el valor P de prueba de falta de ajuste (% ptof), el límite de detección (LD), el límite de cuantificación (LC)

Tabla 2. Parámetros de calibración en la técnicas analítica cromatográfico HPLC.

Linealidad	
Ecuación de la recta	Y=110363*X + 545230
(%) R ²	99,4
n	15
b(µg/mL)	110363
Sb	4274,02
A	545230
Sa	239091
Sy/x	1705,55
%ptof	0,5722
LD(µg/mL)	0,9526
LC(µg/mL)	2,8867
Sensibilidad	0,0421
RDL(µg/mL)	2,88-100

y el rango dinámico lineal (RDL). La validación del método analítico se realizó siguiendo las recomendaciones propuestas por (Benítez Villalba *et al.*, 2013; Mandel *et al.*, 1954). Estos parámetros de calibración son fundamentales para asegurar la precisión y la exactitud del método analítico utilizado en la determinación de Norfloxacin en las muestras de carne de pollo.

Linealidad: En esta validación del método analítico, se evaluaron dos aspectos fundamentales, el **Límite de Detección (LD)** y el **Límite de Cuantificación (LC)**. Los resultados obtenidos fueron 0,9526 µg/mL y 2,8867 µg/mL respectivamente. Estos valores demuestran que el método propuesto es altamente sensible y puede utilizarse para la detección y cuantificación precisa del analito en esta matriz específica. Además, se determinó el **Rango Dinámico Lineal (RDL)** del analito en la curva de calibración, el cual abarcó desde 2,88 µg/mL hasta 100 µg/mL. Esto indica que el método tiene una amplia capacidad para medir concentraciones en este rango, asegurando una adecuada cobertura analítica.

El **Coefficiente de Correlación (% R²)** obtenido para la curva de calibración fue de 99,4, lo que demuestra una excelente linealidad dentro de los intervalos estudiados. Asimismo, se evaluó la **sensibilidad del método analítico**, medida mediante la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en el rango lineal. La **pendiente de la recta** de calibración fue de 0,0421 µg/mL, lo que indica una alta sensibilidad del método para la detección y cuantificación precisa de la Nor-

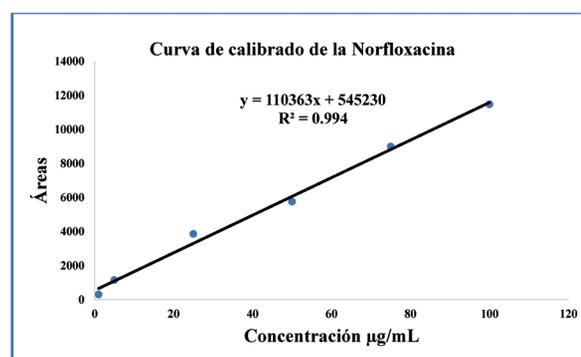


Figura 3. Curva de calibrado de la Norfloxacin por HPLC

Tabla 3. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de veracidad del método utilizando la técnica de extracción sólido-líquido.

Ensayo Intra - día						
Analito	Dopado $\mu\text{g/mL}$	Observado $\mu\text{g/mL}$	DE	Recuperación %	DER %	n
Norfloxacin	25	24,22	0,0704	96,88	0,2471	3
	50	49,31	0,0458	98,62	0,1574	3
	75	74,15	0,0175	98,73	0,0457	3

floxacin. La Fig. 3 muestra el gráfico de la curva de calibración de la Norfloxacin, visualizando de manera clara la relación entre las concentraciones de la sustancia y las respuestas instrumentales.

Exactitud del Método Analítico: En el presente estudio, se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de la exactitud del método analítico mediante el análisis de recuperación utilizando la técnica de extracción sólido-líquido utilizando un baño de ultrasonido. Se realizaron fortificaciones de muestras de pollo casero, previamente verificadas como libres de Norfloxacin, mediante la adición de una disolución patrón en tres niveles de concentración diferentes: 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$ (por triplicado). Todos los cálculos y análisis se realizaron siguiendo rigurosamente la metodología descrita en la sección de validación del método analítico. En las Tablas 3 y 4 se presentan los resultados detallados de los ensayos de recuperación, los cuales permiten evaluar la exactitud en términos de veracidad del método empleando la técnica de extracción sólido-líquido.

Los resultados obtenidos revelaron una exce-

lente precisión y exactitud del método propuesto utilizando la técnica de extracción sólido-líquido. La recuperación de Norfloxacin en esta matriz se situó en un rango comprendido entre el 96,88% y el 98,98%, tanto en los ensayos intra-día como en los ensayos inter-día. Estos valores indican que el procedimiento de extracción empleado es altamente eficiente y que el método analítico es altamente veraz y confiable. Además, la desviación estándar relativa (DER) obtenida en esta técnica analítica fue menor al 2%, lo cual cumple con los límites aceptables establecidos en la guía de validación utilizada. Según las recomendaciones de Cuadros Rodríguez et al. (1993), se considera aceptable cualquier valor de DER igual o inferior al 15% en general y al 20% en la zona próxima al límite de detección del método. En consecuencia, se puede concluir que el método propuesto, basado en la técnica de extracción sólido-líquido, cumple con los requisitos de precisión establecidos y se caracteriza por su alta veracidad, precisión y exactitud en la determinación y cuantificación de Norfloxacin en muestras de carne de pollo.

Tabla 4. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de precisión del método utilizando la técnica de extracción sólido-líquido.

Ensayo Inter - día						
Analito	Dopado $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Observado $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	DE	Recuperación %	DER %	n
Norfloxacin	25	24,55	1,279	98,21	2,037	3
	50	49,49	1,811	98,98	1,344	3
	75	73,82	1,093	98,43	1,192	3

Tabla 5. Concentración de Norfloxacin en muestras de pollo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$). **ND:** no detectado (valor inferior al **LD**).

Marcas	Concentración $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Casero del Interior del país	ND
Casero del Mercado 4	1962,426
Marca 1	2555,728
Marca 2	888,0512
Marca 3	7809,442

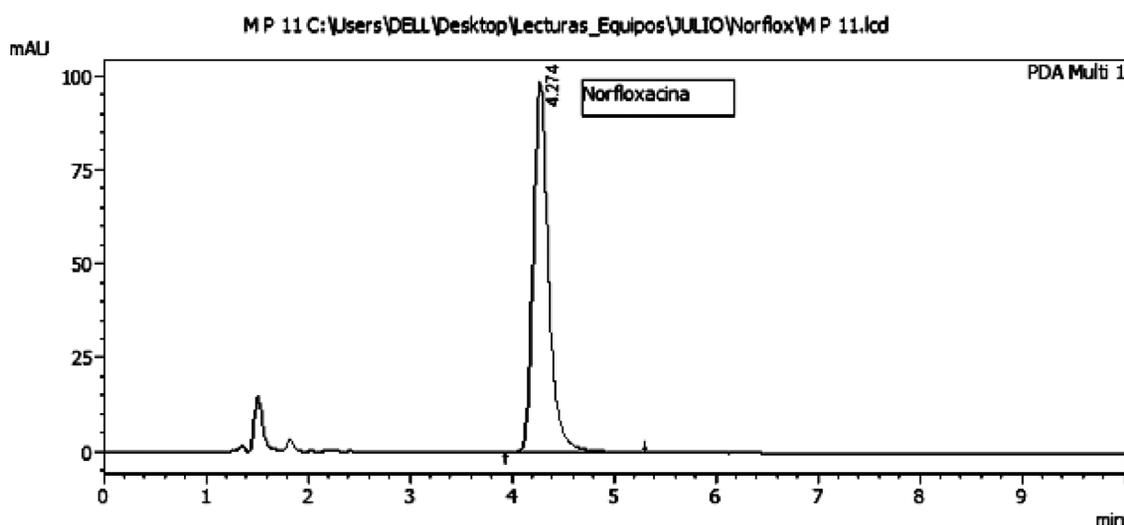
Aplicación del método analítico

Una vez completado el desarrollo y la validación del método analítico, se procedió a la aplicación del mismo para determinar y cuantificar el contenido de Norfloxacin en las muestras de pollo. Las muestras fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito en la metodología, y la cuantificación se realizó utilizando la curva de calibrado establecida. Los resultados obtenidos de la extracción de este analito en las muestras de pollo se presentan en la Tabla 5.

Se observa la detección y cuantificación de Norfloxacin en tres marcas comerciales de pollo, con concentraciones que variaron entre 888,0512 y 7809,442 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, así como en la muestra de pollo casero del Mercado 4 que contiene una concentración de 1962,426 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Sin embargo, no se detectó

la presencia de Norfloxacin en la muestra de pollo casero del interior del país. Es importante destacar que el valor "ND" indica no detectado dentro del límite de detección (LD), mientras que las concentraciones detectadas y cuantificadas se encuentran dentro del rango entre el límite de detección y el límite de cuantificación (LC). Estos resultados muestran una variabilidad en la presencia de Norfloxacin en las muestras de pollo comercializadas (Fig. 4) en los supermercados de la Gran Asunción, con concentraciones detectables en todas las marcas y ausencia solo en el pollo casero del interior del país. Esta variación puede estar relacionada con diversos factores, como el uso de este fármaco en la cría de pollos para prevenir enfermedades, así como aspectos relacionados con la alimentación y el manejo de los animales. Estos hallazgos coinciden con estudios similares realizados en Colombia, donde también se ha encontrado un alto contenido de Norfloxacin en carnes de pollo (Acevedo *et al.*, 2015).

Esta problemática generalizada en la presencia de este compuesto en aves de corral destinadas al consumo humano destaca la importancia de abordar el uso responsable de antibióticos en la cría de aves y de implementar medidas efectivas para garantizar la seguridad alimentaria. La aplicación del método analítico desarrollado permitió detectar

**Figura 4.** Cromatograma de la Norfloxacin en una muestra de pollo comercial.

y cuantificar Norfloxacin en muestras de pollo, evidenciando su presencia en marcas comerciales. Estos resultados resaltan la necesidad de realizar un monitoreo continuo de los niveles de residuos de antibióticos en los alimentos, con el fin de garantizar la seguridad alimentaria y promover prácticas responsables en la industria avícola, tanto en la Gran Asunción como en otras regiones, tal como se ha demostrado en investigaciones previas realizadas en Colombia (Acevedo *et al.*, 2015).

Conclusión

En este estudio, se desarrolló y validó un método analítico altamente sensible, preciso y exacto utilizando la técnica de extracción sólido-líquido y cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) para la determinación y cuantificación de Norfloxacin en muestras de carne de pollo comercializadas en supermercados de la Gran Asunción. Los resultados obtenidos demostraron que el método propuesto es altamente sensible, con un límite de detección (LD) de 0,9526 µg/mL y un límite de cuantificación (LC) de 2,8867 µg/mL. Esto indica que el método puede detectar y cuantificar Norfloxacin en concentraciones extremadamente bajas en la muestra de carne de pollo. Además, se estableció la linealidad del método mediante la construcción de una curva de calibrado utilizando diferentes concentraciones conocidas de Norfloxacin. El coeficiente de correlación (R^2) de la curva de calibrado fue de 99,4%, lo que indica una relación lineal entre la concentración de Norfloxacin y la señal instrumental obtenida. Asimismo, se determinó un rango dinámico lineal (RDL) del analito de 2,88-100 µg/mL, lo que permite una amplia cobertura de concentraciones en las muestras analizadas. La aplicabilidad del método se confirmó mediante la determinación de Norfloxacin en muestras de pollo comercial.

Se observó que la presencia de Norfloxacin fue detectada y cuantificada en algunas marcas comerciales de pollo, con concentraciones que variaron entre 888,0512 y 7809,442 µg/Kg. Estas cifras superan significativamente las cantidades máximas de Norfloxacin permitidas para la carne de pollo (100 µg/Kg) según la normativa establecida por

el Codex Alimentarius en su Comisión de Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios. Es importante resaltar que en la muestra de pollo casero del interior del país no se detectó la presencia de Norfloxacin. Estos resultados sugieren la necesidad de un monitoreo continuo de los niveles de residuos de antibióticos, como la Norfloxacin, en las muestras de carne de pollo comercial. Se observó una diferencia significativa entre los pollos criados de forma casera en el interior del país, los cuales no presentaban este antibiótico, y aquellos comercializados en el Mercado 4 de Asunción bajo la denominación de "pollo casero", los cuales mostraron altas concentraciones de Norfloxacin. Además, es fundamental implementar medidas de control y regulación para garantizar la seguridad alimentaria y promover prácticas responsables en la industria avícola. Se requiere una investigación exhaustiva para identificar las fuentes de contaminación con Norfloxacin en las cadenas de producción avícola y tomar medidas correctivas en las marcas comerciales que exceden los límites establecidos.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

- Acevedo, D., Montero, P. M., & Jaimes, J. D. C. (2015). Determinación de Antibióticos y Calidad Microbiológica de la Carne de Pollo Comercializada en Cartagena (Colombia). *Información Tecnológica*, 26(1): 71 – 76.
- Analytical Methods Committee. (1994). Is my calibration linear? *Analyst*, 119: 2363–2366.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N. M. & Vilchez, J.L. (2018). Validación de un método de análisis de

- benzofenonas en muestras de suelo por extracción con líquidos presurizados y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Reportes Científicos de la FACEN*, 9(1): 51–63.
- Benítez-Villalba, J.C., Grau-Torales, M.G., Cristaldo-López, O.D., Bogado-Fernández, A.I., Arrúa-Martínez, L.A. & Villalba-Villalba, N.M. (2021). Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC. *Reportes Científicos de la FACEN*, 12(1): 48–58.
- Benítez-Villalba, J.C., Zafra-Gómez, A., DorivalGarcía, N., Camino-Sánchez, F.J., Cantarero, S. & Vilchez, J.L. (2013). Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: Comparison of the efficiency of two extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 36(16): 2635–2645.
- Cuadros Rodríguez, L., García Campana, A.M., Jimenez Linares, C., & Roman Ceba, M. (1993). Estimation of performance characteristics of fan analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6): 1243–1258.
- Gonzalez, A., Cuadros, L., Alonso, E., Vilchez, J.L. (1996). Estimate of gas chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 726: 133–139.
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., & Angulo, F. J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8): 1248–1253.
- IUPAC. (1978). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II data interpretation. Analytical chemistry division. *Spectrochimica Acta B*, 33(6): 241–245.
- Hermans, D., Pasmans, F., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Van Deun, K. & Haesebrouck, F. (2011). Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 12(2): 89–98.
- Johnson, J.R., Johnston, B.D., Porter, S.B., Clabots, C., Bender, T.L., Thuras, P., Trott, D.J., Cobbold, R., Mollinger, J., Ferrieri, P., Drawz, S. & Banerjee, R. (2019). Rapid emergence, subsidence, and molecular detection of *Escherichia coli* sequence type 1193-*fimH64*, a new disseminated multidrug-resistant commensal and extra-intestinal pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(4)e01581-18: 1–12.
- Mandel, J. & Stiehler, R.D. (1954). Sensitivity—A criterion for the comparison of methods of test. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 53(3): 155–159.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4): 718–733.
- Martínez, J.L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887): 365–367.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*, May 2016: 1–80.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18): 5649–5654.
- Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T*, 40(4): 277–283.
- Zhang, L., Huang, Y., Zhou, Y., Buckley, T., & Wang, H.H. (2013). Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota.

- Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8): 3659–3666.
- Zhu, Y. G., Zhao, Y., Li, B., Huang, C. L., Zhang, S. Y., Yu, S., Chen, Y. S., Zhang, T., Gillings, M. R., & Su, J. Q. (2017). Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology*, 2(16270): 1–7.

Cadenas de Markov ocultas discretas y los experimentos mendelianos**Discrete hidden Markov chains and mendelian experiments**César Daniel Amarilla^{1,*} 

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Matemática y Estadística, Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay. *Email: ceamarilla@gmail.com.

Resumen: La naturaleza presenta innumerables fenómenos envueltos de incertidumbre. El modelado de estos fenómenos constituye uno de los pilares de la estadística matemática en la formulación de estrategias de estimación. Los modelos ocultos de Markov forman una clase muy variada de modelos que han sido muy estudiados y aplicados en muy diversas ramas de las ciencias, desde la Ingeniería en telecomunicaciones hasta la Biología. Desde el punto de vista de la Biología, los perfiles basados en las cadenas de Markov ocultas son extensiones no triviales de los modelos de perfil usuales. Este reporte científico estudia herramientas matemáticas necesarias para la solución de los problemas que presentan los modelos ocultos de Markov al ser ajustados en los experimentos mendelianos. Los resultados demuestran la validez de la base teórica matemática de estos modelos como estrategias de estimación de fenómenos biológicos.

Palabras clave: *incertidumbre, modelos ocultos de Markov, experimentos mendelianos, fenómenos biológicos.*

Abstract: Nature provides innumerable phenomena where uncertainty is involved. The modeling of these phenomena is the goal of statistics as a research field. Hidden Markov models form a very wide class of models that have been widely studied and applied in many different branches of science, from engineering to biology. From the viewpoint of biology, profiles based on hidden Markov chains are nontrivial extensions of the usual profile models. In this scientific report, we study some of the mathematical tools needed to solve problems posed when fitting hidden Markov models for subsequent application in mendelian experiments. Our results reinforce the validity of the theoretical basis of these models as mathematical estimation strategies for biological phenomena.

Keywords: *uncertainty, hidden Markov models, mendelian experiments, biological phenomena.*

Introducción

Esta investigación se ha basado en los trabajos de reseña de Forney (1973), Juang and Rabiner (1986) y (1990) y Cappé et al. (2007). Los experimentos mendelianos fueron desarrollados siguiendo los trabajos de Bilmes (1997), Thorvaldsen (2005) y Krogh et al. (1994). Las teorías necesarias para los cálculos de las probabilidades fueron tomadas de Bilmes (1997).

El comportamiento de la mayoría de los fenómenos físicos o dinámicos están gobernadas por la incertidumbre debido a la inestabilidad de las variables dentro de los procesos en el transcurso de su evolución. Esto obliga a los investigadores a desarrollar metodologías de estimación acerca del comportamiento de estos fenómenos, que les permiten conocer o al menos reducir la incertidumbre acerca de los mismos. Estas metodologías de estimación pueden consistir en la estructuración

de modelos estadísticos matemáticos que permitan la descripción y comprensión del comportamiento interno de las propiedades de las variables involucradas.

Las características fundamentales en la formación de modelos estadísticos son las variables aleatorias intervinientes en el proceso estocástico en estudio y sus distribuciones de probabilidades asociadas, lo que hace necesario el conocimiento del espacio probabilístico del cual proviene. La teoría de la probabilidad es una de las teorías que ayuda a los investigadores en su afán de comprensión de la incertidumbre.

Las cadenas de Markov forman parte de los procesos estocásticos dependientes. Uno de los modelos estadísticos markovianos más utilizados en los últimos tiempos en diversas ramas de la ciencia, como ser en la Biología, constituyen las Cadenas de Markov Ocultas o sus siglas en inglés HMM

Editor responsable: Nery López Acosta* 

Recibido: 21/11/2023

Aceptado: 26/12/2023

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



(Hidden Markov Models). Las características generales de estos modelos constituyen sus elementos y cada uno de los tres problemas fundamentales relacionados con ellos (evaluación, descodificación y aprendizaje). Cada uno de los tres problemas en un modelo de Markov oculto puede ser estudiado mediante la utilización de ciertos algoritmos.

Materiales y métodos

Cadenas de Markov

En la realidad existen sistemas dinámicos que van evolucionando en el transcurso del tiempo y están gobernados por ciertas condiciones que pueden estar estructuradas sobre una base determinística. Por ello, las propiedades de los procesos físicos no cambian con el paso del tiempo, o sobre una base aleatoria, en cuyo caso los procesos se rigen por leyes probabilísticas. En general, un proceso estocástico es un modelo matemático que describe el comportamiento de un sistema dinámico sometido a un fenómeno de naturaleza aleatoria que hace que el sistema evolucione según un parámetro que normalmente es el tiempo, dado por la secuencia $n = 1, 2, \dots, t, \dots$, y que va cambiando probabilísticamente de un estado a otro.

Un tipo especial de proceso estocástico constituyen las cadenas de Markov, que fueron descubiertas por el matemático ruso Andrei Andreyevich Markov (1956 - 1922) alrededor de 1905, y que pueden aplicarse a una amplia gama de fenómenos científicos y sociales, y se cuenta con una teoría matemática extensa al respecto.

Espacio de estados y probabilidades de transición

Una cadena de Markov es un proceso estocástico a tiempo discreto dado por el conjunto $\{X_n : n=0,1, \dots\}$, con un espacio de estados discreto $S = \{S_1, S_2, \dots\}$, y que satisface la propiedad de Markov. Esto es, para cualquier entero $n \geq 0$, y para cualesquiera estados x_0, \dots, x_n, x_{n+1} , se cumple que:

$$p(x_{n+1} | x_0, \dots, x_n) = p(x_{n+1} | x_n) \quad (1)$$

Si el tiempo $n + 1$ se considera como un tiempo futuro, el tiempo $0, 1, \dots, n - 1$ como el presente y los tiempos $0, 1, \dots, n - 1$ como el pasado, entonces la condición dada por las cadenas de Markov establece que la distribución de probabilidad del estado del proceso al tiempo futuro $n + 1$ depende únicamente del estado del proceso al tiempo n , y no depende de los estados en los tiempos pasados $0, 1, \dots, n - 1$.

La probabilidad $p(X_{n+1} = j | X_n = i)$ se denota por $p_{ij}(n+1, n)$, y representa la probabilidad de transición del estado j al estado j en el tiempo $n + 1$. Son conocidas como las probabilidades de transición en un paso. Cuando los números n no dependen de n se dice que la cadena es estacionaria u homogénea en el tiempo. Por simplicidad se asume tal situación de modo que las probabilidades de transición en un paso se escriben como P_{ij} . De esta manera, dada una cadena de Markov $\{X_n : n=0,1, \dots\}$ con espacio de estados S , la función P_{ij} con $i, j \in S$ es llamada función de transición de la cadena y está dada por:

$$p_{ij} = P(X_1 = j | X_0 = i) \quad (2)$$

La función de transición de la cadena cumple con las siguientes propiedades: $p_{ij} \geq 0, \forall \{i, j\} \in S$, esto es por definición de probabilidad y $\sum_j p_{ij} = 1$, para cada i .

Matriz de transición de probabilidades

Cuando el espacio de estados es finito, esto decir $S = \{0, 1, \dots, N\}$, la función de probabilidad P_{ij} de dicha cadena puede ser expresada mediante la matricial cuadrada P de la siguiente manera.

$$P = \begin{pmatrix} P_{00} & L & P_{0N} \\ M & O & M \\ P_{N0} & L & P_{NN} \end{pmatrix}$$

Esta matriz captura la esencia del proceso y determina el comportamiento de la cadena en cualquier tiempo futuro. La entrada (i, j) es la pro-

babilidad de transición P_{ij} , es decir la probabilidad de pasar del estado i al estado j en una unidad de tiempo. El índice i se refiere al renglón de la matriz y el índice j a la columna. Esta matriz cumple las siguientes condiciones: $p_{ij} \geq 0$ y $\sum_{j=1}^N p_{ij} = 1$. Si

además satisface la condición $\sum_{i=1}^N p_{ij} = 1$ dice que

es una matriz doblemente estocástica.

Distribución de probabilidad inicial

En general puede considerarse que una cadena de Markov inicia su evolución partiendo de un estado i cualquiera, o más generalmente considerando una distribución de probabilidad inicial sobre el espacio de estados.

Una distribución inicial para una cadena de Markov con espacio de estados dado por $S = \{0, 1, \dots\}$ es simplemente una distribución de probabilidad sobre este conjunto, es decir una función π_i , que corresponde a la probabilidad de que la cadena inicie en el estado i , tal que:

$$\pi_i = P(X_0 = i), \forall i \in S \quad (3)$$

Si el espacio de estados es finito, es decir $S = \{0, 1, 2, \dots, N\}$, entonces la distribución inicial podría verse como una n -tupla aleatoria $\Pi = (\pi_0, \dots, \pi_N)$.

Caracterización de la propiedad markoviana en un proceso estocástico

En todo proceso estocástico que cumpla con la propiedad de Markov es posible calcular la distribución conjunta de cualquier secuencia finita de variables aleatorias en el proceso. Esto es, si X_0, X_1, \dots, X_n constituye una secuencia de variables aleatorias se tiene que:

$$p(x_0, x_1, \dots, x_n) = \pi_0 \prod_{i=1}^n p(x_i | x_{i-1}) \quad (4)$$

Dígrafos de transición

Un dígrafo o grafo dirigido es una tripleta (S, E, I) , donde S es un conjunto cuyos elementos son llamados vértices, E otro conjunto cuyos elementos son las aristas y finalmente I es una función que le asocia a cada arista $e \in E$ un par ordenado de vértices llamados extremo de e . El primer vértice es llamado la cola y el segundo la cabeza de e . Generalmente un dígrafo es dibujado en forma tal que cada vértice queda representado por un punto en el plano, y cada arista por una curva que une los representantes de sus extremos. Para distinguir cabeza de cola, dibujamos una flecha en la cabeza de la arista (Fig. 1).

Las cadenas de Markov pueden ser representadas mediante gráficos denominados dígrafos de transición o grafos dirigidos, tal como lo muestra la Fig. 2. Estas cadenas suelen ser analizadas me-

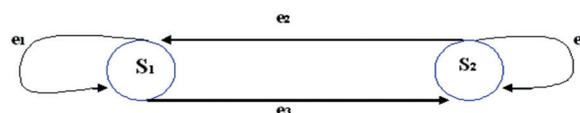


Figura 1: Dígrafo totalmente dirigido.

dante la utilización de grafos dirigidos con pesos, que están constituidos por una terna (S, E, I) , donde los elementos de S (conjunto de nodos) son los estados de la cadena de Markov. Los elementos del conjunto E (conjunto de aristas) constituyen arcos, simbolizados $e = (i, j)$, a los cuales son asignadas probabilidades no nulas de transición, $p_{ij} > 0$. Las

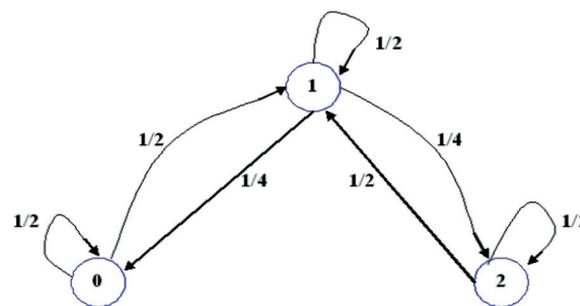


Figura 2: Dígrafo de transición.

aristas pueden también presentarse como bucles o lazos, situaciones en las cuales los arcos empiezan y terminan en un mismo nodo.

Evolución de las cadenas de Markov

Una cadena de Markov con espacio de estados finito $S = \{0, 1, \dots, N\}$ y distribución inicial

$\Pi = (\pi_0, \dots, \pi_N)$ puede dividirse en sectores sobre el espacio de estados de acuerdo a un criterio fácilmente observable; pero esta división en subconjuntos no es estable ya que va evolucionando en el tiempo y el proceso queda establecido en N sectores o estados del proceso y en un instante dado la condición de la situación es $V_k = (v_k(0), v_k(1), \dots, v_k(N)), \forall k \in \{0, 1, \dots\}$,

donde cada $v_k(i), \forall i \in \{0, 1, \dots, N\}$, indica el tamaño del sector i -ésimo en el instante k , ya sea en magnitud absoluta, en porcentaje del total, o en porción de unidad.

Al utilizar porciones de la unidad para representar las componentes $V_k(i)$ de V_k , se tendrá que cada V_k es una distribución de probabilidad, sus componentes son no negativas y suman 1. Como la observación no se realiza en todo momento, sino al término de lapsos iguales de tiempos, se tendrá que V_k depende del período en que se realiza la observación durante el proceso, es decir es una función de variable que va tomando valores en los números naturales $0, 1, \dots$ y arroja una sucesión de distribuciones $\Pi, V_1, V_2, \dots, V_k, V_{k+1}, \dots$, donde Π indica cómo es cada sector en el inicio del proceso y se supone que la distribución V_k depende linealmente de la distribución anterior V_{k+1} , es decir existe una matriz de probabilidades de transición P de orden de $(n \times n)$ tal que:

$$V_k = V_{k-1} \cdot P = \Pi \cdot P^{(k)} \quad (5)$$

Con todo lo expresado, se puede concluir que cualquier secuencia observada en una cadena de Markov queda totalmente especificada por la distribución inicial y la matriz de probabilidades de

transición.

Probabilidades de transición en n pasos

En una cadena de Markov $\{X_n : n=0, 1, \dots\}$, con espacio de estados S y función de transición dada por $p_{ij} = P(X_1 = j | X_0 = i), P(X_{m+n} = j | X_m = i)$ corresponde a la probabilidad de pasar del estado i , en el tiempo m , al estado j , en el tiempo $m+n$. Dado el supuesto de la condición de homogeneidad en el tiempo, esta probabilidad no depende realmente del tiempo m , por lo que coincide con la probabilidad $P(X_n = j | X_0 = i)$, y se denota por $p_{ij}(n)$ o $p_{ij}^{(n)}$, donde el número de pasos n se escribe entre paréntesis para distinguirlo de algún posible exponente, y se llama probabilidad de transición en n pasos.

Si el espacio de estados es finito, las probabilidades de transición pueden ser expresadas mediante la matriz de transición de probabilidades P y por lo tanto, la función de transición en n pasos es igual a la potencia n -ésima de la matriz P .

Comunicación

Para que dos estados en una cadena de Markov se comuniquen necesariamente debe darse la propiedad de accesibilidad entre ellos. De esta forma, un estado j es accesible desde un estado i cuando se tenga un entero $n \geq 0$ tal que $p_{ij}^{(n)} \geq 0$. Por lo tanto, los estados i y j se comunican si i es accesible desde el estado j y j es accesible desde el estado i . La comunicación entre dos estados constituye la posibilidad de pasar de un estado a otro en un número finito de transiciones e indica una partición del espacio de estados de la cadena dada por los subconjuntos de estados comunicantes. Esto es, dos estados pertenecen al mismo elemento de la partición si y solo si, tales estados se comunican.

De este modo el espacio de estados de una cadena de Markov se subdivide en clases de comunicación.

Como la propiedad de accesibilidad constituye una relación de equivalencia, se cumple que: todo estado i es accesible desde si mismo, si el estado i

es accesible desde el estado j se tiene que el estado j es accesible desde el estado i y si el estado i es accesible desde el estado j y el estado j es accesible desde el estado k entonces el estado i es accesible desde el estado k .

Estados absorbentes, recurrentes y transitorios

En una cadena de Markov, un estado i es absorbente si $P_{ij} = 1$. Mientras que un estado i es recurrente si la probabilidad de eventualmente regresar a i , partiendo de i , es uno, es decir si:

$$P(X_n = i \text{ para alguna } n \geq 1 | X_0 = i) = 1 \quad (6)$$

Todo estado absorbente es un estado recurrente. Un estado que no sea recurrente recibe el nombre de transitorio, y en tal caso la probabilidad anterior es menor a uno.

Estados límites y de equilibrio

Dada una cadena de Markov cuya matriz de probabilidades de transición es P , sea V una distribución de probabilidad. Diremos que V es la distribución de equilibrio del proceso, si se verifica que

$$V = VP \quad (7)$$

Si un proceso llegara a una distribución de equilibrio, se haría constante, es decir, todas las distribuciones posteriores serían iguales.

Por otra parte, sea $\{X_n : n=0,1,\dots\}$ una cadena de Markov con espacio de estado finito que tiene una distribución inicial Π y matriz de transición P . De acuerdo a la noción de convergencia, cabe preguntarse si existe:

$$V_\infty = \lim_{k \rightarrow \infty} V_k = \Pi \lim_{k \rightarrow \infty} P^{(k)} = \Pi P^{(\infty)} \quad (8)$$

En caso de existir, se dice que V_∞ es la distribución límite o de equilibrio de la cadena de Markov.

Regularidad

Las cadenas de Markov regulares son cadenas finitas que cumplen con la propiedad Markoviana y que a partir de un cierto momento un vector de estado pasa a otro cualquiera con probabilidades estrictamente positivas en un paso. Esto es, una

cadena de Markov finita tiene matriz de transición regular si existe un entero no negativo, $n \geq 0$, tal que $p_{ij}(n) > 0$, para cualesquiera estados i y j . Entonces, una cadena de Markov será regular si alguna potencia de su matriz de probabilidades de transición tiene todas sus entradas estrictamente positivas.

Cadenas de Markov ocultas

La idea general de un Modelo Oculto de Markov (HMM) también llamada cadena de Markov oculta está en el hecho de que, al medir o cuantificar cierto fenómeno, la lectura que genera la secuencia observable de símbolos no necesariamente es el proceso real del fenómeno, ya que el instrumento de medición podría estar introduciendo un ruido en la verdadera señal. Por esta razón, este tipo de modelamiento introduce dos procesos: uno observable y otro oculto. En este modelo el proceso oculto es una cadena de Markov homogénea con espacio de estados finito y no se requiere que el proceso observado cumpla con la propiedad de Markov, sino que sea simplemente un proceso estocástico.

Los modelos ocultos de Markov (HMM) fueron introducidos a finales de los sesenta y principios de los setenta por Leonard E. Baum en un artículo, el cual propuso este modelo como un método estadístico de estimación de las funciones probabilísticas de las cadenas de Markov.

Desde finales de 1970 cuando los modelos ocultos de Markov fueron aplicados a sistemas de reconocimiento de voz, se desarrollaron técnicas para estimar probabilidades sobre estos sistemas en específico. Estas técnicas permiten a estos modelos llegar a ser eficientes, robustos y flexibles de manera computacional.

Un modelo oculto de Markov constituye una técnica de modelización de datos secuenciales aplicada inicialmente en el campo del reconocimiento automático del habla (Rabiner, 1989), donde actualmente es una herramienta casi imprescindible. Este modelo puede ser pensado como una máquina de estados finito donde las transiciones entre los estados dependen de la ocurrencia de algún símbolo.

En general, son muy útiles para el reconocimiento de patrones y en particular son substancialmente efectivos para modelar el comportamiento del hombre o procesos en los que existe la intervención del hombre.

Formalmente, una cadena de Markov oculta es un proceso binario (doblemente estocástico) $\{X_n, Y_n\}$, $\forall n \in \{0, 1, 2, \dots\}$, donde $\{X_n\}$ es una cadena de Markov homogénea con espacio de estados finito y $\{Y_n\}$ es un proceso estocástico cuya distribución condicional solo depende de $\{X_n\}$.

Se entiende entonces que los modelos ocultos de Markov son modelos estadísticos que juntan de acuerdo a leyes probabilísticas una colección de variables aleatorias $\{Y_1, Y_2, \dots, Y_T, X_1, X_2, \dots, X_T\}$, con T finito. Las variables Y_t pueden ser observaciones continuas o discretas y las variables X_t son variables ocultas y discretas. Los HMM pueden particularizarse de acuerdo a las leyes probabilísticas que gobiernan a las variables aleatorias que intervienen en el modelo. En este tipo de modelos probabilísticos se asumen dos condiciones de independencia que son:

la t -ésima variable aleatoria: dada la $(t-1)$ -ésima variable aleatoria del proceso oculto, es independiente de variables previas, es decir que X_t depende solamente de la X_{t-1} con lo que:

$$P(X_t | X_{t-1}, Y_{t-1}, \dots, X_1, Y_1) = P(X_t | X_{t-1}) \quad (9)$$

la t -ésima observación: dada la t -ésima variable oculta, es independiente de cualquier otra variable, es decir que Y_t depende solo de X_t , con lo que

$$P(Y_t | X_T, Y_T, \dots, X_{t+1}, Y_{t+1}, X_t, Y_t, X_{t-1}, Y_{t-1}, \dots, X_1, Y_1) = P(Y_t | X_t) \quad (10)$$

La Fig. 3 es un modelo probabilístico gráfico que muestra un conjunto de variables aleatorias

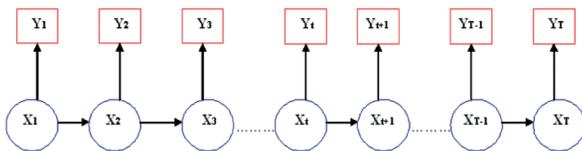


Figura 3: Red Bayesiana dinámica simple que refleja las condiciones de independencia en los HMM.

y sus condiciones de dependencia. Esta gráfica es llamada Red Bayesiana dinámica simple y refleja las dos condiciones de independencia impuestas a las variables aleatorias intervinientes en los HMM. Los círculos en azul representan a las variables aleatorias del proceso oculto y los rectángulos en rojo a las del proceso visible. Estas variables aleatorias pueden tomar ciertos valores en cada instante t , además cada símbolo X_t representa una variable aleatoria del proceso markoviano discreto oculto en el instante t , mientras que los símbolos Y_t constituyen las variables aleatorias del proceso observable en cada instante t . Las flechas indican las formas de dependencias condicionales entre las variables aleatorias.

Elementos de los HMM discreto

Si se tiene que las observaciones Y_t son discretas con N posibles valores, entonces estamos ante una cadena de Markov oculta discreta. En los HMM discretos intervienen los siguientes elementos:

- $S = \{1, 2, \dots, N\}$ es el conjunto finito de estados del proceso oculto, en donde N es la cantidad total de estados en el modelo.
- V es el conjunto de valores o símbolos diferentes que se pueden observar en cada uno de los estados, puede considerarse también un alfabeto finito. Cada uno de los símbolos que un estado puede emitir se denota como $\{v_1, v_2, \dots, v_M\}$, donde M es el número de símbolos del alfabeto y cada v_k se refiere a un símbolo diferente.
- $\Pi = (\pi_1, \pi_2, \dots, \pi_N)$ es la distribución de probabilidad inicial de los estados del proceso oculto, con $\pi_i = P(X_1 = i)$, $\forall i \in \{1, 2, \dots, N\}$ y

$$\sum_{i=1}^N \pi_i = 1. \text{ Cada } \pi_i \text{ representa la proba-}$$

bilidad de que el proceso esté en el estado i en el instante en que se inicia.

- $\mathbf{A} = \{p_{ij}\}$ constituye la matriz de probabilidades de las transiciones entre los estados del proceso estocástico oculto, es decir: $p_{ij} = P(X_{n+1} = j | X_n = i)$, $\forall \{i, j\} \in \{1, 2, \dots, N\}$ y $\forall n \in \{1, 2, \dots\}$.

Por lo cual, cada p_{ij} constituye la probabilidad de que el sistema se encuentre en el estado j en el tiempo $n+1$ dado que se encuentra en el estado i en el tiempo n .

- $\mathbf{B} = \{b_i(k)\}$ constituye la matriz de probabilidad de emisión de un estado dado. Constituye la distribución de probabilidad de los estados en el proceso observable, en donde cada $b_i(k) = P(Y_n = v_k | X_n = i), \forall i \in \{1, 2, \dots, N\}$, $\forall n \in \{1, 2, \dots\}$ y $\forall k \in \{1, 2, \dots, M\}$ con $\sum_{k=1}^M b_i(k) = 1$. Cada $b_i(k)$ constituye la probabilidad de que el sistema, estando en el instante n en el estado i , genere la observación v_k .

Cualquier secuencia de observaciones generadas dentro del proceso se simboliza por $Y = (Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$, donde cada $Y_i \in V$, $\forall i \in \{1, 2, \dots, k\}$, representa una observación y k es la cantidad de observaciones en la secuencia.

La Fig. 4 muestra el modelo gráfico de un HMM con cuatro estados ocultos y dos tipos de observaciones. Las flechas continuas indican las transiciones entre los estados del proceso markoviano oculto ($p_{ij} > 0$), y las flechas punteadas constituyen las probabilidades de emisión de observación en cada

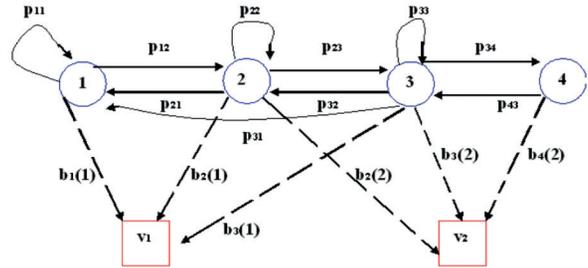


Figura 4: Grafica de un HMM con cuatro estados ocultos y dos tipos de observaciones.

estado oculto ($b_i(k) > 0$).

Experimentos mendelianos

En 1866, se publicaron los famosos experimentos de Mendel en la hibridación de las plantas, el cual es considerado a menudo el trabajo de rompimiento del hielo de la genética moderna. Mendel no tenía ningún conocimiento anterior de la naturaleza dual de los genes, pero a través de una serie de experimentos en el jardín de su convento, pudo detectar la presencia de gen oculto y nombrarlo “Elemente”.

El mundo biológico es bastante complejo y a menudo demasiado complicado para el modelado matemático. En comparación con la física, solo recientemente han atacado problemas biológicos mediante el uso de métodos matemáticos enfocados a lo computacional. La más nueva y más desafiante interacción entre la biología y la matemática viene de la biología molecular moderna y de la bioinformática.

La genética ha tenido una explosión en número de descubrimientos y se ha desarrollado a la par del avance computacional. Experimentos como los de Gregor Mendel (1822-1884), titulado “los experimentos en los híbridos de las plantas (1866)”, pueden ser revisitados y las leyes de la herencia redescubiertas usando las técnicas y los datos de su publicación original. La genética mendeliana se refiere a la transmisión de los rasgos biológicos discretos de una generación a otra y los modos de expresión de los genes.

Los inicios, las cuentas y los experimentos realizados por Mendel

Mendel fue miembro del monasterio de Santo Tomás en Brunn, República Checa, a la edad de 21 años y estudió teología entre los años 1844 y 1848. Fue profesor de ciencias, física y matemática. Estudió en la Universidad de Viena entre 1851 y 1853. Su maestro más influyente fue Andreas Von Ettingshausen. Escribió un libro en combinatoria ("Die combinatorische Análisis", Viena, 1826), y había recogido claramente algunos de los métodos utilizados allí, más tarde en su serie de experimentos con las plantas. Resultó ser un buen experimentador en el jardín del monasterio, a pesar de que sólo tenía acceso a equipos bastantes simples. Hizo sus clásicos experimentos en la cría de plantas entre los años 1856 y 1863, donde cultivó y experimentó con al menos 28.000 plantas.

Los guisantes son la cuarta parte más importante en el cultivo de legumbres del mundo. Mendel eligió un guisante común del jardín que eran arvejas de la especie *Pisum sativum* para sus primeros experimentos en la hibridación por motivos prácticos (eran baratos, fáciles de obtener y tienen un tiempo de generación relativamente corto) y por otras dos razones que fueron cruciales para el éxito de sus experimentos, ya que las semillas de las arvejas presentaban variedades de formas y colores fáciles de identificar y analizar. Además, estas plantas, en forma silvestre se autofecundan y pueden ser manipuladas por el experimentador de modo tal que se puede dirigir la reproducción entre dos individuos (fecundación cruzada).

Las arvejas son plantas que se autofecundan de manera natural y exhiben caracteres que se presentan de manera simple y en distintas formas. Un carácter es un cierto rasgo o característica específica de un organismo y en general posee diferentes variantes, formas en que puede presentarse. Para lograr arvejas con ciertos caracteres, Mendel las cultivó durante muchas generaciones obteniendo líneas puras, es decir, subpoblaciones que producían descendencia homogénea para cada carácter elegido. Obtuvo siete parejas de líneas puras para siete caracteres, diferenciando cada pareja sólo respecto

Tabla 1: Caracteres versus variantes en las arvejas.

Carácter	Variante	
Color de la flor	Rojo	Blanco
Color de la semilla	Amarillo	Verde
Textura de la semilla	Lisa	Rugosa
Forma de la vaina	Hinchada	Hendida
Color de la vaina	Verde	Amarillo
Longitud del tallo	Largo	Corto
Tipo de floración	Terminal	Axial

de un carácter. Los siete caracteres, junto con sus respectivas variantes, estudiados por Mendel en las arvejas se presentan en la Tabla 1.

Color de las flores de las plantas

El primer carácter estudiado por Mendel fue el color de las flores de las plantas. Como primer paso fecundó una planta de flores rojas con el polen de una planta de flores blancas, estos ejemplares de líneas puras constituyen la generación parental (P). Este cruzamiento originó la primera generación filial (F1), cuyos integrantes tenían todas flores rojas. Luego tomó plantas de flores blancas y las fecundó con polen de plantas de flores rojas y obtuvo los mismos resultados.

En su segundo experimento, tomó los ejemplares de la primera generación filial (F1) y las autofecundó, obteniendo como resultado 929 semillas en la segunda generación filial (F2), que luego sembró y cuando comenzaron a dar flores, se observó que algunas plantas tenían flores blancas, con lo cual había reaparecido la otra variante. Con estos resultados, primero contó la cantidad de individuos de cada variante hallada en F2 y calculó la proporción entre ellos, encontró que de un total de 929 plantas de F2, 705 tenían flores rojas y 224 tenían flores blancas. Las proporciones eran de aproximadamente 3:1, de cada 4 flores 3 eran de color rojo.

Mendel dedujo que F1 recibe la capacidad de producir flores rojas o blancas. Sin embargo, una de las variantes (flor blanca) no se expresa. Para denominar este fenómeno, utilizó el término do-

minante para designar a la variante que se expresa en F1 y el término recesivo, para la variante que queda enmascarada y reaparece en F2.

Color de las semillas

Siguiendo con sus experimentos, Mendel estudió el color de las semillas. La ventaja de usar este carácter era que no tenía que esperar a que cada uno de los individuos de cada generación floreciera. Para este carácter, dedujo que el color amarillo es dominante y que el color verde era recesivo. Además, pensó que, si a partir de las plantas con semillas amarillas de F1 surgieron, en F2, plantas con semillas verdes, era posible que, a su vez, las plantas amarillas de F2 también “escondieran” el carácter verde.

Para analizar su idea, Mendel autofecundó 519 plantas con semillas amarillas de F2 y vio que 166 de ellas sólo producían arvejas con semillas amarillas. Las llamó “amarillas puras”. Por otra parte, 353 plantas producían arvejas con semillas amarillas y verdes, nuevamente en una proporción 3:1. De cada cuatro semillas tres eran de color amarillo, llamadas “amarillas impuras” (Fig. 5). Por lo tanto, de las plantas con semillas amarillas en F2, alrededor de los $1/3$ eran como el parental amarillo de línea pura y los $2/3$ eran como los amarillos de F1, es

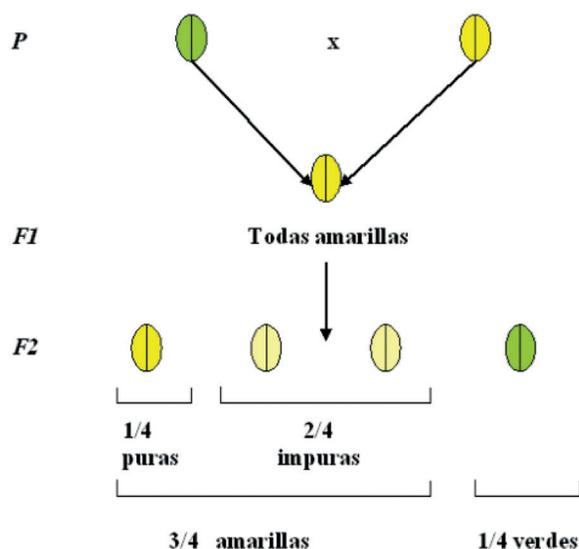


Figura 5: Proporciones observadas durante el proceso de fecundación de la semilla híbrida.

decir, producían semillas amarillas y verdes en una proporción 3:1.

Por otra parte, las plantas con semillas verdes siempre daban arvejas con semillas verdes, por lo que eran puras siempre. Con estos resultados, Mendel se dio cuenta que era preciso distinguir la constitución genética de un individuo, su genotipo, de la expresión visible del mismo, su fenotipo.

Entonces, en F1 se tiene al fenotipo amarillo y en F2 a los fenotipos amarillo y verde. Las plantas con fenotipos amarillos en F2 no son todas iguales. Utilizando la notación A , para la variante dominante (amarilla) y a para la variante recesiva (verde), podemos representar a los genotipos de F2 de la siguiente manera: el genotipo AA corresponde a las plantas con semillas “amarillas puras”, el genotipo Aa corresponde a las plantas con semillas “amarillas impuras” y el genotipo aa corresponde a las plantas con semillas “verdes”.

Según los resultados, en F2 se contemplan dos tipos de fenotipos, amarillo y verde, pero tres tipos de genotipos, denominadas homocigota dominante (AA), heterocigota (Aa) y homocigota recesiva (aa). En su documento, Mendel informó que realizó sus experimentos para cuatro a seis generaciones, sin dar más cifras, indicando solamente los resultados generales y fórmulas matemáticas.

Textura y color de las semillas

A fin de responder a la pregunta: ¿cómo serían las proporciones cuando se consideran dos caracteres simultáneamente? Mendel consideró en su siguiente experimento los caracteres “textura de la semilla”, cuyas categorías son lisa (B) y rugosa (b), y “color de las semillas” con categorías amarillo (A) y verde (a), utilizando dos líneas puras: plantas con semillas lisas y verdes cuyos genotipos son de la forma $aaBB$ y plantas con semillas rugosas y amarillas con genotipos $AAbb$.

En el cruzamiento de las dos líneas puras ($AAbb \times aaBB$), tal como lo muestra la Fig. 6, se observó que en F1 todas las semillas eran lisas y amarillas con genotipos $AaBb$, es decir que es

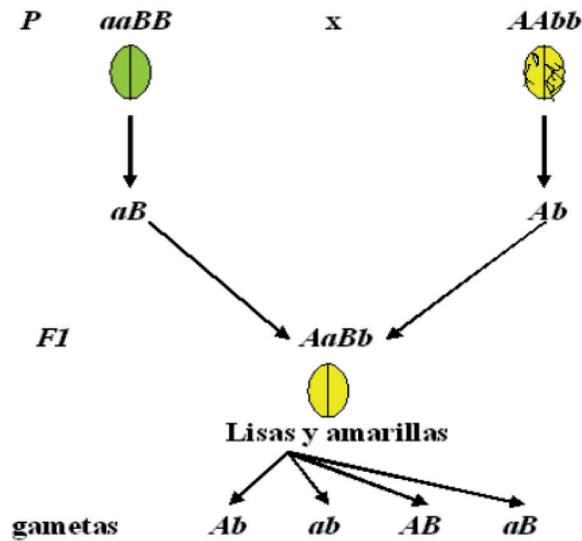


Figura 6: Resultados obtenidos en la primera generación filial (F1) al tomar los caracteres textura y color de las semillas simultáneamente.

homogénea y su fenotipo es el correspondiente a la forma dominante de cada carácter, en este caso liso y amarillo. En F2, Mendel obtuvo las cuatro combinaciones fenotípicas posibles (liso y amarillo, liso y verde, rugoso y amarillo, y rugoso y verde) en proporción 9:3:3:1, tal como lo muestra la Tabla 2.

Analizando primeramente el carácter textura de la semilla, que está compuesta de 423 semillas lisas y 133 semillas rugosas, se puede apreciar que guardan entre sí una relación 3:1. De la misma manera analizando el carácter color de las semillas se observa que 416 semillas son amarillas y 140 verdes, también guardan entre sí una relación 3:1.

Entonces, al considerarse los dos caracteres

Cantidades	Proporciones
315 semillas lisas y amarillas	9
108 semillas lisas y verdes	3
101 semillas rugosas y amarillas	3
32 semillas rugosas y verdes	1
556 semillas en total	16

Tabla 2: Resultados obtenidos en la segunda generación filial (F2) al tomar los caracteres textura y color de las semillas simultáneamente.

simultáneamente, los diferentes fenotipos resultantes deberían guardar entre sí una combinación de las proporciones de cada carácter por separado. Al considerar el carácter textura de la semilla, se tiene que: lisa tiene una probabilidad 3/4 y rugosa 1/4. De la misma manera, en el carácter color de las semillas, amarillo tiene una probabilidad de 3/4 y verde 1/4. Como los genes para distintos caracteres se heredan de forma independiente, se tiene:

$$P(\text{lisa y verde}) = P(\text{liso})P(\text{verde}) = \frac{3}{4} \cdot \frac{1}{4} = \frac{3}{16}$$

$$P(\text{rugosa y amarillo}) = P(\text{rugosa})P(\text{amarillo}) = \frac{1}{4} \cdot \frac{3}{4} = \frac{3}{16}$$

$$P(\text{rugosa y verde}) = P(\text{rugosa})P(\text{verde}) = \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} = \frac{1}{16}$$

Extendiendo este razonamiento a *n* caracteres calculando las probabilidades combinadas de cada caso (Tabla 3).

Tabla 3: Genotipos de la F2 de un cruceamiento *AaBb x AaBb*.

Gametas	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Leyes de Mendel

Las leyes de Mendel son un conjunto de reglas básicas sobre la transmisión por herencia de las características de los organismos de los padres a sus hijos.

Primera ley de Mendel: Ley de la uniformidad de los híbridos de la primera generación filial (F1): Si se cruza una línea pura de arvejas cuya semilla es de color amarilla con otra cuya semilla es de color verde, los individuos de la primera generación filial (F1) son todos uniformes. En este caso se parece a uno de los progenitores, el de la semilla con color amarilla.

Segunda ley de Mendel: Ley de la segregación: Los dos factores (genes) para cada carácter no se mezclan ni se fusionan de ninguna manera, sino que se segregan (separan) en el momento de la formación de los gametos.

Tercera ley de Mendel: Ley de la transmisión independiente: Los genes para distintos caracteres se heredan de forma independiente

Resultados y discusión

Experimentos mendelianos como cadenas de Markov

Los experimentos genéticos mendelianos sobre la base de la libre fertilización, pueden representarse mediante simples modelos de Markov.

Diploide con un solo par de genes

Mendel en sus primeros experimentos estudió el color de las plantas y luego el color de las semillas de las plantas. En ambos casos tomó un solo carácter, las cuales tienen dos tipos de variantes (genes).

Considerando uno de los dos primeros experimentos mendelianos, por ejemplo, el experimento realizado sobre el carácter “color de las semillas”, en la cual las variantes (genes) son “amarillo” al que se le llamó gen dominante (A) y “verde” al que denominó gen recesivo (a). Recordando que en cada generación se pudo notar que era preciso distinguir la constitución genética de un individuo de la expresión visible del mismo (aspecto), es decir su genotipo (homocigota dominante (AA), heterocigota (aA) ó homocigota recesivo (aa)) de su fenotipo (amarillo (A) ó verde (a)). Entonces, el genotipo de las semillas puede ser de un nivel sobre el conjunto de estados posibles

$S = \{AA(\text{estado } 1), aA(\text{estado } 2), aa(\text{estado } 3)\}$
en el tiempo t , con probabilidades de $v_t(1)$, $v_t(2)$ y $v_t(3)$, donde $v_t(1) + v_t(2) + v_t(3) = 1$.

Si X_t es la variable aleatoria que muestra el estado en la que se encuentra el genotipo del

individuo en el tiempo t , la distribución de probabilidad de los estados del proceso cuando evolucione en el tiempo será $V_t = (v_t(1), v_t(2), v_t(3))$, donde $v_t(i) = P(X_t = i)$, $\forall t \in \{1, 2, 3, \dots\}$ y $\Pi^1 = (0, 1, 0)$. Como al principio de su experimento Mendel tomó semillas de colores amarillos y las fecundó con semillas de colores verdes, comenzó este proceso tomando una población fundada en las primeras plantas de heterocigotas y con ello, la distribución de probabilidad inicial viene dada por $\Pi^1 = (0, 1, 0)$.

Por otra parte, Mendel observó que si tomaba una población de plantas con semillas de colores amarillos puras (homocigotas dominantes) y las autofecundaba obtenía siempre plantas con semillas de colores amarillos. De manera análoga, si tomaba una población de plantas con semillas verdes puras obtenía siempre plantas con semillas de colores verdes. Ahora bien, si tomaba una población de plantas heterocigotas la relación de los genotipos era de 1:2:1, con la cual las proporciones genotípi-

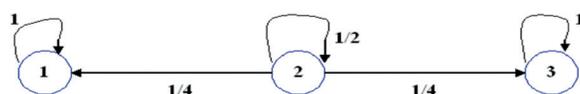


Figura 7: Digrafo de transición (Diploide con un solo par de genes).

cas eran de $1/4$, $1/2$ y $1/4$ (Fig. 7).

Considerando que la segregación cromosómica (distribución de los cromosomas) es al azar y que el tiempo de transición es homogéneo, se puede definir a la matriz de transición de probabilidades de la cadena de Markov para la autofertilización como:

$$P_1 = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 1/4 & 1/2 & 1/4 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Las p_{ij} , $\forall i, j \in \{1, 2, 3\}$, de la matriz de transición de probabilidades de un paso corresponden a la probabilidad de que cada célula realice la transición de un cierto estado j a un cierto estado

j . Es decir, la probabilidad del paso de un cierto genotipo a otro genotipo de un tiempo t a otro tiempo $t+1$. En este proceso de Markov, el estado 2 es transitorio y los estados 1 y 3 son absorbentes. Tomando en cuenta la ecuación (5), la distribución de probabilidad de la variable aleatoria X_{t+1} (de los estados) en el tiempo $t+1$ es:

$$V_{t+1} = \Pi^1 \cdot P^{(t)} = \left(\frac{1}{2} - \left(\frac{1}{2}\right)^{t+1}, \left(\frac{1}{2}\right)^t, \frac{1}{2} - \left(\frac{1}{2}\right)^{t+1} \right) \quad (11)$$

Calculando el límite de V_{t+1} cuando t tiende al infinito, se obtiene:

$$V_{\infty} = \lim_{k \rightarrow \infty} V_k = \left(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2} \right) \quad (12)$$

Resultado que muestra que el proceso será absorbido rápidamente por alguno de los dos estados absorbentes intervinientes en la cadena. Entonces, con la autofertilización, una población se divide en una serie de líneas que rápidamente se vuelven muy homocigótica y que asintóticamente produce la autofecundación de dos genotipos puros, lo que hace que todos los descendientes sean del mismo tipo.

Debido a que en la reproducción incluye tanto la reproducción celular (de una célula madre se obtienen dos células hijas) como la procreación (a partir de dos células de los individuos progenitores, se produce un individuo hijo), se toma un modelo con la fertilización al azar en una población infinita diploide sin superposición entre las generaciones en lugar de la reproducción de individuos del mismo linaje (endogamia), es decir que al mezclarse dos individuos de sexos opuestos (progenitores) de la población en cada paso dan origen a un nuevo ser vivo (hijo) y este nuevo ser vivo hereda un gen de manera aleatoria de cada uno de sus progenitores. El genotipo del hijo es nuevamente de un nivel sobre el espacio de estados $S = \{AA(\text{estado } 1), aA(\text{estado } 2), aa(\text{estado } 3)\}$.

Al concentrarse en uno de los progenitores, por decir el padre, la distribución de probabilidad

inicial está dada por $\Pi^1 = (\pi_1, \pi_2, \pi_3)$, donde $\pi_i = P(X_0 = i) = q_i$ indica la probabilidad de que el individuo padre escoja una madre que tenga como par de genes los correspondientes al estado i , con $i \in \{1, 2, 3\}$. Por otra parte, la probabilidad de que la madre tenga algún gen dominante o recesivo en el estado i está dada por q_{Di} o q_{Ri} . En este modelo, los elementos intervinientes en los cálculos para la obtención de las probabilidades de transición de un paso tienen las siguientes interpretaciones:

- a) Si el padre tiene ambos genes dominantes y escoge a una madre para cruzarse, la probabilidad de que el hijo tenga:
- ambos genes dominantes (AA que se puede simbolizar por D) es:

$$P(D_{t+1}|D_t) = p_{11} = q_1 q_{D1} p_D + q_2 q_{D2} p_D + q_3 q_{D3} p_D$$

$$p_{11} = \pi_1 \cdot 1 \cdot 1 + \pi_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot 1 + \pi_3 \cdot 0 \cdot 1 = \pi_1 + \frac{\pi_2}{2}$$

- un gen dominante y otro recesivo (aA que se puede simbolizar por H) es:

$$P(H_{t+1}|D_t) = p_{12} = q_1 q_{R1} p_D + q_2 q_{R2} p_D + q_3 q_{R3} p_D$$

$$p_{12} = \pi_1 \cdot 0 \cdot 1 + \pi_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot 1 + \pi_3 \cdot 1 \cdot 1 = \frac{\pi_2}{2} + \pi_3$$

- ambos genes recesivos (aa que se puede simbolizar por R) es:

$$P(R_{t+1} | D_t) = p_{13} = 0$$

Como el individuo hereda un gen dominante del padre con probabilidad 1, entonces es imposible que llegue a tener ambos genes recesivos.

- b) Si el padre tiene un gen dominante y el otro recesivo, y escoge a una madre para cruzarse, la probabilidad de que el hijo tenga:

- ambos genes dominantes (D) es:

$$P(D_{t+1}|H_t) = p_{21} = q_1 q_{D1} p_D + q_2 q_{D2} p_D + q_3 q_{D3} p_D$$

$$p_{21} = \pi_1 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} + \pi_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} + \pi_3 \cdot 0 \cdot \frac{1}{2} = \frac{\pi_1}{2} + \frac{\pi_2}{4}$$

• un gen dominante y otro recesivo (H) es:

$$P(H_{t+1}|D_t) = p_{22} = q_1 q_{D1} P_R + q_2 (q_{D2} P_R + q_{R2} P_D) P_D + q_3 q_{R3} P_D$$

$$p_{22} = \pi_1 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} + \pi_2 \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} \right) + \pi_3 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{2}$$

• ambos genes recesivos (R)

$$P(R_{t+1}|H_t) = p_{23} = q_1 q_{R1} P_R + q_2 q_{R2} P_R + q_3 q_{R3} P_R$$

$$p_{23} = \pi_1 \cdot 0 \cdot \frac{1}{2} + \pi_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} + \pi_3 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} = \frac{\pi_2}{4} + \frac{\pi_3}{2}$$

c) Si el padre tiene ambos genes recesivos, y escoge a una madre para cruzarse, la probabilidad de que el hijo tenga

• ambos genes dominantes (D) es:

$$P(D_{t+1}|R_t) = p_{31} = 0$$

Puesto que el individuo hereda un gen recesivo del padre con probabilidad 1, entonces es imposible que llega a tener ambos genes dominantes.

• un gen dominante y otro recesivo (H) es:

$$P(H_{t+1}|R_t) = p_{32} = q_1 q_{D1} P_R + q_2 q_{D2} P_R + q_3 q_{D3} P_R$$

$$p_{32} = \pi_1 \cdot 1 \cdot 1 + \pi_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot 1 + \pi_3 \cdot 0 \cdot 1 = \pi_1 + \frac{\pi_2}{2}$$

• ambos genes recesivos (R)

$$P(R_{t+1}|R_t) = p_{33} = q_1 q_{R1} P_R + q_2 q_{R2} P_R + q_3 q_{R3} P_R$$

$$p_{33} = \pi_1 \cdot 0 \cdot 1 + \pi_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot 1 + \pi_3 \cdot 1 \cdot 1 = \frac{\pi_2}{2} + \pi_3$$

Con los resultados anteriores, la matriz de transición de probabilidades es:

$$P = \begin{pmatrix} \pi_1 + \frac{\pi_2}{2} & \frac{\pi_2}{2} + \pi_3 & 0 \\ \frac{\pi_1}{2} + \frac{\pi_2}{4} & \frac{1}{2} & \frac{\pi_2}{4} + \frac{\pi_3}{2} \\ 0 & \frac{\pi_2}{2} & \frac{\pi_2}{2} + \pi_3 \end{pmatrix}$$

y la distribución de probabilidad de la variable aleatoria X_t (de los estados) en el tiempo t , $\forall t \in \{1, 2, 3, \dots\}$, es:

$$V_t = \Pi^t \cdot P^{(t-1)} = \left(\left(\pi_1 + \frac{\pi_2}{2} \right)^2, 2 \left(\pi_1 + \frac{\pi_2}{2} \right) \left(\frac{\pi_2}{2} + \pi_3 \right), \left(\frac{\pi_2}{2} + \pi_3 \right)^2 \right) \quad (13)$$

Esto nos dice que esta cadena de Markov alcanza ya su condición estable en el tiempo $t=1$, es decir, que con la primera generación de descendientes ya se alcanza el equilibrio entre los genotipos.

Diploide con dos pares de genes independientes

En sus anotaciones Mendel dejó constancia de que también estudió en detalle el diploide con dos y tres pares de genes. En estos estudios dedujo que las elecciones de los gametos de cada carácter en cada generación eran independientes. El caso del diploide con dos pares de genes consiste en tomar los caracteres textura de las semillas cuyas categorías son lisa (A) y rugosa (a), y color de las semillas con categorías amarilla (B) y verde (b), simultáneamente. En el genotipo, las semillas pueden estar según la Tabla 3 en un nivel sobre el siguiente conjunto de estados:

$$S = \{AABB, aABB, aaBB, AAbB, aAbB, aabb, AAbb, aAbb, aabb\}$$

Si X_t es la variable aleatoria que representa el estado sobre la cual se encuentra el genotipo en el instante t , se tendrá que la distribución de probabilidad de los estados de este proceso de autofecundación en el tiempo t será $V_t = (v_t(1), v_t(2), \dots, v_t(9))$, con $i \in \{1, 2, \dots, 9\}$, $t \in \{1, 2, \dots\}$ y $v_t(i) = P(X_t = i)$. En este caso, Mendel notó que si tomaba semillas con líneas puras y las autofecundaba, en la próxima generación todas las semillas eran de la misma línea pura tomada. Además, si consideraba semillas que no eran de líneas puras se daban las siguientes situaciones.

- Si las semillas consideradas tienen genotipos $aABB$ y se autofecundan se tienen tres tipos posibles de genotipos que son: $aaBB$, $aABB$ y $AABB$.

Tabla 4: Genotipos resultantes de un cruzamiento $aABB \times aABB$.

Gametas	<i>aB</i>	<i>AB</i>
<i>aB</i>	<i>aaBB</i>	<i>aABB</i>
<i>AB</i>	<i>aABB</i>	<i>AABB</i>

Tomando en consideración la Tabla 4 se tiene:

$$P(AABB|aABB) = p_{21} = \frac{1}{4}, P(aABB|aABB) = p_{22} = \frac{1}{2}, P(aaBB|aABB) = p_{23} = \frac{1}{4}$$

- Si las semillas consideradas tienen genotipos *AAbb* y se autofecundan se tienen tres tipos posibles de genotipos que son: *AAbb*, *AAbB* y *AABB* (Tabla 5).

$$P(AABB|AAbb) = p_{41} = \frac{1}{4}, P(AAbB|AAbb) = p_{44} = \frac{1}{2}, P(AAbb|AAbb) = p_{73} = \frac{1}{4}$$

Tabla 5: Genotipos resultantes de un cruzamiento $AAbb \times AAbb$.

Gametas	<i>Ab</i>	<i>AB</i>
<i>Ab</i>	<i>AAbb</i>	<i>AAbB</i>
<i>AB</i>	<i>AAbB</i>	<i>AABB</i>

- Si las semillas consideradas tienen genotipos *aAbB* y se autofecundan se tienen nueve tipos posibles de genotipos que son: *aabb*, *aabB*, *aAbb*, *aAbB*, *aaBB*, *aABB*, *AAbb*, *AAbB* y *AABB* (Tabla 6).

$$P(AABB|aAbB) = p_{51} = \frac{1}{16}, P(aABB|aAbB) = p_{52} = \frac{1}{8}, P(aaBB|aAbB) = p_{53} = \frac{1}{16}$$

$$P(AAbb|aAbB) = p_{54} = \frac{1}{8}, P(aAbb|aAbB) = p_{55} = \frac{1}{8}$$

$$p_{55} = \frac{1}{4}, P(aaBB|aAbB) = p_{56} = \frac{1}{8}$$

$$P(AAbb|aAbB) = p_{57} = \frac{1}{16}, P(aAbb|aAbB) =$$

$$p_{58} = \frac{1}{8}, P(aabb|aAbB) = p_{59} = \frac{1}{16}$$

Tabla 6: Genotipos resultantes de un cruzamiento $aAbB \times aAbB$.

Gametas	<i>ab</i>	<i>aB</i>	<i>Ab</i>	<i>AB</i>
<i>ab</i>	<i>aabb</i>	<i>aabB</i>	<i>aAbb</i>	<i>aAbB</i>
<i>aB</i>	<i>aabB</i>	<i>aaBB</i>	<i>aAbB</i>	<i>aABB</i>
<i>Ab</i>	<i>aAbb</i>	<i>aAbB</i>	<i>AAbb</i>	<i>AAbB</i>
<i>AB</i>	<i>aAbB</i>	<i>aABB</i>	<i>AAbB</i>	<i>AABB</i>

- si las semillas consideradas tienen genotipos *aabb* y se autofecundan tendremos tres tipos posibles de genotipos que son: *aabb*, *aabB* y *aABB* (Tabla 7).

$$P(aabb|aabb) = p_{63} = \frac{1}{4}, P(aabB|aabb) =$$

$$p_{66} = \frac{1}{2}, P(aabb|aabb) = p_{69} = \frac{1}{4}$$

Tabla 7: Genotipos resultantes de un cruzamiento $aabb \times aabb$.

Gametas	<i>ab</i>	<i>aB</i>
<i>ab</i>	<i>aabb</i>	<i>aabB</i>
<i>aB</i>	<i>aabB</i>	<i>aaBB</i>

- si las semillas consideradas tienen genotipos *aAbb* y se autofecundan tendremos tres tipos posibles de genotipos que son: *aabb*, *aAbb* y *AAbb* (Tabla 8).

Tabla 8: Genotipos resultantes de un cruzamiento $aabB \times aAbb$.

Gametas	ab	Ab
ab	$aabb$	$aAbb$
Ab	$aAbb$	$AAbb$

$$P(AAbb | aAbb) = p_{87} = \frac{1}{4}, P(aAbb | aAbb) = p_{88} = \frac{1}{2}, P(aabb | aAbb) = p_{89} = \frac{1}{4}$$

Como al inicio del estudio del diploide con dos pares de genes, se cruzó las líneas puras liso y verde cuyos genotipos eran $AAbb$ con líneas puras rugoso y amarillo con genotipos $aabb$, obteniendo en F1 semillas lisas y amarillas con genotipos $aAbb$, se tiene que la distribución inicial del proceso está dada por $\Pi^2 = (0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0)$.

Al igual que en el caso del diploide con un solo par de genes, considerando que la distribución de los cromosomas es al azar, que las elecciones de los genes de carácter a carácter son independientes y que el tiempo de transición es homogéneo, se obtiene el dígrafo de transición mostrado en la Fig. 8 y la matriz de probabilidades de transición está dada por P_2 . En esta cadena de Markov los estados 1, 3, 7 y 9 son absorbentes, y los demás estados son transitorios. Realizando un procedimiento análogo al caso del diploide con un par de genes, y teniendo en cuenta el caso límite $V_\infty = \left(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}\right)$ y que

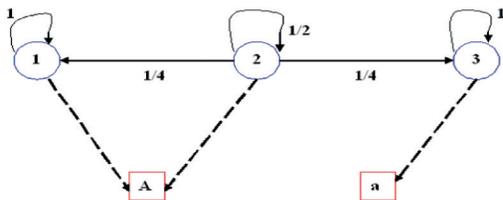


Figura 8: Modelo gráfico del Diploide con un solo par de genes.

$0 = (0, 0, 0)$, se obtiene:

$$V_t^2 = \left(\frac{1}{4} - \frac{2^t - 1}{4^t}, \frac{2^{t-1} - 1}{2^{2t-1}}, \frac{1}{4} - \frac{2^t - 1}{4^t}, \frac{2^{t-1} - 1}{2^{2t-1}}, \frac{1}{4^{t-1}}, \frac{2^{t-1} - 1}{2^{2t-1}}, \frac{1}{4} - \frac{2^t - 1}{4^t}, \frac{2^{t-1} - 1}{2^{2t-1}}, \frac{1}{4^{t-1}} \right) \quad (14)$$

$$V_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} V_t^2 = \left(\frac{1}{4}, 0, \frac{1}{4}, 0, 0, 0, \frac{1}{4}, 0, \frac{1}{4} \right) = \frac{1}{2} (V_\infty, 0, V_\infty) \quad (15)$$

Según el resultado obtenido, esta cadena markoviana será absorbida por alguno de los estados absorbentes intervinientes y, la población de semillas será rápidamente homogénea. Por lo tanto, la forma de dicha población corresponderá a alguna de las cuatro líneas puras tomadas.

Diploide con k pares de genes

Al analizar el diploide con k pares de genes todos independientes, se tiene que los genotipos pueden estar sobre un total de 3^k estados. La matriz de probabilidades de transición de este proceso markoviano es de orden $3^k \times 3^k$ y estará dada por:

$$P_k = \begin{pmatrix} P_{k-1} & O & O \\ \frac{1}{4} P_{k-1} & \frac{1}{2} P_{k-1} & \frac{1}{4} P_{k-1} \\ O & O & P_{k-1} \end{pmatrix}$$

siendo P_{k-1} la matriz de probabilidades de transición de orden $3^{k-1} \times 3^{k-1}$ que se obtiene en el caso del diploide con $k-1$ pares de genes y O es la matriz nula de orden $3^{k-1} \times 3^{k-1}$. La distribución inicial será $\Pi^k = (0, \dots, 1, \dots, 0)$ en dirección del eje $\frac{3^{k+1}}{2}$, con $\Pi^k \in \mathbb{R}^{3^k}$.

Al realizar procedimientos análogos a los anteriores para cada $k \in \{3, 4, 5, 6, 7\}$ se obtiene que

la distribución límite está dada por:

$$V_{\infty}^k = \frac{1}{2} \left(V_{\infty}^{k-1}, 0, V_{\infty}^{k-1} \right) \quad (16)$$

donde V_{∞}^{k-1} es la distribución límite para el caso del diploide con $k-1$ pares de genes independientes uno del otro.

Experimentos mendelianos como cadenas de Markov

Mendel, mediante experimentos, dedujo que era preciso distinguir la constitución genética (genotipo) de un individuo de su característica visible (fenotipo). Este hecho muestra que en los experimentos mendelianos interviene un proceso visible consistente en los fenotipos observados en los individuos en cada generación y un proceso oculto basado en los genotipos de los individuos en cada generación.

Modelo HMM para el diploide con un solo par de genes

En la sección anterior, se ha visto que el proceso oculto es una cadena de Markov con espacio de estados $S = \{AA(\text{estado } 1), aA(\text{estado } 2), aa(\text{estado } 3)\}$, matriz de transición de probabilidades de un paso

$$\mathbf{A}_1 = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 1/4 & 1/2 & 1/4 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

y distribución de probabilidad inicial $\boldsymbol{\Pi}_1 = (0, 1, 0)$.

El proceso visible consiste en un proceso estocástico con dos estados, los fenotipos “color amarillo (A)” y color “verde (a)”. Para determinar la probabilidad de que se observe el fenotipo k dado que el individuo se tiene genotipo del tipo i , $b_i(k)$, $\forall i \in \{1, 2, 3\}$ y $\forall k \in \{a, A\}$ se sigue el siguiente procedimiento:

- Si el individuo se encuentra en el estado 1, su genotipo es homocigota dominante (AA), las

plantas con semillas de color amarilla siempre dan semillas de color amarilla y por lo tanto, $b_1(A)=1$ y $b_1(a)=0$.

- Si el individuo se encuentra en el estado 2, su genotipo es heterocigota (aA), entonces, las semillas se verán de color amarilla debido a que este color amarillo (A) es dominante y por lo tanto, $b_1(A)=1$ y $b_1(a)=0$.
- Si el individuo se encuentra en el estado 3, su genotipo es homocigota recesivo (aa), las plantas con semillas de color verde siempre dan semillas de color verde y por lo tanto, $b_1(A)=0$ y $b_1(a)=1$.

Del procedimiento anterior, la matriz de probabilidades de emisión de las observaciones está dada por:

$$\mathbf{B}_1 = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

y el modelo oculto de Markov obtenido queda totalmente especificada por el conjunto de parámetros $\lambda = (\mathbf{A}_1, \mathbf{B}_1, \boldsymbol{\Pi}_1)$.

Modelo HMM para el diploide con dos pares de genes independientes

Mendel al considerar los caracteres textura y color de las semillas obtuvo nueve tipos diferentes de genotipos y cuatro de fenotipos, por lo que el proceso oculto, consistente en la autofecundación de las semillas en su genotipo, es una cadena de Markov con espacio de estados S compuesto por los estados $AABB(1)$, $aABB(2)$, $aaBB(3)$, $AAbB(4)$, $aAbB(5)$, $aabB(6)$, $AAbb(7)$, $aAbb(8)$ y $aabb(9)$ (Fig. 9), distribución inicial $\boldsymbol{\Pi}_2 = (0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0)$

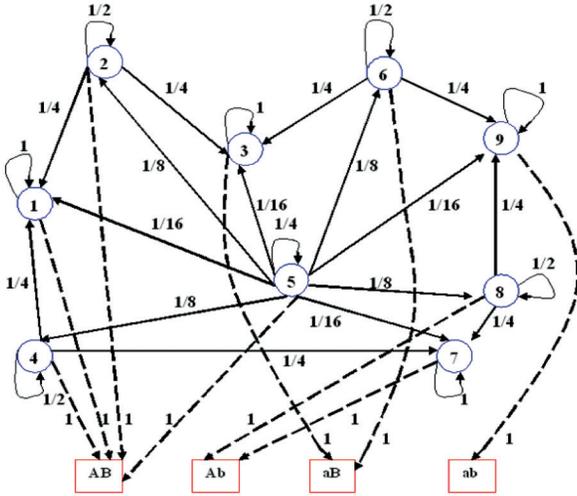


Figura 9: Modelo gráfico del Diploide con dos pares de genes independientes.

y matriz de probabilidades de transición

$$A_2 = \begin{pmatrix} A_1 & 0 & 0 \\ \frac{1}{4}A_1 & \frac{1}{2}A_1 & \frac{1}{4}A_1 \\ 0 & 0 & A_1 \end{pmatrix}$$

En el proceso observable tenemos cuatro categorías que constituyen los tipos posibles de fenotipos que se observan en cada generación filial. Estas categorías son: liso y amarillo (AB), liso y verde (Ab), rugoso y amarillo (aB), rugoso y verde (ab). Considerando los genes dominantes liso (A) y amarillo (B) en los caracteres textura y color de las semillas respectivamente, se procede a formar la matriz de probabilidades de emisión de observaciones y con ello, verificar que observaciones podrán emitir los estados del proceso oculto. En primer lugar, si el proceso oculto se encuentra en los estados $AABB, aABB, AAbb$ y $aAbb$ con probabilidad 1 se observan semillas lisas y amarillas (AB). Por otro lado, si se consideran los estados $AAbb$ y $aAbb$ se tendrán semillas lisas y verdes (Ab). En el caso del estado $aabb$ se tienen semillas rugosas y verdes (ab). Finalmente, estando en los estados $aaBB$ y $aabb$ se verán semillas rugosas

y amarillas (aB). Con estos resultados, se tiene:

$$B_2 = \begin{pmatrix} 1 & 00 & 0 \\ 1 & 00 & 0 \\ 0 & 01 & 0 \\ 1 & 00 & 0 \\ 1 & 00 & 0 \\ 0 & 01 & 0 \\ 0 & 10 & 0 \\ 0 & 10 & 0 \\ 0 & 00 & 1 \end{pmatrix}$$

El modelo oculto de Markov obtenido, bajo estas condiciones, queda totalmente especificada por el conjunto de parámetros $\lambda = (A_2, B_2, \Pi_2)$.

Conclusiones

Según las revisiones de los trabajos de reseña analizados, Mendel no tenía ningún conocimiento anterior de la naturaleza dual de los genes, pero a través de una serie de experimentos en el jardín de su convento pudo detectar la presencia de gen oculto y nombrarlo “Elemente”. La genética mendeliana se refiere a la transmisión de los rasgos biológicos discretos de una generación a otra y los modos de expresión de los genes.

La estadística y la teoría de probabilidad, constituyen las piezas fundamentales en la formación del marco teórico de los modelos ocultos de Markov. Bajo este contexto, la matemática proporciona las herramientas necesarias para el planteamiento de soluciones a los distintos problemas que se presentan al momento de la formulación de un modelo oculto de Markov.

La matemática y las leyes de la uniformidad de los híbridos de la primera generación filial, de la segregación y de la transmisión independiente constituyen los principales pilares en la formulación de los distintos modelos de Markov aplicados a los experimentos mendelianos. En este sentido, mediante cadenas de Markov y cadenas ocultas de Markov, considerando una cierta cantidad de genes, se han

estudiado y modelado los experimentos genéticos mendelianos sobre la base de la libre fertilización obteniéndose muy buenos resultados.

En la formulación de la cadena de Markov realizada sobre un par de genes, se ha podido constatar que el proceso será absorbido rápidamente por alguno de los dos estados absorbentes intervinientes. Entonces, con la autofertilización, una población se divide en una serie de líneas que rápidamente se vuelven muy homocigóticas y asintóticamente, ésta produce la autofecundación de dos genotipos puros lo que hace que todos los descendientes sean del mismo tipo. En el caso del diploide con dos pares de genes independientes, el proceso será absorbida por alguno de los cuatro estados absorbentes intervinientes y la población de semillas será de la forma correspondiente a alguna de estas cuatro líneas puras.

Por su parte, en la formulación de los modelos ocultos de Markov realizada sobre los casos del diploide con un solo par de genes y el de dos pares de genes independientes se ha podido constatar que quedan totalmente especificados por el conjunto de parámetros; matriz de probabilidades de transición **A**, matriz de probabilidades de emisión de observaciones **B** y distribución inicial **Π** .

Con todo lo expresado, se ha podido comprobar que, mediante el uso del álgebra, del cálculo, la teoría de probabilidad y las tres leyes de Mendel se puede aplicar de manera satisfactoria y eficiente la teoría de Markov, sobre la base de la libre fertilización, en el campo de la biología.

Agradecimientos

Al Altísimo, dueño eterno del reino, del poder y la gloria desde que el tiempo no tenía memoria. A este Divino Creador, cuya fuente de luz y de fuerza me impulsa a seguir adelante y me levanta cuando tropiezo por los caminos de la vida.

A mis padres y a mi amada familia por el apoyo de siempre. En especial a mi abuela Avelina por haberme guiado desde siempre por el largo sendero de la vida, a Francisca Ofelia, mis hijas Jessica Larissa y Lisset Fiorella, y mis hermanas Máxima y Nancy por el apoyo y confianza incondicional de siempre

para el logro de mis metas y seguir mis ideales.

A la Dra. Ana Georgina Flesia por su orientación, paciencia y comprensión durante la realización de esta investigación.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

- Bilmes, J.A. (1997). Gentle tutorial on the em algorithm and its application to parameter estimation for gaussian mixture and hidden Markov models. *International Computer Science Technical Report*, 21: i + 13 pp.
- Breiman, L. (1992). *Probability*. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics. *Classics in applied mathematics*, 7: 435 pp.
- Forney, G. (1973). The viterbi algorithm. *Proceedings of the IEEE*, 61(3): 263–278.
- Thorvaldsen, S. (2005). A tutorial on Markov models based on Mendel's classical experiments. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 3(6): 1441–1460.
- Krogh, A., Brown, M., Mian, I.S., Sjölander, K. & Haussler, D. (1994). Hidden Markov models in computational biology: applications to protein modeling. *Journal of Molecular Biology*, 235(5): 1501–1531.
- Juang, B.H. & Rabiner, L.R. (1990). The segmental k means algorithm for estimating the parameters of hidden Markov models. *IEEE Transactions in Acoustics, Speech and Signal Processing*, 38(9): 1639–1641.
- Cappé, O., Moulines, E. & Ryden, T. (2007). *Inference in hidden Markov models*. New York: Springer Verlag. *Springer Series in Statistics*. xvii + 653 pp.
- Rabiner, L.R. & Juang, B.H. (1986). An introduction to hidden Markov models. *IEEE ASSP Magazine*, 3(1): 4–15.
- Rabiner, L.R. (1989). A tutorial on hidden Markov models and selected publications in speech recognition. *Proceedings of the IEEE*, 77(2): 257–286.

Perfil fitoquímico y actividad biológica *in vitro* del extracto crudo etanólico y fracciones de las raíces de *Eryngium horridum* Malme, del departamento de Cordillera, Paraguay

Phytochemical profile and *in vitro* biological activity of the crude ethanol extract and root fractions of *Eryngium horridum* Malme, from the department of Cordillera, Paraguay

Elsa Beatriz Cárdenas^{1,*}, Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki² & Francisco Paulo Ferreira³.

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Efluentes. San Lorenzo, Paraguay.

²Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Laboratório de Doenças Parasitárias, Curitiba, Brasil.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales. San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: elsacardenas74@gmail.com.

Resumen: *Eryngium horridum*, es una especie vegetal que ha tenido estudios como maleza, pero con escasa información dentro del contexto de investigaciones fitoquímicas o actividades biológicas de la misma, pero sí del género *Eryngium*. Esta especie es utilizada en la medicina popular como antiinflamatoria en infusión, especialmente las raíces y hojas. El objetivo de este trabajo fue trazar el perfil fitoquímico del extracto de raíces de la especie *Eryngium horridum* Malme, que se encuentra en el departamento de Cordillera, Paraguay, evaluando además su eficacia frente a bioensayos específicos buscando su potencial farmacológico. Para ello, se secaron las raíces, se trituraron y sometieron a maceración con etanol al 96%. Luego se llevó a cabo el perfil fitoquímico del extracto crudo y de las fracciones solubles en diferentes solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetona y metanol), se realizó el perfil cromatográfico en GC-MS, los fenoles totales y actividad biológica como actividad antimicrobiana, antioxidante y hemolítica. Según resultados obtenidos, se verificó la presencia de compuestos como aldehídos, fenoles, lactonas, entre otros. La fracción soluble en acetona (E3) mostró un valor de 160,6 mg GAE.g⁻¹ de fenoles totales. En cuanto a las actividades biológicas, se mostró capacidad inhibitoria ante 9 de las 10 cepas utilizadas, cuyo mayor porcentaje de actividad fue de 70,10% con la *Pseudomonas aeruginosas*, un poder antioxidante de 20,49% con el método de DPPH, y una actividad hemolítica de 97,8% en la fracción soluble en acetona (E3). Podemos concluir que la especie estudiada presenta metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana, antioxidante y hemolítica.

Palabras clave: *Eryngium horridum*, extracto etanólico, actividad antioxidante, fenoles totales, hemólisis.

Abstract: *Eryngium horridum*, is a plant species that has had studies as a weed, but with little information within the context of phytochemical investigations or biological activities of the same, but the genus *Eryngium*. This species is used in popular medicine as an anti-inflammatory infusion, especially the roots and leaves. The objective of this work was to trace the phytochemical profile of the root extract of the species *Eryngium horridum* Malme, which is found in the department of Cordillera, Paraguay, also evaluating its efficacy against specific bioassays looking for its pharmacological potential. For this, the roots were dried, crushed and subjected to maceration with 96% ethanol. Then the phytochemical profile of the crude extract and the soluble fractions in different solvents (petroleum ether, dichloromethane, acetone and methanol) was carried out, the chromatographic profile was carried out in GC-MS, the total phenols and biological activity as antimicrobial activity, antioxidant and hemolytic. According to the results obtained, the presence of compounds such as aldehydes, phenols, lactones, among others, was verified. The fraction soluble in acetone (E3) showed a value of 160.6 mg GAE.g⁻¹ of total phenols. Regarding the biological activities, inhibitory capacity was shown against 9 of the 10 strains used, whose highest percentage of activity was 70.10% with *Pseudomonas aeruginosas*, an antioxidant power of 20.49% with the DPPH method, and a hemolytic activity of 97.8% in the acetone-soluble fraction (E3). We can conclude that the species studied presents secondary metabolites, antimicrobial, antioxidant and hemolytic activity.

Keywords: *Eryngium horridum*, ethanolic extract, antioxidant activity, total phenols, hemolysis.

Introducción

Las bases científicas para el uso eficiente y seguro

de las plantas medicinales están relacionadas a los resultados de las investigaciones realizadas con las

Editor responsable: Nery López Acosta*

Recibido: 04/04/2023

Aceptado: 07/02/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

mismas, en estudios preclínico y/o clínico. Considerando que las plantas son organismos que poseen un complejo fitoquímico constituido por las más diversas clases de activos vegetales y que son utilizados en medicina popular, medicina tradicional china (MTC), medicina ayurveda y muchas otras terapias, es importante señalar que su origen natural no los hace inofensivos. Su composición química puede actuar sobre el mecanismo fisiológico o patológico del organismo, para corregirlo o alterarlo, por lo tanto, podría ocasionar un efecto farmacológico que resulte terapéutico o por el contrario cause una reacción adversa (Soria, 2018).

Las principales causas de decesos en el mundo, con arreglo al número total de vidas perdidas, se atribuyen a tres grandes cuestiones: las enfermedades cardiovasculares (cardiopatías isquémicas, accidentes cerebrovasculares), las enfermedades respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones de las vías respiratorias inferiores) y las afecciones neonatales, que abarcan la asfixia y el traumatismo en el nacimiento, la septicemia e infecciones neonatales y las complicaciones del parto prematuro (OMS, 2020).

El consumo de plantas medicinales y aromáticas en el Paraguay es tradicional y generalizado. Es una costumbre que viene de los guaraníes, que con su gran convivencia y experiencia tuvieron una noción extensa del uso y de las propiedades de las plantas nativas y así hicieron de ello una aplicación apropiada para la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades que afectan al hombre (Fretes, 2010).

Existe un progresivo interés terapéutico en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente procedentes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas es debida principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (Hernández Villarreal, 2020).

Se estima que el 25% de los fármacos de uso frecuente contienen compuestos aislados de plantas, cifra que acrecienta si se incluyen fármacos modificados a partir de prototipos naturales. Además, se estima entre 300.000 y 500.000 especies de plantas

que existen en todo el mundo y solo el 15% de estas han sido estudiadas por el campo de la Fitoquímica y el 6% por la Farmacología, por tanto, es factible creer que muchos fármacos derivados de plantas todavía faltan por descubrirse, incluidos los destinados al tratamiento de enfermedades tumorales (Foresto *et al.*, 2021).

La Familia Apiaceae es muy conocida entre las plantas superiores (angiospermas), pero la especie *Eryngium horridum* Malme, que es una planta herbácea, perenne, nativa, perteneciente a ésta familia, de los cuales aún no existen publicaciones sobre la identificación y descripción de compuestos activos en la especie ni sobre su uso en terapia, es por ello que este trabajo tiene como objetivo a evaluar la actividad biológica y el perfil fitoquímico de las



Figura 1. Aspecto de la planta de *Eryngium horridum*. Inflorescencia (arriba) y hojas (abajo).

raíces de ésta especie y establecer su posible uso terapéutico.

Eryngium es probablemente el género más grande (200-250 especies) y más distintivo de la familia, con su aspecto comúnmente parecido a un cardo. El género es esencialmente cosmopolita, aunque tiende a evitar el este de Asia, la zona tropical y Sudáfrica (Flora Panamá, 1980). Entre las especies de éste género en estudio se encuentra el *Eryngium horridum* (Figura 1).

Materiales y métodos

Muestreo: Las raíces de la especie *Eryngium horridum* Malme, de la familia Apiaceae, fueron recolectadas en plena inflorescencia en el mes de setiembre del año 2021, en el Departamento de Cordillera de la ciudad de Arroyos y Esteros, Compañía Isla Guazú, Barrio Iturbe cuyas coordenadas fueron 25.07480556S 57.05655556W, en una zona árida con sotobosques de malva y Solanaceae (ñoati pytã).

Identificación Taxonómica y Caracterización

Vegetal: La identificación taxonómica del material vegetal fue realizada en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), por la Lic. Fátima Piris da Motta en conjunto con el Lic. Medes Mendoza. Para la determinación del género *Eryngium* (colecta N°01), se utilizó claves de identificación taxonómica mencionadas en el tomo IV de la Flora de la Provincia de Buenos Aires (1965) el espécimen fue comparado con exiccatas de herbarios del Catálogo de Plantas Vasculares del Conosur en su versión on-line (2022), de donde también se obtuvo información de la distribución de la especie y el nombre actualmente aceptado. Esta especie colectada fue depositada en el Herbario de la FACEN para referencia adicional bajo la identificación FACEN N°4979.

Elaboración del extracto: La preparación del extracto crudo etanólico de *Eryngium horridum* Malme, fue realizada con las raíces secas, libres de hojas, (incluyó a toda la raíz: principal, secundaria etc.), las mismas fueron lavadas y extendidas en bandejas de plástico para secarlas a la sombra bajo un flujo de aire natural y una temperatura ambiente

promedio de aproximadamente 30°C durante 5 días, para completar el secado total se utilizó una estufa de secado a 40°C. Se efectuó la maceración exhaustiva de 477 g de material triturado homogéneo con etanol al 96% en frío y agitación manual diaria.

Fraccionamiento y Ensayos de Compuestos

Presentes: Se realizó la extracción fraccionada de compuestos del extracto bruto con los siguientes solventes: éter de petróleo, diclorometano, acetona y metanol. El extracto crudo (5,8610 g) se trató con 4 porciones de 50 mL del solvente Éter de petróleo. Se sonicó por 15 minutos, luego 15 minutos de agitación manual. Se transfirió el sobrenadante a otro recipiente limpio y seco, en el cual se unificaron las 4 porciones de 50 mL, haciendo un total de 200 mL, posteriormente se llevó a sequedad. El residuo se trató de la misma manera con el diclorometano, y de la misma manera con la acetona y metanol.

Pruebas Cualitativas: Las pruebas han sido realizadas con el extracto crudo (Ec) etanólico y con cada una de las fracciones obtenidas (E1, E2, E3 y E4). Fueron ensayados algunos metabolitos como Triterpenos y Esteroles (Prueba de Libermann-Buchard según Ramya *et al.*, 2019). Saponinas siguiendo el ensayo de espuma desarrollada en Castro *et al.*, (2011). Identificación de Flavonoides (prueba de Shinoda según Valencia *et al.*, (2017), prueba de ácido sulfúrico concentrado según Rodríguez *et al.*, (2011), prueba de clorhidrato de zinc según Ramya *et al.*, (2019). Sesquiterpenlactonas - Cumarinas la prueba de Baljet, según Castro *et al.*, (2011). Para Taninos se siguió las metodologías de Gelatina/sal y del Cloruro férrico desarrolladas por Ramya *et al.*, (2019). Alcaloides (Ensayo de Mayer, Castro *et al.*, (2011), Método de Dragendorff, Valencia *et al.*, (2017), Prueba de Wagner, Ramya *et al.*, (2019)).

Cuantificación de compuestos fenólico totales: El ensayo de fenoles totales se realizó por el método Folin-Ciocalteu, siguiendo el de García Martínez *et al.*, (2015), con algunas adaptaciones. Se preparó una curva de calibración con 5 patrones (1,0; 2,0; 4,0; 8,0 y 16,0) mg. L⁻¹ de Ácido Gálico en metanol partiendo de una solución madre de 1.000 mg. L⁻¹. El Extracto crudo (Ec) y las fracciones obtenidas anteriormente (E1, E2, E3 y E4)

se realizaron por triplicado con diluciones acorde a las lecturas arrojadas de la curva de calibrado. La lectura se realizó en un Espectrofotómetro UV-Visible marca Thermo Génesys 20S

Cromatografía en capa fina. Se realizaron eluciones utilizando como fase estacionaria placas de Sílica Gel 60 F254 y como fase móvil Tolueno: Acetato de etilo (7:3) y Tolueno: Acetona (7:3). Se empleó una cámara cromatográfica de vidrio de 21,5 cm de altura, 23 cm x 6 cm en el área de la base y en la cara superior. Se trabajó en campana de gases y a temperatura ambiente (25°C). El tiempo de saturación se estimó de 15-20 minutos. Los métodos de revelado fueron, de manera física con luz UV a 254 nm (lámpara mini UV MG/WM), y de manera química con Dragendorff + calor, cloruro férrico (FeCl₃), ácido sulfúrico al 50 % en metanol + vainillina al 1 % en metanol, Anisaldehído – sulfúrico (Heras et al., 2017).

Análisis de estructuras por cromatografía (GC/MS): Los perfiles de compuestos de las diferentes fracciones se determinaron mediante un equipo de cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas marca Shimadzu QP 2010 SE PLUS. El análisis se realizó en un sistema equipado, utilizando una columna SLB - 5ms (30 m × 0,25 mm, espesor de película de 0,25 µm). El volumen de inyección utilizado fue de 1 µL y la temperatura del inyector de 270 °C con el modo de inyección Splitless, con una relación de división de 10:1. El helio fue el gas portador con un caudal de 1,0 ml min⁻¹ (modo de flujo constante). Programa de Separación de Columna: Horno inicial a 150 °C por 1 min, luego a razón de 3°C hasta 300°C, a razón de 3°C y 300°C por 14 min. Volumen de inyección 1µL.

Prueba de Actividad Antioxidante: Fue realizada primeramente una curva de calibración utilizando como patrón al ácido Ascórbico. Para los patrones de comparación, se preparó una solución Stock de 1 mg. mL⁻¹ de Ácido Ascórbico. A partir de ésta se preparó matraces de concentración que fueron de 0 a 100 µg. mL⁻¹.

Según el método descrito por Brand-Williams, Cuvelier & Berset, (1995), se preparó la solución

de extracto a ensayar y de las fracciones obtenidas, de 100 mg. L⁻¹ en metanol. Fue adicionado a un tubo de ensayo 100 µL de la solución de muestra y 3,9 mL de solución de radical DPPH• en metanol de concentración 0,02 mg. mL⁻¹. Se homogenizó cuidadosamente y se mantuvo en oscuridad durante 1 hora. Posteriormente las lecturas de absorbancia se realizan a 517 nm en un espectrofotómetro UV/VIS marca Thermo Genesys 20S. Los resultados se expresaron como mg de Ácido Ascórbico.g⁻¹ de cada extracto; los valores se presentaron como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (SD).

Actividad Hemolítica: Éste ensayo fue llevado acabo se acuerdo a lo establecido en Rocha *et al.*, (2012).

Preparación de la muestra de sangre: Se extrajo 5 mL de sangre humana donado por un voluntario y se mezcló con 5 mL de solución anti-coagulante Alsever (2,05 g Dextrosa + 0,8 g Citrato trisodico + 0,055 g Ácido Cítrico + 0,42 g Cloruro de Sodio para 100 mL). La sangre total heparinizada se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min en una centrífuga marca HERMLE modelo Z-206 A; se eliminó el sobrenadante con cuidado, luego se lavó los eritrocitos con 1 mL de tampón PBS (0,8 g de cloruro de sodio + 0,002g de cloruro de potasio + 0,144 g de fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) + 0,024 g de fosfato biácido de potasio (KH₂PO₄) para 80 mL de agua estéril. Se ajustó el pH a 7,4 con ácido clorhídrico y completó el volumen a 100 mL) y se centrifugó a 1500 rpm por 15 minutos, se eliminó de nuevo el sobrenadante. Se repitió la operación otras 3 veces más. Luego se tomó 2 mL de los eritrocitos, se colocó en un matraz de 100 mL con tampón PBS, para ser utilizado posteriormente.

Determinación espectrofotométrica de la actividad hemolítica: Del extracto crudo (Ec) y las fracciones obtenidas (E1, E2, E3 y E4): Se pesó 0,1 gramos del extracto crudo en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregó 10 mL de etanol absoluto, se llevó al sonicador por 30 minutos y luego a volumen con tampón PBS pH 7,4 obteniéndose una concentración de 1.000 µg. mL⁻¹.

Se ensayaron diluciones seriadas del extracto

crudo Ec, y las fracciones de Éter de petróleo (E1), Diclorometano (E2), Acetona (E3) y Metanol (E4) disueltos en Buffer PBS a partir de una muestra de 1.000 µg/mL, etiquetadas debidamente para evitar confusiones.

Se transfirió 2 mL de la muestra en el tubo de ensayo, al cual se le añadió 2 mL de la solución de eritrocito. Se homogeneizó suavemente y se dejaron reposar por 1 hora en la estufa a 37°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm y se procedió a la medición espectrofotométrica de la absorbancia de la solución sobrenadante de cada uno de los tubos a una longitud de onda de 540 nm. La actividad hemolítica se informó en porcentaje de Hemólisis (% Hem.). Como control positivo se utilizó 2 ml de solución al 2% de carbonato de sodio disuelto en tampón PBS. Como control negativo se empleó 2 mL de solución tampón PBS

Actividad Antimicrobiana. Ensayo de Dilución en Microplaca: El ensayo fue realizado siguiendo la metodología descrita por Andrews (2001) con modificaciones. Las cepas microbianas fueron proveídas por el laboratorio de Micología-LAREV de FACEN, conservadas mediante congelación a -70 °C y mediante el sistema de conservación de cultivos bacterianos Cryobank a 4°C. Para el estudio de la actividad antimicrobiana se utilizó los siguientes microorganismos (Cepas bacterianas): *Escherichia coli* WDCM 00012, *Salmonella enterica* WDCM 00031, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00026, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705, *Enterococcus faecalis* WDCM 00087, *Staphylococcus epidermidis* WDCM 00036 y *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Micrococcus luteus* ATCC4698, *Bordetella bronchiseptica* ATCC19395.

Las cepas de referencia fueron activadas en medio sólido (Agar Mueller–Hinton) mediante la técnica de estrías cruzadas e incubadas de forma invertida durante 24 h a 37 °C en una estufa. Asimismo, se verificó la viabilidad de cada uno de los microorganismos realizando repiques de 18 a 24 h de cultivo. Para su conservación los microorganismos se mantuvieron refrigerados a 4 °C en placas con medio sólido hasta utilizarlos en las pruebas.

Se utilizó como control positivo: Meropenem

(50 mg. mL⁻¹) para bacterias Gram negativas y Ciprofloxacina (25 mg. mL⁻¹) para bacterias Gram positivas. Como control negativo agua purificada.

Preparación del inóculo microbiano (Figura 2).: De un cultivo bacteriano puro de 18 h de



Figura 2. Ensayo de Actividad Antimicrobiana del extracto de *Eryngium horridum*.

crecimiento en placa de Agar Mueller–Hinton (MHA), se seleccionó 3 a 5 colonias bien aisladas y se resuspendió en un tubo con 5 mL de Caldo Müeller-Hinton (CMH), se agitó y ajustó la turbidez a 0,5 McFarland (108 UFC/mL). Dentro de los 15 minutos al ajuste de turbidez, se realizó diluciones seriadas de 1:10 (1 mL de suspensión en 9 mL de caldo) hasta alcanzar una concentración de 10^6 UFC/mL. La última dilución se utilizó para inocular los pocillos.

Ensayo de efectividad antimicrobiano: El inóculo se adicionó dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo con la solución del extracto (1000 µg/mL) se inoculó con 100 µL de la suspensión bacteriana, obteniendo un volumen final por pocillo de 200 µL y una dilución 1:2 de las concentraciones bacterianas (5×10^4 UFC/mL), extracto y dimetilsulfóxido (DMSO) 5%.

Se incluyó en la microplaca los siguientes controles: (1) Control de crecimiento (control negativo): caldo con 5% de DMSO más inóculo; (2) Control de inhibición (control positivo): caldo con antibiótico más inóculo; (3) Control de esterilidad: caldo sin inocular. Luego se tapó para evitar la deshidratación durante la incubación por 16 horas

a 37 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de la incubación, se midió la absorbancia con un lector de microplacas (Elisa SPR-960) a 620 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

Resultados y discusión

Extracto Bruto: Del total de raíz colectada (477 g) se obtuvo 69,642g de extracto crudo etanólico equivalente a 14,6% p/p a partir de una maceración en frío con etanol al 96%. De la partición con Solventes a partir del extracto crudo se obtuvieron 2,859g de extracto soluble en éter de petróleo (E1), 0,2578g de extracto soluble en diclorometano (E2) y 0,2144g de extracto soluble en acetona (E3) y 1,6694g de extracto soluble en metanol (E4).

Ensayo Cualitativo: En la evaluación cualitativa preliminar se observó la presencia de alcaloides, saponinas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides y flavonoides como principales metabolitos (Tabla 1). En las reacciones de Wagner, Mayer y Dragendorff, revelaron presencia de Alcaloides tanto en el extracto crudo (Ec) como en las fracciones E1 y E4. La fracción E2 fue parcialmente

Tabla 1. Resumen de resultados de Perfil Fitoquímico.

METABOLITOS	PRUEBAS	EXTRACTOS				
		Crudo (Ec)	Eter de Petróleo (E1)	Diclorometano (E2)	Acetona (E3)	Metanol (E4)
ALCALOIDES	Dragendorff	+++	+	-	-	+++
	Mayer	+	+	-	-	+
	Wagner	+++	++	+	-	+
CUMARINAS	Baljet	+++	-	+	+	+
SAPONINAS	Espuma	+++	+	-	-	-
FLAVONOIDES	Shinoda	-	-	-	-	-
	Zn	-	-	-	-	-
	H2SO4	+++	+	+	++	+++
TRITERPENOS Y/O ESTEROLES	Liebermann-Burchard	+++	+++	+++	++	+
TANINOS	FeCl3	+	-	-	-	-
	Gelatina sal	-	-	-	-	-
SESQUITERPEN LACTONAS	Baljet	+++	-	+	+	+

positiva, solo la reacción de Wagner identificó la presencia de alcaloides. Y en la fracción de acetona (E3) no fue posible identificar estos metabolitos. Daneshzadeh *et al.*, (2020), mencionó que habitualmente, la mayoría de los extractos de plantas medicinales y aromáticas contienen alcaloides. Otros investigadores como Erdem *et al.*, (2015) y Wang *et al.*, (2012), confirmaron la existencia de fitoquímicos con actividad farmacológica, específicamente flavonoides y ácidos fenólicos con plantas del género *Eryngium*.

De acuerdo a lo reportado de las partes subterráneas (raíces) de *Eryngium*, evidenció la presencia de saponinas triterpénicas, glucósidos monoterpénicos, compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, derivados de cumarinas, ésteres de aldehído terpénico, acetilenos, aceite esencial y oligosacáridos (Erden *et al.*, 2015), que está en concordancia con los resultados obtenidos. Además, se detectó la presencia de triterpenlactonas y cumarinas con el método de Baljet, característico para ambos metabolitos, la presencia de ambos compuestos coincidió con lo mencionado por Erden *et al.*, (2015).

Los valores de compuestos fenólicos totales fueron de $20,0 \pm 0,70$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en el extracto crudo (Ec), $13,0 \pm 0,26$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en la fracción de Éter de petróleo (E1), $74,2 \pm 2,92$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en la fracción de Diclorometano (E2), $160,6 \pm 3,95$ en la fracción de Acetona (E3) y $14,0 \pm 0,06$ mg de Ac. Gálico. g^{-1} en la fracción de Metanol (E4). Con éstos resultados se observó que la mayor concentración de compuestos fenólicos se encontró en el extracto E3. Algunos investigadores han encontrado compuestos fenólicos en otras especies de *Eryngium*, por ejemplo, Daneshzadeh, *et al.*, (2020) en los extractos de *Eryngium billardieri* obtuvieron los fenoles totales en los extractos con las diferentes concentraciones que variaron de 10.71 a 33.38 mg GAE. g^{-1} extracto seco. Marčetić *et al.*, (2014), estableció la composición de extractos en metanol y cloroformo de las partes aéreas y raíces de *Eryngium palmatum* y han encontrado que el contenido de fenoles totales en el extracto metanólico de partes aéreas ($29,0 \pm 2,0$ mg AG. g^{-1})

fue mayor que en el extracto metanólico de raíces ($13,9 \pm 1,0$ mg AG. g^{-1}). Ayuso *et al.*, (2020), ha demostrado que los ácidos fenólicos fueron los compuestos preponderantes en ambos órganos de *Eryngium viviparum* con $38,3 \pm 0,8$ mg. g^{-1} y 102 ± 4 mg. g^{-1} de extracto de partes aéreas y radicales, respectivamente.

Se efectuó el análisis de los compuestos mayoritarios en la fracción E1 (solución preparada con Hexano, 1mg E1. mL^{-1}), entre los cuales se encontraron, ácidos carboxílicos, lactona, ésteres y alcoholes. Se evidenció la presencia de 2(3H)-furanona, 5-hexildihidro (97%) o γ -lactona. Landoulsi *et al.* (2020) estudió 8 especies de *Eryngium* de la ciudad de Túnez identificando en el extracto de éter de petróleo de partes aéreas principalmente sesquiterpenos oxigenados analizados por GC/MS que fueron diferentes a las identificadas en este trabajo. Sin embargo, los compuestos como el ácido hexadecanoico y ácido linoleico identificado en la fracción E1 de *E. horridum* también fueron identificados por Marčetić *et al.* (2014) en el extracto de cloroformo de partes aéreas y de las raíces de *Eryngium palmatum*.

En la fracción del Extracto Crudo soluble en Diclorometano (2mg E2. mL^{-1}), se identificó por comparación con la librería de masas del NIST alrededor de 11 compuestos, entre ellos lactona, aldehído, fenol, alcohol, amida, y como compuestos mayoritarios de ésta fracción la 2,5-pirrolidindion y 2(3H)-furanona, 5-hexildihidro ambos con 98% de similitud, seguido del Ftalato de mono(2-etilhexilo) (97 %).

En la fracción E3 soluble en Acetona (1mg. mL^{-1}), se observaron 39 picos identificados por CG/MS, que fueron comparados con la base de datos de la biblioteca del NIST, y los que en su mayoría correspondieron a compuestos como alcoholes, cetonas y esterres. El compuesto con mayor porcentaje de homología fue el Ácido benzoico, 2-hidroxi-, éster metílico (98%), luego le sigue el Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster dibutílico, con 97% de similitud.

En la fracción soluble del extracto crudo en Metanol-E4 (1mg. mL^{-1}), se pudieron identificar

Tabla 2. Resultados de actividad antimicrobiana de las raíces de *E. horridum* Malme. El control positivo dio 100 % y el negativo 0 % para todas las cepas. Control negativo: agua purificada. Control positivo Meropenem (50mg/mL) para Gram negativas, y Ciprofloxacina (25mg/mL) para Gram positivas.

Microorganismos	% inhibición				
	Ec	E1	E2	E3	E4
<i>Staphylococcus aureus</i>	48,10 ±2,6	29,10 ±1,1	31,60 ±2,1	46,80 ±7,8	18,50 ±3,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20,30 ±11	21,10 ±5,7	14,70 ±0,9	20,20 ±2,4	26,00 ±0,3
<i>Micrococcus Luteus</i>	12,20 ±20	25,10 ±16	20,50 ±1,3	27,60 ±1,9	25,70 ±1,3
<i>E. coli</i>	6,64 ±1,3	0	9,06 ±1,3	0,65 ± 0,1	5,63 ±1,1
<i>Salmonella typhimurium</i>	3,30 ±0,9	6,80 ±7,0	16,20 ±4,7	0	0
<i>Bordetella Bronchiseptica</i>	11,80 ±19	19,60 ±3,0	34,20 ±4,6	39,90 ±5,1	31,30 ±1,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	15,40 ±1,3	21,10 ±2,6	27,40 ±1,3	35,10 ±3,1	27,90 ±3,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,50 ±0,5	11,00 ±0,6	17,60 ±0,5	24,30 ±3,4	24,00 ±0,6
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	34,40 ±4,2	41,30 ±0,7	70,10 ±6,5	46,40 ±2,6	38,30 ±1,4
<i>Salmonella entérica</i>	0	0	0	0	0

16 compuestos, entre ellos alcoholes y aldehídos. El compuesto con mayor porcentaje de similitud fue el 5-Eicoseno, (E) con 98%, luego le siguen el 7-hexadeceno, (Z), el 5-Octadeceno y el 1-docoseno todos con 97% de similitud.

Actividades Biológicas

Prueba de Actividad Antioxidante: Entre los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de actividad antioxidante presentó la fracción soluble en Acetona (E3) 20,49 %, con el cual se encontró en concordancia con los resultados de compuestos fenólicos totales ensayados. Algunos autores también han encontrado actividad antioxidante en diferentes especies de *Eryngium*; como Daneshzadeh *et al.*, (2020) en partes aéreas de *Eryngium billardieri*, Ayuso *et al.*, (2020) en partes aéreas y radicales de *E. viviparum*, Barajas *et al.*, (2016) en aceite de semilla de *Eryngium carlinae* F. Delaroché, y Wojtanowski *et al.*, (2013) en *E. amethystinum* L. y *E. planum* L, como así también en este trabajo para el *E. horridum* se ha encontrado actividad antioxidante en las raíces.

Prueba de Actividad Antimicrobiana: La ac-

tividad antimicrobiana de extractos de *E. horridum* fue investigado contra diez cepas bacterianas. Tanto el Ec (1mg. mL⁻¹) como cada una de las fracciones (1mg. mL⁻¹), no revelaron actividad inhibitoria contra *Salmonella entérica*. Así mismo no inhibió el crecimiento de la *Salmonella typhimurium* las fracciones E3 y E4, pero el Ec, E1 y E2 si mostraron una débil actividad inhibitoria contra la misma cepa. Con todos los demás microorganismos hubo un porcentaje de inhibición. Los que tuvieron mayor sensibilidad contra *Staphylococcus aureus* fueron el Ec (48,10 ±2,6) % y E3 (46,80 ±7,8) %, mientras que con *Pseudomonas aeruginosas* E2 (70,10 ±6,5) % tuvo una gran influencia inhibitoria sobre el crecimiento de la cepa (Tabla 2).

Los Extractos de *Eryngium* spp. expresaron una amplia actividad antimicrobiana hacia una serie de bacterias y hongos (Erdem *et al.*, 2015). Los extractos hidroetanólicos de *E. maritimum*, *E. planum* y *E. campestre* (Thiem *et al.*, 2010) y la fracción apolar de un extracto metanol-cloroformo-acuoso de *E. maritimum* (Meot-Duros *et al.*, 2008) mostraron actividad antibacteriana contra *B. cereus* y *S. aureus* y actividad antifúngica contra *A. niger*. Los extractos metanólicos y de cloroformo de hojas y raíces

de *E. palmatum* también demostraron actividad contra *S. aureus* y *E. coli* (Marčetić *et al.*, 2014). Así también se observó la actividad antimicrobiana de *E. horridum* contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Actividad Hemolítica: Se obtuvieron porcentajes de actividad hemolítica para el extracto crudo Ec, que fueron desde 21,3 % hasta 99 %, y también se observó que a medida que se incrementó la concentración del extracto también aumentó el porcentaje de actividad. La fracción soluble en Éter de petróleo (E1) presentaron porcentajes de actividad hemolítica similares entre las diferentes concentraciones ensayadas, que fueron desde 19,0 % (30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) a 22,1% (60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Las diferentes concentraciones de extractos y fracciones utilizadas mostraron actividad hemolítica (AH) contra eritrocitos humanos, lo cual se observó con el aumento de la absorbancia de cada concentración. Se evidenció que el extracto crudo (Ec-95 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) y la fracción de acetona (E3-130 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) mostraron una capacidad significativa para lisar glóbulos rojos. La fracción E1 mostró baja acción hemolítica con 22%, pocas variaciones de actividad entre las concentraciones que fueron de 30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ a 60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (19,0% AH a 22,1% AH). Fracciones E2 y E4 se ensayaron en las concentraciones de 10,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ a 60,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ presentando porcentajes de hemólisis por debajo del 5%. Por lo tanto, se manifestó que la presencia de compuestos citotóxicos como alcaloides, saponinas y compuestos fenólicos (Dewick, 2002) identificados en el ensayo cualitativo debió estar en mayor concentración en el extracto crudo (Ec) y en la fracción acetona (E3).

Conclusiones

La especie estudiada fue identificada como *Eryngium horridum* Malme, de la cual fue realizada sus características, esta especie pertenece a la familia Apiaceae. Este es el primer trabajo donde se demostró sus propiedades antioxidantes, antimicrobianos y hemolíticas.

El ensayo del Perfil Fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, saponinas, sesquiterpenlactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides y flavonoides

como principales metabolitos. Se determinó la concentración de fenoles totales de los cuales el de mayor concentración fue en la fracción soluble en Acetona (E3). El análisis del perfil de compuestos por GC/MS arrojó como resultado la presencia de compuestos como lactonas, fenoles, ésteres, aldehídos, cetonas, amidas, alcoholes, alcanos y alquenos.

La actividad antimicrobiana del extracto crudo y las fracciones mostraron heterogéneas características inhibitorias, siendo E2 la de mayor inhibición del crecimiento (70,1 %) contra *P. aeruginosa*. La actividad antioxidante (expresada en mg Ac. Ascórbico. L^{-1}), presentó mayor porcentaje de actividad la fracción soluble en Acetona (E3) 20,49 %, el cual se encontró en concordancia con los resultados de compuestos fenólicos totales ensayados. La fracción soluble en Éter de petróleo no mostró actividad antioxidante. El extracto crudo y la fracción E3 tuvieron buena acción hemolítica con la mejor actividad a la concentración de 95 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ y 130 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente, mientras que los demás extractos no resultaron en actividad expresiva.

Agradecimientos

Al Decano MSc. Constantino Nicolás Guefos, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por el espacio para la realización de este trabajo, al laboratorio de Productos Naturales, laboratorio de Micología, laboratorio de Biotecnología y laboratorio de Instrumental. A la Prof. Dra. Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki por aportar su experiencia y conocimientos del tema para la elaboración y ejecución de éste trabajo. Al MSc. Francisco Paulo Ferreira Benítez por su apoyo en la realización e interpretación de los resultados.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

- Ayuso, M., Pinela, J., Dias, M. I., Barros, L., Ivanov, M., Calhella, R.C., Soković, M., Ramil-Rego, P., Barreal, M.E., Gallego, P.P. & Ferreira, I.C.F.R. (2020). Phenolic composition and biological activities of the in vitro cultured endangered *Eryngium viviparum* J. Gay. *Industrial Crops and Products*, 148(112325): 1–7.
- Andrews, J.M. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(Suppl. 1): 5–16.
- Castro, R.T., Verdecia, E.A., & Tamayo, I.M. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Multimed*, 15(3): 8 pp.
- Daneshzadeh, M. S., Abbaspour, H., Amjad, L., & Nafchi, A. M. (2020). An investigation on phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of extract from *Eryngium billardieri* F. Delaroché. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2): 708–715.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Hoboken: John Wiley & Sons. 507 pp.
- Erdem, S.A., Nabavi, S.F., Orhan, I.E., Daglia, M., Izadi, M., & Nabavi, S.M. (2015). Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1) PMC4678568: 1–22.
- Frete, F. (2010). *Plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de producción comercial*. Asunción: USAID - Paraguay Vende. 60 pp.
- Foresto, E., Arditi, M. P., Cogno, I. S., & Ibarra, L. E. (2021). Drogas verdes y terapia fotodinámica: una alianza prometedora en la lucha contra el cáncer. *Boletín Biológica*, 45: 4–9.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. [Folleto Académico]. Valencia: Departamento de Tecnología de Alimentos, ETSIAMN, Universitat Politècnica de València. 9 pp.
- Hernández Villarreal, P.E. (2020). Obtención de extractos etanólicos de *Eryngium foetidum* y determinación de actividad antioxidante *in vitro*. [Tesis de Ingeniería Bioquímica]. Teapa: Instituto Tecnológico Superior de la Región Sierra. viii + 53 pp.
- Landoulsi, A., Hennebelle, T., Bero, J., Rivière, C., Sahpaz, S., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., Benhamida, J. & Roumy, V. (2020). Antimicrobial and light-enhanced antimicrobial activities, cytotoxicity and chemical variability of all tunisian *Eryngium* species. *Chemistry & Biodiversity*, 17(4)e1900543.
- Marčetić, M., Petrović, S., Milenković, M. & Niketić, M. (2014). Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pančić and Vis. (Apiaceae). *Open Life Sciences*, 9(2): 149–155.
- Meot-Duros, L., Le Floch, G. & Magné, C., (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2): 258–262.
- OMS. (1998). *Situación regulatoria de los medicamentos a base de hierbas: una reseña mundial*. Washington: Organización Mundial de la Salud. *World Health Organization Program on Traditional Medicine*, 98.1: viii + 55 pp.
- Ramya, P., Vasanth, P.M., Prasad, P.V. & Babu, S.V. (2019). Qualitative phytochemical screening of *Alpinia galanga* L. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(5): 1064–1077.
- Rodríguez, R.G., González, G.M., Verde, M.J., Morales, M.E., Rivas, M. C., Oranday, A., Núñez, M.A. & Treviño, N. J. F. (2011). Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Ariocarpus retusus*. *Polibotánica*, (31): 143–155.
- Rocha, T.D., Vieira, P.B., Gnoatto, S.C.B., Tasca, T. & Gosmann, G. (2012). Anti-*Trichomonas*

- vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitology Research*, 110(6): 2551–2556.
- Soria, N. (2018). Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. *Revista de Salud Pública del Paraguay*, 8(1): 7–8.
- Thiem, B., Goslinska, O., Kikowska, M., & Budzianowski, J. (2010). Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba Polonica*, 56(4): 52–59.
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G. & Li, S. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 3: 99–120.
- Valencia, M., Ancona, J., Reyes, J., García, M., & León, F. (2017). Evaluación de los metabolitos del Noni (*Morinda citrifolia*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 4(4): 16–22.
- Wojtanowski, K.K., Skalicka-Woźniak, K., Głowniak, K. & Mroczek, T. (2013). Screening of the antioxidant potentials of polar extracts from fruits of *Eryngium planum* and *Eryngium amethystinum* using the β -carotene-linoleic acid assay. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 26(3): 276–278.

Cálculo de órbitas periódicas mediante la Teoría del Promedio

Calculation of periodic orbits through the Averaging Theory

María del Carmen Rolón Machuca^{1,*}

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. San Lorenzo, Paraguay.

*Email: rolonmachucamariadelcarmen@gmail.com.

Resumen: Un equilibrio cero-Hopf en \mathbb{R}^3 es un punto de equilibrio aislado cuyos valores propios son un par de valores puramente imaginarios y el valor propio cero. Para tal equilibrio, se estudió una teoría general para saber cuándo a partir de este equilibrio se bifurcan órbitas periódicas de pequeña amplitud al mover los parámetros del sistema, esta teoría es conocida como la teoría del promedio. La aplicación de promedios convierte el problema de encontrar órbitas periódicas de los sistemas diferenciales, en encontrar ceros de algunas funciones adecuadas de dimensión tres, además de proporcionar estimaciones analíticas de la forma de estas órbitas periódicas. Aquí se muestra la manera de calcular órbitas periódicas a partir de puntos de equilibrio cero-Hopf utilizando la teoría del promedio. En particular, primero se da la caracterización de los valores de los parámetros para los cuales el punto de equilibrio cero-Hopf tiene lugar en los sistemas Rössler, y se encuentra dos familias de parámetros que exhiben tales equilibrios, de una de ellas se estudia la demostración de la existencia de una órbita periódica bifurcada desde el equilibrio cero-Hopf, para ello, se da la prueba de dos teoremas principales que sustentan la demostración del teorema, que proporciona una aproximación de primer orden para soluciones periódicas de un sistema diferencial periódico.

Palabras claves: *Sistemas Rössler, órbita periódica, teoría del promedio, bifurcación cero Hopf.*

Abstract: A zero-Hopf equilibrium in \mathbb{R}^3 is an isolated equilibrium point whose eigenvalues are a pair of purely imaginary values and zero, properly. We study a general theory to know when from the equilibrium bifurcates a periodic orbit of small width moving the parameters of the system, this theory is known as the averaging theory. This technique of obtaining the averaging turns the finding of periodic orbits of the differential systems to finding zeros of some adequate functions of a third dimension, further providing analytic estimations about the shape of those periodic orbits. This paper shows the way to calculate periodic orbits bifurcating from the equilibrium points of zero-Hopf type, using the averaging theory. Particularly, first is given the characterization of the values of the parameters for which the zero-Hopf equilibrium point appears in the Rössler system, and are finding two parameters' families that shown these equilibriums; from one of these families, is studied the existence of a bifurcated periodic orbit from the zero-Hopf equilibrium, for it, is given the proof of two main theorems that sustain the demonstration of the theorem, that provides an approximation of first-order for periodic solutions, for a periodic differential system.

Key words: *Rössler System, periodic orbit, averaging theory, zero Hopf bifurcation.*

Introducción

Una bifurcación del tipo cero-Hopf en \mathbb{R}^3 es un despliegue de dos parámetros de un sistema diferencial autónomo tridimensional con un punto de equilibrio cero-Hopf, esto es, el despliegue tiene un punto de equilibrio aislado con un valor propio cero y un par de valores puramente imaginarios. El sistema Rössler, es un sistema que bajo ciertas condiciones se da la bifurcación del tipo cero-Hopf, estos sistemas se crearon para estudiar la existencia de atractores extraños en dimensión tres.

El objetivo principal del presente artículo, es estudiar la teoría del promedio para calcular las órbitas periódicas que bifurcan de un punto de equilibrio cero-Hopf en los sistemas Rössler.

La teoría del promedio es una herramienta clásica y madura para estudiar el comportamiento de la dinámica de sistemas diferenciales no lineales, y en particular sus órbitas periódicas. Esta técnica de promediar convierte el problema de encontrar órbitas periódicas de los sistemas diferenciales, en encontrar ceros de algunas funciones adecuadas de

Editor responsable: Nery López Acosta^{*}

Recibido: 26/07/2021

Aceptado: 27/05/2024

^{*}Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



dimensión tres. Este método aparte de proporcionar condiciones sobre los parámetros y también sobre los niveles de sistema Rössler, los cuales garantizan la existencia de soluciones periódicas; también proporciona estimaciones analíticas de la forma de estas órbitas periódicas.

La estructura que da sustento teórico al trabajo se presenta en cinco secciones que están relacionadas entre sí; considerando como principal, la sección que menciona la teoría del promedio y el teorema que hace referencia a la aplicación de la misma. En particular, se estudia la aplicación de esta teoría en el sistema diferencial Rössler para el cálculo de sus órbitas periódicas a partir de una bifurcación del tipo cero-Hopf.

Finalmente, en la última sección "Resultados" se mencionan los teoremas que nos dicen cuándo los sistemas Rössler produce alguna órbita periódica a partir de un equilibrio cero-Hopf, aplicando la teoría del promedio.

Materiales y métodos

La realización de este artículo se fundamenta en el análisis bibliográfico a través de la revisión de materiales existentes con respecto al cálculo de órbitas periódicas mediante la teoría del promedio, de modo a entender la aplicación de esta técnica en sistemas diferenciales.

Resultados y Discusión

Sistema de Rössler

Se considera el sistema diferencial de ecuaciones:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \dot{x} = -y - z, \\ \frac{dy}{dt} &= \dot{y} = x + ay, \quad (1) \\ \frac{dz}{dt} &= \dot{z} = bx - cz + xz,\end{aligned}$$

formado por tres ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales, introducido en Rössler (1976), ver también en Scott (2006).

Es importante notar que tanto las órbitas periódicas como toda la dinámica del sistema dependen

de sus tres parámetros a , b y c .

Puntos de equilibrio del sistema de Rössler

Los puntos de equilibrio de este sistema son:

$$P_1 = \left(-(ab-c), \frac{(ab-c)}{a}, -\frac{(ab-c)}{a} \right) \text{ y } P_2 = (0,0,0).$$

Estos puntos de equilibrio se obtienen igualando las ecuaciones del sistema (1) a cero y trabajando algebraicamente, esto es:

$$-y - z = 0, \rightarrow y = -z,$$

$$x + ay = 0, \rightarrow x = az,$$

$$bx - cz + xz = 0, \rightarrow az^2 + (ab - c)z = 0,$$

se resuelve esta última igualdad y se obtiene:

$$z_1 = -\frac{(ab-c)}{a} \text{ y } z_2 = 0.$$

Punto de equilibrio cero-Hopf

Un punto cero-Hopf es un punto de equilibrio de un sistema diferencial autónomo tridimensional, que tiene un valor propio cero y un par de valores propios puramente imaginarios (Llibre, 2014).

Bifurcación cero-Hopf

La bifurcación del tipo cero-Hopf es un despliegue de dos parámetros (o familia) de un sistema diferencial autónomo tridimensional con un equilibrio cero-Hopf. El despliegue tiene un equilibrio aislado con un valor propio cero y un par de valores propios imaginarios si los dos parámetros toman valor cero, y el despliegue tiene diferentes tipos de dinámica topológica en la pequeña vecindad de este punto de equilibrio aislado, ya que los dos parámetros varían en un pequeño entorno del origen (Llibre, 2014).

La bifurcación cero-Hopf ha sido estudiada por varios autores (Guckenheimer, 1981; Han, 1998; Guckenheimer & Holmes, 1983; Kuznetsov, 2004; Scheurle & Mardsen, 1984), y se ha demostrado que algunos conjuntos complicados invariantes del despliegue podrían ser bifurcados de los aislados equilibrios de cero-Hopf bajo algunas condiciones.

En la siguiente proposición se caracteriza cuando el punto de equilibrio localizado en el origen de las coordenadas de los sistemas Rössler es un punto de equilibrio cero-Hopf (Llibre, 2014).

Proposición 1. Hay dos familias de un parámetro de sistemas Rössler para las cuales el origen de las coordenadas es un punto de equilibrio cero-Hopf.

A saber:

$$(i) a = c \in (-\sqrt{2}, \sqrt{2}) \text{ y } b = 1; \text{ y}$$

$$(ii) a = c = 0 \text{ y } b \in (-1, \infty).$$

Las familias a las cuales hace mención la Proposición 1 son las siguientes:

$$(i) a = c = \pm\sqrt{2-w^2} \text{ y } b = 1 \text{ para } w \in (0, \sqrt{2})$$

$$(ii) a = c = 0 \text{ y } b = w^2 - 1 \text{ para } w \in (-1, \infty).$$

La Teoría del Promedio

La teoría del promedio es una herramienta clásica y madura para estudiar el comportamiento de la dinámica de los sistemas dinámicos diferenciales no lineales, y en particular de sus órbitas periódicas (Llibre, 2014).

Esta técnica de promediar convierte el problema de encontrar órbitas periódicas de los sistemas diferenciales, en encontrar ceros de algunas funciones adecuadas (Llibre, 2014).

Ahora se presentan los resultados básicos de la teoría del promedio que se necesita para estudiar y analizar las demostraciones de los resultados de este trabajo. Pero primeramente se dará algunas definiciones para una mejor comprensión de lo que sigue.

Definición Se supone que $x = \phi(t)$ es una solución de la ecuación $\dot{x} = f(x)$, con $x \in D$, donde D es un subconjunto abierto de \mathbb{R}^n y se supone existe un número positivo T tal que $\phi(t+T) = \phi(t)$ para todo $t \in \mathbb{R}$. Entonces $\phi(t)$ se llama solución periódica de la ecuación con período T (Llibre, 2014).

Definición Una órbita periódica aislada en el conjunto de todas las órbitas periódicas de una ecuación diferencial se la conoce como un ciclo límite (Gine *et al.*, 2013).

El siguiente teorema proporciona una aproximación de primer orden para las soluciones periódicas de un sistema diferencial periódico.

Se considera el sistema diferencial

$$\dot{x}(t) = \varepsilon f(t, x(t)) + \varepsilon^2 g(t, x(t), \varepsilon), x(0) = x_0. \quad (2)$$

con $x \in C \subset \mathbb{R}^n$, D un dominio acotado y $t \geq 0$.

Además, se supone que $f(t, x(t))$ y $g(t, x(t), \varepsilon)$ son T -periódicas en t .

La ecuación promediada asociada al sistema (2) se define como

$$\dot{y}(t) = \varepsilon f^0(y(t)), y(0) = x_0 \quad (3)$$

Donde

$$f^0(y) = \frac{1}{T} \int_0^T f(s, y) ds. \quad (4)$$

Bajo ciertas condiciones las soluciones de equilibrio de la ecuación promediada se corresponden con las soluciones periódicas de la ecuación (2).

Teorema 1. Se considera los dos problemas de valor inicial (2) y (3). Además, se supone:

(i) f su Jacobiano $\partial f / \partial x$, su Hessiano $\partial^2 f / \partial x^2$, g y su Jacobiano $\partial g / \partial x$ son definidos, continuos y acotados por una constante independiente ε en $[0, \infty) \times D$ y $\varepsilon \in (0, \varepsilon_0]$.

(ii) f y g son T -periódicas en t (T independiente de ε).

Entonces las siguientes afirmaciones son válidas:

(a) Si p es un punto de equilibrio de la ecuación promediada (3) y

$$\det \left(\frac{\partial f^0(y)}{\partial y} \right) \Big|_{y=p} \neq 0, \quad (5)$$

entonces existe una solución T-periódica $\varphi(t, \varepsilon)$ de la ecuación (2) tal que $\varphi(t, \varepsilon) \rightarrow p$ cuando $\varepsilon \rightarrow 0$.

(b) La estabilidad o inestabilidad del ciclo límite $\varphi(t, \varepsilon)$ viene dada por la estabilidad o inestabilidad del punto de equilibrio p del sistema promediado (3). De hecho, el punto singular p tiene el comportamiento de estabilidad de la aplicación asociada al ciclo límite $\varphi(t, \varepsilon)$.

Para la prueba del **Teorema 1**, se utilizan el **Teorema 2** y **Teorema 6**, cuyas demostraciones se pueden ver en Verhulst (1996) y el capítulo 11 en Sanders *et al.* (2007).

Teorema 2. Se considera la ecuación (2). Se supone que tanto $f(t, x)$ como $g(t, x, \varepsilon)$ son T-periódicas en t . Además, se supone que:

a. Las funciones vectoriales $f, g, \partial f / \partial x, \partial^2 f / \partial x^2$ y $\partial g / \partial x$, están definidas, son continuas y acotadas por una constante M (independiente de ε) en

$$[0, \infty) \times D \quad y \leq \varepsilon \leq \varepsilon_0.$$

b. f y g son T-periódicas en t (T independiente de ε).

Si p es un punto crítico de la ecuación promediada (3), mientras que

$$\left| \frac{\partial f^0(y)}{\partial y} \right| \Big|_{y=p} \neq 0, \quad (6)$$

entonces existe una solución T-periódica $\varphi(t, \varepsilon)$ de la ecuación (2) que está cerca de p tal que

$$\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \varphi(t, \varepsilon) = p. \quad (7)$$

El resultado de este teorema sostiene la demostración de la afirmación del apartado (a) de **Teorema 1**.

Por otro lado, la demostración del apartado (b) del **Teorema 1** se sustenta con el **Teorema 6**; y para la demostración de este último se utiliza los siguientes teoremas; **Teorema 3 (Floquet)**, **Teorema 4** y el **Teorema 5**; cuyas demostraciones se pueden encontrar en los capítulos 6 y 7 en Verhulst (1996), ver también Sanders *et al.* (2007).

Teorema 3. (Floquet) Se considera la ecuación $\dot{x} = A(t)x$ con $A(t)$ una matriz de $n \times n$ continua T-periódica. Cada matriz fundamental $\varphi(t)$ de la ecuación $\dot{x} = A(t)x$ se puede escribir como el producto de dos matrices de $n \times n$, esto es: $\varphi(t) = P(t)e^{Bt}$ con $P(t)$ T-periódica y B una matriz constante $n \times n$.

Teorema 4. Se considera la ecuación $\dot{x} = A(t)x + f(t, x)$ en \mathbb{R}^n , con $A(t)$ una matriz T-periódica; la función vectorial $f(t, x)$ es continua en t y en x , y Lipschitz-continua en x para $t \in \mathbb{R}$, en una vecindad de $x = 0$. Además, se tiene:

$$\lim_{\|x\| \rightarrow 0} \frac{\|f(t, x)\|}{\|x\|} = 0$$

uniformemente continua en t .

Si las partes reales de los exponentes característicos de la ecuación periódica lineal $\dot{x} = A(t)y$ son negativos, la solución $x = 0$ de la ecuación $\dot{x} = A(t)x + f(t, x)$ es asintóticamente estable.

Teorema 5. Se considera la ecuación $\dot{x} = Ax + B(t)x + f(t, x)$ con $t \geq t_0$ en \mathbb{R}^n .

A es una matriz $n \times n$ constante con valores propios de los cuales al menos una tiene en la parte real valores positivos; $B(t)$ es una matriz $n \times n$ continua con la propiedad: $\lim_{t \rightarrow \infty} PB(t)P^{-1} = 0$.

La función vectorial $f(t, x)$ es continua en t y x , Lipschitz-continua en x en una vecindad de $x = 0$; si, además, se tiene que: $\lim_{\|x\| \rightarrow 0} \frac{\|f(t, x)\|}{\|x\|} = 0$ uniformemente continua en t , la solución trivial de la ecuación $\dot{x} = Ax + B(t)x + f(t, x)$ con $t \geq t_0$ es inestable.

Teorema 6. Se considera la ecuación (2) y se supone que las condiciones del **Teorema 2** se cumplen. Si los valores propios del punto crítico $\varphi(t, \varepsilon)$ de la ecuación promediada (3) todos tienen partes reales negativas, la solución periódica correspondiente $\varphi(t, \varepsilon)$ de la ecuación (2) es asintóticamente estable para ε suficientemente pequeño. Si uno de los valores propios tiene una parte real positiva, $\varphi(t, \varepsilon)$ es inestable.

Resultados

En esta sección se presentan los resultados de aplicar la teoría del promedio al sistema diferencial Rössler, más específicamente, se menciona cuándo los sistemas Rössler tienen un equilibrio cero-Hopf, con el cual se produce alguna órbita periódica; para ello se enuncian los siguientes teoremas:

Teorema 7. Sea $(a, b, c) = (\bar{a} + \varepsilon\alpha, 1 + \varepsilon\beta, \bar{a} + \varepsilon\gamma)$ con $\bar{a} \in (-\sqrt{2}, \sqrt{2}) \setminus \{0\}$ y ε suficientemente pequeño. Si:

$$(-\alpha + a(1 - a^2)\beta + \gamma)((a^2 - 1)\alpha + a\beta + (1 - a^2)\gamma) < 0, \quad (8)$$

y

$$\alpha + a\beta - \gamma \neq 0, \quad (9)$$

entonces el sistema Rössler (1) tiene una bifurcación del tipo cero-Hopf en el punto de equilibrio localizado en el origen de coordenadas, y una órbita periódica nace en este equilibrio cuando $\varepsilon = 0$ y existe para $\varepsilon > 0$ suficientemente pequeño. Por otro lado, la estabilidad o la inestabilidad de esta órbita periódica viene dada por los valores propios:

$$\frac{A \pm \sqrt{B}}{2a^2(2 - a^2)^{\frac{3}{2}}}, \quad (10)$$

donde:

$$A = (2 - a^2)(\alpha - a\beta - \gamma),$$

$$B = (3a^4 - 4)\alpha^2 + 2a(2a^6 - 3a^4 + 4)\alpha\beta - 2(3a^4 - 4)\alpha\gamma + a^2(3a^4 - 4)\beta^2 - 2a(2a^6 - 3a^4 + 4)\beta\gamma + 3(a^4 - 4)\gamma^2.$$

En este teorema se estudia a la primera familia de parámetros del sistema Rössler obtenida en la **Proposición 1** para el cual se da puntos de equilibrio del tipo cero-Hopf, y se encuentra que el sistema cuenta con una solución periódica que comienza en el punto de equilibrio cero-Hopf ubicado en el origen de las coordenadas cuando $\varepsilon = 0$, además se analiza la estabilidad o inestabilidad de la solución obtenida (Llibre, 2014).

Teorema 8. Sea $(a, b, c) = (\varepsilon\alpha, \bar{b} + \varepsilon\beta, \varepsilon\gamma)$ con $\bar{b} \in (-1, \infty)$ y ε un parámetro suficientemente pequeño. Usando la teoría del promedio de primer orden no se puede encontrar órbitas periódicas que bifurquen del punto de equilibrio cero-Hopf localizado en el origen de coordenadas del sistema Rössler (1).

En este teorema se estudia a la segunda familia de parámetros del sistema Rössler obtenida en la **Proposición 1** para el cual se da puntos de equilibrio del tipo cero-Hopf, y se encuentra que el sistema $f_1(r, w) = f_2(r, w) = 0$ tiene una solución única $(0, 0)$ y, en consecuencia, la teoría del promedio en este caso no proporciona ninguna información sobre las posibles órbitas periódicas que puede bifurcarse del equilibrio cero-Hopf (Llibre, 2014).

Conclusión

La realización del presente trabajo ha sido, particularmente, el conocimiento adquirido sobre

un tema interesante e importante al momento de estudiar el comportamiento de sistemas dinámicos diferenciales no lineales, y en particular de sus órbitas periódicas, como lo es el estudio sobre el cálculo de órbitas periódicas mediante la teoría del promedio. En ese sentido, a lo largo de la elaboración de este documento, se ha podido estudiar el sistema diferencial de ecuaciones Rössler, los puntos de equilibrio y en qué condiciones dicho sistema presenta órbitas periódicas; además de comprender cuándo se da una bifurcación del tipo cero-Hopf.

En particular se comprobó que un enfoque viable que se puede aplicar para detectar órbitas periódicas, al menos para sistemas diferenciales particulares que se someten a la bifurcación de un punto de equilibrio cero-Hopf como lo es el sistema diferencial tridimensional del tipo Rössler, es mediante la aplicación de la teoría del promedio.

Por tanto, en el desarrollo del trabajo se comprobaron las siguientes afirmaciones: el punto de equilibrio localizado en el origen de coordenadas de los sistemas Rössler, es un punto de equilibrio cero-Hopf según la caracterización dada; y de que la aplicación de la teoría del promedio es eficiente para obtener órbitas periódicas a partir de la bifurcación del tipo Hopf.

Finalmente se analizaron dos teoremas que sustentan al teorema que proporciona una aproximación de primer orden para las soluciones periódicas de un sistema diferencial periódico.

Agradecimientos

A Dios, por darme fortaleza espiritual y física para hacer frente todos los desafíos que se me fueron presentando, a mis padres, hermano y hermanas, quienes desde un principio y en todo momento me dieron su apoyo y creyeron en mi capacidad de seguir aprendiendo y al Dr. Jaume Llibre Saló de la Universidad Autónoma de Barcelona, por sus enseñanzas, sus sabias y certeras recomendaciones, fueron invaluable.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

- Gine, J., Grau, M. & Llibre, J. (2013). Averaging theory at any order for computing periodic orbits. *Pyhsica D: Non Linear Phenomena*, 250: 58–65.
- Guckenheimer, J. (1981). On a codimension two bifurcation. *Lecture Notes in Mathematics*, 898: 99–142.
- Guckenheimer, J. & Holmes, P. (1983). *Nonlinear Oscillations, Dynamical Systems, and Bifurcation of Vector Fields*. New York: Springer-Verlag. xvi + 462 pp.
- Han, M. (1998). Existence of periodic orbits and invariant tori in codimension two bifurcations of three dimensional systems. [In chinese]. *Journal of Systems Science and Mathematical Sciences*, 18(4): 403–409.
- Kuznetsov, Y. (2004). *Elements of Applied Bifurcation Theory*. (3rd edition). New York: Springer-Verlag. 654 pp.
- Llibre, J. (2014). Periodic orbits in the zero-Hopf bifurcation of the Rössler system. *Romanian Astronomical Journal*, 24(1), 49–60.
- Rössler, O. (1976). An equation for continuous chaos. *Physics Letters A*, 57(5), 397-398.
- Sanders, J., Verhulst, F. & Murdock, J. (2007). *Averaging method in nonlinear dynamical systems*. (2nd edition). New York: Springer. Applied Mathematical Sciences, 59. xxiv + 434 pp.
- Scheurle, J.A. & Marsden, J. (1984). Bifurcation to quasi-periodic tori in the interaction of steady state and Hopf bifurcations. *SIAM Journal On Mathematical Analysis*, 15(6): 1055–1074.
- Scott, A. (2006). *Encyclopedia of nonlinear science*. New York: Routledge. 1104 pp.
- Verhulst, F. (1996). *Nonlinear differential equations and dynamical systems*. (2nd edition). Berlin: Springer Science and Business Media. x + 306 pp.

Ensayo de inhibición en medio líquido con placa multipocillo de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay contra *Listeria monocytogenes*

Liquid medium inhibition assay with microplates of lactic acid bacteria isolated from raw milk and Paraguay cheese against *Listeria monocytogenes*

Matías Policani^{1,2}, Camila Ayala^{1,2}, Sandra Álvarez¹, Yadira Parra¹, Gabriela Ulke³, Danilo Fernández¹ & Tomás López^{1,*}

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Iniciación Científica, San Lorenzo, Paraguay.

³Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición, Asunción, Paraguay.

*Autor correspondiente: lopez@facen.una.py.

Resumen: Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos generalmente considerados como seguros y poseen una gran capacidad para la bioconservación. Como agentes bioconservantes, las BAL pueden aplicarse como cultivos viables para la producción de compuestos antimicrobianos o explotando agentes químicos. Las BAL son conocidas por la producción de una variedad de compuestos antagonistas, entre ellos la bacteriocinas, y su potencial antimicrobiano está definido por la acción combinada de los metabolitos sobre bacterias no deseadas. En este trabajo se evalúa la actividad antimicrobiana de 7 cepas de BAL aisladas de leche cruda y queso Paraguay: *Enterococcus faecium* (M6A y M6B), *Lactobacillus fermentum* (M16A y M17A), *Lactobacillus rhamnosus* (M17B) y *Lactobacillus plantarum* (M18 y M21) frente a *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Palabras clave: BAL, lácteos, bioconservación, antimicrobianos, bacteriocinas, patógenos.

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are generally regarded as safe microorganisms with great potential for biopreservation. As biopreservative agents, LAB can be applied as viable cultures for the production of antimicrobial compounds or exploiting chemical agents. LAB are known for the production of a variety of antagonistic compounds, among them bacteriocins, and their antimicrobial potential is defined by the combined action of metabolites on non-desired bacteria. This work evaluates the antimicrobial activity of 7 strains of LAB isolated from raw milk and Paraguay cheese: *Enterococcus faecium* (M6A y M6B), *Lactobacillus fermentum* (M16A y M17A), *Lactobacillus rhamnosus* (M17B) and *Lactobacillus plantarum* (M18 y M21) against *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Keywords: LAB, dairy, biopreservation, antimicrobials, bacteriocins, pathogens.

Introducción

Las bacterias ácido láctica (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, anaerobias, no esporuladoras, que pueden ser cocos o bacilos y que producen ácido láctico como principal producto durante el proceso de fermentación y poseen un gran potencial biotecnológico en la industria de alimentos (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Sabatini, 2010). Como cualquier BAL que participe en un proceso de fermentación puede producir una variedad de compuestos inhibidores, el potencial antimicrobiano de estas bacterias está dado por la acción combinada de sus metabolitos en bacterias indeseadas (Salomskiene et al., 2019). Sin embargo,

recientemente se les está dando una atención especial a las bacteriocinas, por sus posibles aplicaciones para la conservación de alimentos (Devlieghere et al., 2004; Field et al., 2018; Gálvez et al., 2007, 2010; Woraprayote et al., 2016).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente que son activos contra otras bacterias, pueden o no poseer modificaciones postraduccionales y son secretadas al medio extracelular (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cotter et al., 2005; Field et al., 2018). Sus principales ventajas en comparación con otros compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica son su alta tolerancia al estrés térmico, su capacidad de permanecer activas

Editor responsable: Nery López Acosta*¹

Recibido: 27/01/2020

Aceptado: 22/05/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

dentro de un amplio rango de pH y su efectividad incluso a bajas concentraciones (Woraprayote et al., 2016).

Si bien otras bacterias pueden producir bacteriocinas, las bacteriocinas producidas por BAL poseen la ventaja de que la mayoría de los cultivos iniciales de BAL para alimentos son considerados como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, por lo que las bacteriocinas provenientes de estas también poseen este estatus (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Field et al., 2018). Además, las bacteriocinas provenientes de BAL son bastante potentes contra patógenos de alimentos y microorganismos que causan el deterioro de los alimentos sin alterar las cualidades sensoriales de los mismos y no presentan toxicidad para células eucariotas (Field et al., 2018).

El fin de este trabajo es identificar cepas de BAL aisladas de productos lácteos que posean potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, considerado como la bacteria patógena gram positiva de mayor preocupación debido a su capacidad de desarrollarse en una gran variedad de alimentos y condiciones ambientales (Gálvez et al., 2010).

Materiales y Métodos

Obtención de cepas

Se utilizaron 4 cepas previamente aisladas de BAL, pertenecientes al cepario del Departamento de Biotecnología de la FACEN-UNA las cuales fueron identificadas mediante MALDI-TOF y métodos moleculares para determinar el género y especie (Dušková et al., 2012) de las que se obtuvo las siguientes bacterias: *Enterococcus faecium* (M6A), *Lactobacillus fermentum* (M16A) y *Lactobacillus plantarum* (M18 y M21). Y para el patógeno se utilizó *Listeria monocytogenes*, donado por el Dr. Esteban Riera (Laboratorios Riera, Asunción, PY).

Prueba de inhibición en medio líquido contra *Listeria monocytogenes*

Preparación de sobrenadantes y patógeno

Se cultivaron las cepas de BAL en medio MRSB por 24 h a 37 °C y *L. monocytogenes* en medio LB por 24 hs a 37 °C, ambas en una incubadora de

CO2 serie 3 water-jacketed (Thermo Scientific™), con una atmósfera de CO2 de 0,1%. Se centrifugó el cultivo de *L. monocytogenes* a 4500 rpm por 10 min a 10 °C en una centrífuga refrigerada TGL-16M (Boyn™), se desechó el sobrenadante y se resuspendió en PBS (1X). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm buscando llegar a una absorbancia equivalente a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Luego, se hicieron dos diluciones seriadas 1:10. Por otra parte, se centrifugaron los cultivos de BAL a 6000 g (7600 rpm) por 20 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Luego se filtraron los sobrenadante con filtros de 0.22 µm (Sartorius) y se neutralizaron con hidróxido de sodio hasta un pH de 6~7 (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016).

Finalmente, se incubó en una placa multipocillo (×96) a 37 °C por 24 h en un Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™), acorde a los tratamientos presentados en la Tabla 1. Se midió la densidad óptica a 620 nm cada 30 min por espectrofotometría durante la incubación (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado; como control positivo se utilizó una solución estéril de nisina 0,25% y como controles negativos se utilizaron: medio LB y agua estéril (Control 1) y medio MRSB y medio LB (Control 2), ambas inoculadas con 15 µL de *L. monocytogenes* ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL).

Cálculo del porcentaje de inhibición

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se procedió a utilizar la absorbancia a las 24 hs y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Donde: } I = \frac{Abs_t - Abs_c}{Abs_c} \times 100$$

I = Porcentaje de inhibición.

Abs_t = Absorbancia máxima del tratamiento.

Abs_c = Absorbancia máxima del control.

Resultados y discusión

La importancia de las pruebas de enfrentamiento radica en tener resultados sobre actividad antimicrobiana de las BAL aisladas frente a patógenos comúnmente encontrados en los alimentos y que

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la prueba de inhibición en medio líquido.

Tratamientos		Componentes (240 µL)
1	Medio estéril	200 µL de medio LB + 40 µL de agua estéril
2	Control 1	185 µL de agua estéril + 40 µL de medio LB + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 ⁵ UFC/mL)
3	Control 2	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 ⁵ UFC/mL)
4	Medio + Agua	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de agua estéril
5	Blanco	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de agua estéril
6	Ensayos	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 ⁵ UFC/mL)
7	Control +	40 µL de medio LB + 185 µL de nisina + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 ⁵ UFC/mL)

producen su deterioro o enfermedades transmitidas por los alimentos; para los cuales deben actuar como bacteriostáticos o bactericidas.

Porcentajes de inhibición

En la Tabla 2 se observan los porcentajes de inhibición obtenidos para cada cepa.

Enterococcus faecium

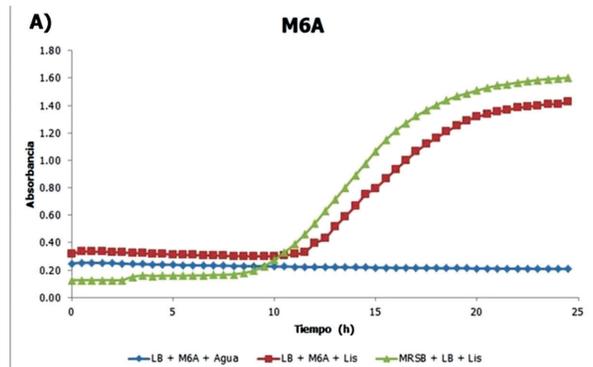
En la Fig. 1 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *E. faecium* (M6A) en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Este organismo presentó un bajo valor de inhibición, 10,27%, siendo este el más bajo de todo el ensayo.

Algunas bacterias del género *Enterococcus*, incluyendo *E. faecium*, producen bacteriocinas de-

Tabla 2. Porcentajes de inhibición producidos por cada cepa.

Muestra	Organismo	Porcentaje de Inhibición
M6A	<i>E. faecium</i>	-11,01%
M16A	<i>L. fermentum</i>	-56,11%
M18	<i>L. plantarum</i>	-30,88%
M21	<i>L. plantarum</i>	-19,90%
Control	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	-78,12%
Nisina	N/A	-93,26%

**Figura 1.** Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *E. faecium*. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

nominadas enterocinas, las cuales han demostrado poseer actividades contra *Listeria monocytogenes* (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Cintas et al., 1997; Cintas et al., 1998; Khan et al., 2010). Por lo que es probable que estas cepas no sean productoras de bacteriocinas y, por lo tanto, no inhiban el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Lactobacillus fermentum

En la Fig. 2 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *L. fermentum* (M16A) en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Nuestros resultados muestran que esta cepa produjo una inhibición superior al 50%. El valor medido fue de 56,11%. Por lo que esta cepa estudia-

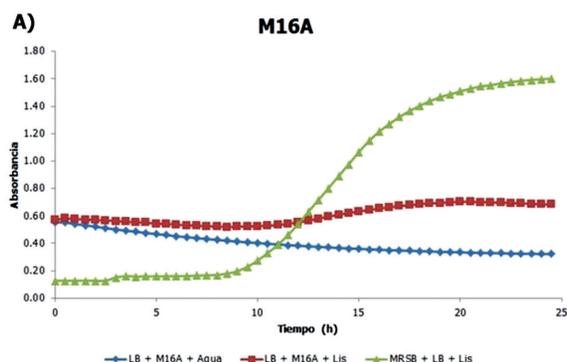


Figura 2. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *L. fermentum*. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

da de *L. fermentum* podría ser una cepa productora de bacteriocinas con base en que posee el mayor porcentaje de inhibición del ensayo.

La producción de bacteriocinas por *L. fermentum* ha sido registrada previamente, siendo estas efectivas principalmente contra bacterias gram-positivas, incluyendo *L. monocytogenes* (Pascual et al., 2008; Sabia et al., 2014; Yan & Lee, 1997).

Lactobacillus plantarum

En la Fig. 3 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente a los sobrenadante de las cepas M18 y M21 de *L. plantarum* en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Probablemente, *L. plantarum* sea la especie más estudiada y mejor caracterizada para la producción de bacteriocinas. A pesar de esto, estas

cepas presentaron rendimientos relativamente bajos, con porcentajes de inhibición de 30,88% (M18) y 19,90% (M21). Sería interesante realizar análisis moleculares para determinar la cepa a la que corresponde cada una y analizar la diferencia de resultados entre organismos de una misma especie.

Se bien se ha reportado la producción de bacteriocinas de esta especie a partir de varias matrices de comida y se ha evaluado su actividad contra un gran número de microorganismos (Borrero et al., 2018; da Silva Sabo et al., 2014; Fernandes et al., 2017; Todorov et al., 2016; Wen et al., 2016; Zacharof & Lovitt, 2012; Zhang et al., 2018), estas cepas no presentan una gran actividad contra *L. monocytogenes*.

Controles positivos

En la Fig. 4 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente a los sobrenadante de la cepa control *L. plantarum* ATCC® 8014™ y nisina, una bacteriocina bien estudiada y caracterizada, en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Los resultados de los controles fueron acorde a los esperados, presentando un alto porcentaje de inhibición, 78,12% (*Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™) y 93,26% (nisina).

Se utilizó *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™ como control, pues es una cepa en la que se ha comprobado la producción de bacteriocinas (Lash et al., 2005; Ming et al., 2015), con 78,12% de inhibición. Y la nisina, la única bacteriocina aproba-

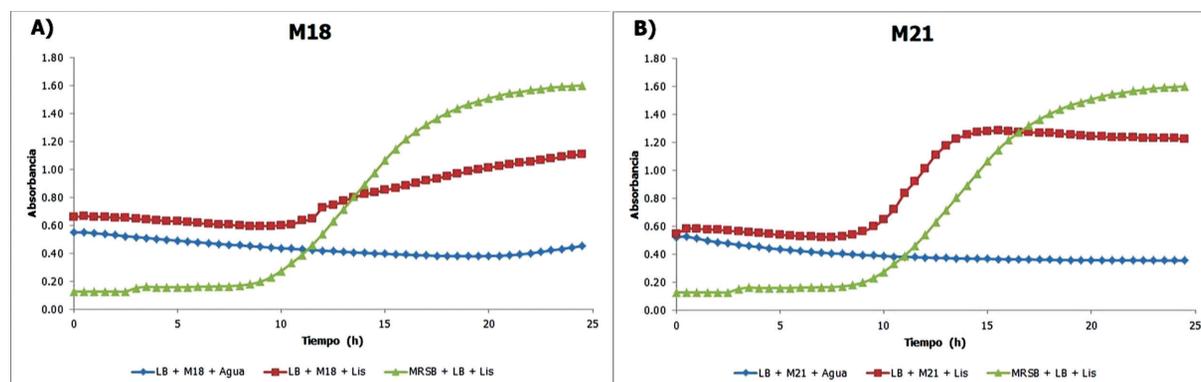


Figura 3. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente a sobrenadantes de *L. plantarum*. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

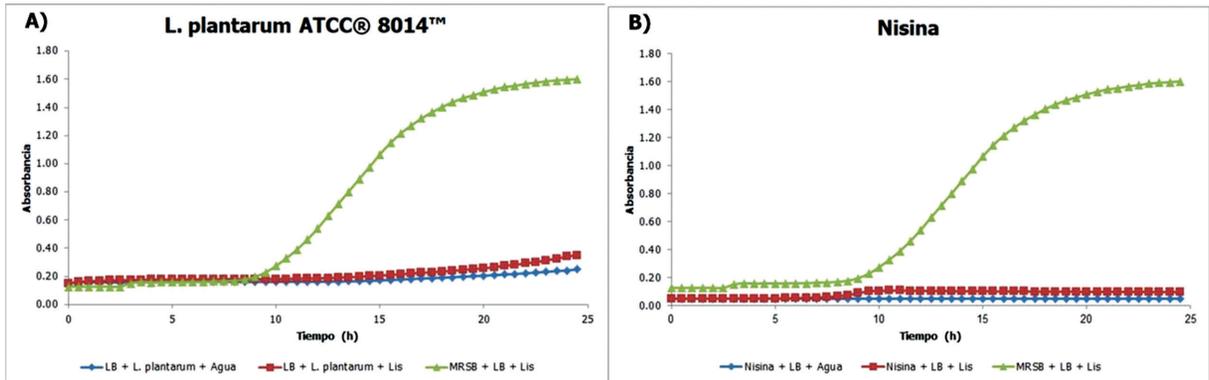


Figura 4. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente a sobrenadante de *L. plantarum* ATCC® 8014™ y nisina. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

da por la FDA, cuya efectividad contra *Listeria* ha sido comprobada anteriormente (Delves-Broughton et al., 1996), coincidiendo con nuestros resultados donde la nisina produjo una inhibición de > 90%.

Conclusión

Se observó inhibición de crecimiento para todas las cepas aisladas a partir de leche cruda y queso Paraguay, demostrando que poseen potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. La cepa de *E. faecium* tuvo un resultado de apenas del 10%, mientras que ambas cepas de *L. plantarum* produjeron inhibiciones entre 20% y 30%. La cepa que presentó los mejores resultados fue *L. fermentum*, con porcentajes de inhibición promedio de 56,11%. No obstante, estos porcentajes fueron inferiores a las observadas en los controles positivos de *L. plantarum* ATCC® 8014™ (~80%) y nisina (>95%). Nuestro estudio demostró que *E. faecium* no posee grandes cualidades de inhibición. Mientras que las cepas con mayor actividad de inhibición corresponden a *L. fermentum*, por lo que es necesario estudiar estas cepas a mayor profundidad para evaluar la producción de compuestos antimicrobianos así como su capacidad como productoras de bacteriocinas.

En casi todos los estudios previos se mencionan que las BAL tienen varios compuestos con propiedades inhibitorias frente a bacterias patógenas y deteriorantes de alimentos. Por lo que a partir de este estudio donde se aislaron bacterias acidolácti-

cas locales, es crucial proseguir con los ensayos de inhibición, determinando las fuentes de actividad inhibitoria como ácidos orgánicos, peróxidos de hidrógeno y bacteriófagos.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés

Financiamiento

El trabajo se realizó en el marco del proyecto “Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos aisladas de productos lácteos (PINV15-681)” financiado por el CONACYT a través de su programa PROCENCIA.

Literatura citada

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. & Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7): 2939–2951.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. & Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 62(5): 1676–1682.
- Borrero, J., Kelly, E., O'Connor, P.M., Kelleher, P., Scully, C., Cotter, P.D., Mahony, J. & Sinderen, D. van. (2018). Plantaricyclin: a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NI326: Purification, Characterization, and Heterologous Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1)e01801-17: 1–10.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. & Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143(7): 2287–2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. & Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4321–4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. & Håvarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180(8): 1988–1994.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777–788.
- da Silva Sabo, S., Vítolo, M., González, J.M.D. & Oliveira, R.P.S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64: 527–536.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(2): 193–202.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4): 273–285.
- Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z. & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2): 107–114.
- Fernandes, P., Loureiro, D., Monteiro, V., Ramos, C., Nero, L.A., Todorov, S.D. & Guerreiro, J.S. (2017). *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. *Annals of Microbiology*, 67(6): 433–442.
- Field, D., Ross, R.P. & Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20: 1–6.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N. & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2): 142–148.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. & Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1): 51–70.
- Gellert, G., Stommel, A. & Trujillano, A.B. (1999). Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 39(3): 467–476.
- Khan, H., Flint, S. & Yu, P.L. (2010). Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1): 1–10.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.H. & Gourama, H. (2005). Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 22(2): 199–204.
- Ming, L., Zhang, Q., Yang, L. & Huang, J.A. (2015). Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* on three common pathogenic bacteria. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4): 5806–5811.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Pájaro,

- M.C. & Barberis, I.L. (2008). Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*, 56(4): 397–402.
- Sabatini, N. (2010). A Comparison of the volatile compounds, in Spanish-style, Greek-style and Castelvetro-style Green Olives of the Nocellara del Belice Cultivar. Pp. 219–231, in Preedy, V.R. & Watson, R.R. (Eds.). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Elsevier. xxxix + 1479 pp.
- Sabia, C., Anacarso, I., Bergonzini, A., Gargiulo, R., Sarti, M., Condò, C., Messi, P., de Niederhausen, S., Iseppi, R. & Bondi, M. (2014). Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe*, 26: 41–45.
- Salomskiene, J., Jonkuvienė, D., Macioniene, I., Abraitienė, A., Zeime, J., Repeckienė, J. & Vaiciulyte-Funk, L. (2019). Differences in the occurrence and efficiency of antimicrobial compounds produced by lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 245(3): 569–579.
- Todorov, S.D., Holzapfel, W. & Nero, L.A. (2016). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action. *Annals of Microbiology*, 66(3): 949–962.
- Wen, L.S., Philip, K., & Ajam, N. (2016). Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 60: 430–439.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120: 118–132.
- Yan, T.R. & Lee, C.S. (1997). Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology Letters*, 19(8): 741–744.
- Zacharof, M.P. & Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2: 50–56.
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X. & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from chinese traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, 9(2165): 1–7.
- Zimina, M.I., Sukhih, S.A., Babich, O.O., Noskova, S. Yu., Abrashina, A.A. & Prosekov, A.Y. (2016). Investigating antibiotic activity of the genus *Bacillus* strains and properties of their bacteriocins in order to develop next generation pharmaceuticals. *Food and Raw Materials*, 4(2): 92–100.

Efectividad del Agua Destilada-Esterilizada Tres veces (ADTE) como alternativa de conservación del hongos fitopatógenos

Effectiveness of Triple Distilled-Sterilized Water (TDSW) as an alternative for the conservation of phytopathogenic fungi

Axel Aníbal Marsal von Glasenapp^{1,2}, Vicente Gabriel Gaona Duarte^{1,2}, Paola Ester Fretes Moreno^{1,2}, Andrea Alejandra Arrúa Widmer^{1,2}, Juliana Moura Mendes Arrúa² & Cinthia Carolina Casal-Martínez^{1,2,*}

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Biotecnología. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: ccasal@facen.una.py.

Resumen: Los estudios de las enfermedades que afectan a las semillas de trigo son esenciales para garantizar la producción agrícola sostenible y la seguridad alimentaria. La punta negra del grano de trigo, caracterizada por la decoloración marrón-negra en el extremo del embrión, se asocia con la presencia de géneros hongos fitopatógenos, como *Alternaria* y *Bipolaris*. Aunque esta enfermedad no suele afectar el rendimiento del cultivo, puede comprometer la calidad del grano, lo que resulta en pérdidas económicas debido a descuentos en el mercado. El presente estudio evaluó la efectividad del método de conservación utilizando agua destilada-esterilizada tres veces (ADTE) para preservar la viabilidad y estabilidad de *Alternaria* sp. y *Bipolaris* sp. Los resultados demostraron que el método ADTE fue eficaz para conservar tres de las cuatro cepas evaluadas, siendo Alt04 la más viable. Estos hallazgos sugieren que el ADTE podría representar una alternativa económica y efectiva para la conservación a largo plazo de estos hongos fitopatógenos. Dado su papel crítico en la agricultura, la identificación de los géneros asociados a la enfermedad de la punta negra, así como su correcto aislamiento y conservación, facilitarán el registro de cepas de referencia para investigaciones futuras.

Palabras clave: preservación prolongada, micosis, epidemiología, patógeno vegetal, micobiota, centrifugación, agricultura.

Abstract: Studies of diseases affecting wheat seeds are essential to ensure sustainable agricultural production and food security. Black point disease in wheat grains, characterized by brown-black discoloration at the embryo's tip, is associated with the presence of phytopathogenic fungal genera such as *Alternaria* and *Bipolaris*. Although this disease usually does not affect crop yield, it can compromise grain quality, resulting in economic losses due to market discounts. This study evaluated the effectiveness of the conservation method using triple-distilled sterile water (TDSW) to preserve the viability and stability of *Alternaria* sp. and *Bipolaris* sp. The results demonstrated that the TDSW method was effective in conserving three out of the four evaluated strains, with Alt04 being the most viable. These findings suggest that TDSW could represent an economical and effective alternative for long-term preservation of these phytopathogenic fungi. Given their critical role in agriculture, identifying the genera associated with black point disease, as well as their proper isolation and conservation, will facilitate the registration of reference strains for future research.

Key words: long-term preservation, mycosis, epidemiology, plant pathogen, mycobiota, centrifugation, agriculture.

Introducción

El estudio de la micocenosis de las semillas de cereales es relevante para resolver problemas relacionados con la elaboración de productos agrícolas saludables y respetuosos con el medio ambiente. La enfermedad en semillas conocida como Punta negra

o Black point, en inglés, es causada por un complejo de hongos, entre ellos se encuentran *Alternaria* y *Bipolaris*, géneros fúngicos que muestran una alta frecuencia de aparición en las semillas de trigo. Esta enfermedad se caracteriza por una decoloración marrón-negra en el extremo del embrión del grano

Editor responsable: Fernando José Méndez*¹

Recibido: 17/04/2024

Aceptado: 03/06/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



según Khlebova *et al.* (2019).

Desde el inicio del siglo XX, se han realizado trabajos para describir y estudiar las causas de la emergencia de la punta negra en todas las regiones en donde el trigo se cultiva; estos lugares incluyen Italia, Egipto, Marruecos, Argentina, India, Canadá, Estados Unidos, Alemania, África del Norte y Rusia, según Khlebova *et al.* (2019). Si bien la enfermedad no suele reducir el rendimiento del cultivo, la presencia de la punta negra en el grano cosechado puede disminuir la categoría y la calidad, lo que resulta en descuentos por parte del elevador. Los granos afectados son considerados como dañados según las normas de granos de Estados Unidos y se permite solo un 2%, en el trigo clasificado como U.S. No. 1; y un 4%, en U.S. No. 2., según Watkins (2004).

En la investigación de hongos presentes en la punta negra del trigo, realizada por Chávez y Kohli (2013), se identificaron 11 géneros de hongos: *Curvularia*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Pyricularia*, *Drechslera*, *Nigrospora*, *Septoria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, y *Melanospora*. Los géneros *Curvularia*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium* fueron predominantes en la infección de punta negra en trigo en el Paraguay.

Alternaria es un género fúngico ubicuo que incluye especies saprófitas, endofíticas y patógenas. Está asociado con una amplia variedad de sustratos, incluyendo semillas, plantas, productos agrícolas, animales, suelo y la atmósfera. Las especies de *Alternaria* son conocidas como graves patógenos de plantas, causando pérdidas importantes en una amplia gama de cultivos como lo mencionan Woudenberg *et al.* (2013). En cuanto al género *Bipolaris*, su relevancia en el Paraguay se suele presentar en otros cultivos de cereales como el arroz. En los años 2016 y 2017, este género presentó una incidencia media más alta asociada a la mancha foliar en las áreas de cultivo de arroz en Ñeembucú, según lo documentado por Quintana *et al.* (2019). Por otro lado, especies como *B. sorokiniana* y *B. bicolor* fueron observadas en semillas de trigo provenientes de diversas localidades de Brasil, tal como lo señaló Morejon *et al.* (2006).

Estos organismos fúngicos revisten una significativa relevancia en el ámbito agrícola, particularmente debido a su estrecha asociación con el complejo patógeno implicado en la enfermedad de la Punta Negra en trigo. Por consiguiente, se hace imprescindible abordar la investigación dirigida hacia la preservación y almacenamiento óptimos de estos hongos, con el propósito de facilitar estudios subsiguientes, tales como la identificación de la variabilidad genética dentro de la población, la evaluación de su patogenicidad en cultivos huéspedes, así como la caracterización de su interacción con el hospedero. Para ello, es fundamental emplear métodos de conservación diseñados específicamente para asegurar la viabilidad y estabilidad de estas especies.

El enfoque de inmersión en agua destilada, la técnica agua destilada-esterilizada tres veces (ADTE), ha demostrado su efectividad en la conservación de oomicetos, basidiomicetos, ascomicetos aeróbicos y algunos microorganismos conocidos por ser patógenos en seres humanos de acuerdo con Nakasone (2004) y Fernández *et al.* (2012).

En esta investigación, se tiene por objetivo evaluar la efectividad de la conservación en agua destilada-esterilizada para la preservación de los hongos fitopatógenos: *Alternaria* sp. y *Bipolaris* sp., donde se utilizó una versión adaptada de la metodología desarrollada por Ladino Rey *et al.* (2016), la cual involucró una serie de suspensiones en Agua-Destilada-Esterilizada 3 veces (ADTE). Este enfoque está basado en el método Castellani, que se basa en la conservación del cultivo del hongo en agua destilada estéril descrita en Panizo *et al.* (2005).

Materiales y métodos

Siembra de los granos de trigo

Siguiendo el protocolo de French y Herbert (1980), se desinfectaron las semillas de trigo con síntomas de la enfermedad Punta Negra, primero se sumergieron en alcohol al 70% durante 30 segundos, luego en hipoclorito de sodio 3% durante un minuto, se lavaron tres veces con agua destilada y finalmente se dejaron secar sobre papel absorbente.

Todo el proceso de desinfección se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar.

Se sembraron cinco semillas desinfectadas en posiciones equidistantes en cada placa de Petri con medio PDA (Papa, Dextrosa y Agar) de 90 mm de diámetro y se incubaron durante 5 días a una temperatura de $28\pm 3^{\circ}\text{C}$. Después de que las hifas crecieran, se identificaron las colonias basándose en la morfología descrita en el manual de laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y de trigo” de Warham *et al.* (1997).

Identificación del género y obtención de los cultivos puros

De cada colonia identificada, se realizaron cinco repiques equidistantes en una misma placa con PDA. Estas placas se incubaron durante 5 días a una temperatura de $28\pm 3^{\circ}\text{C}$. Una vez que los cultivos puros crecieron, se procedió a la identificación del género del hongo. Para ello, se observaron los conidios bajo el microscopio y se compararon con las fotos descritas en los ensayos de Warham *et al.* (1997), Manamgoda *et al.* (2014) y Woudenberg *et al.* (2013). Posteriormente, se realizaron las monosporizaciones utilizando la metodología de las diluciones seriadas. Estos aislados se encuentran registrados e incluidos a la “Colección de Cultivos de Microorganismos de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay” (con registro de la FELACC, SI-70).

Filtrado de conidias por centrifugación y conservación de suspensiones

En medio Avena Agar (MAA), se dejaron crecer repicados de monoespóricos de los hongos por 5 a 7 días. Una vez pasado ese tiempo, se aplastaron con láminas de vidrio esterilizadas para luego incubarlos en condiciones de esporulación por 2 días en cámara húmeda ($28^{\circ}\text{C}\pm 1$, $\text{HR}\geq 80\%$ y luz constante). Pasado este tiempo, se agregó a cada cultivo 5 mL de agua destilada tres veces esterilizada (ADTE) y se rasparon con láminas de vidrio esterilizadas. Seguidamente, la solución madre de cada placa se vertió en tubos de 15 mL. Se centrifugaron los tubos a 2000 rpm por 5 minutos como indica

Gemeda *et al.* (2014), para después descartar el sobrenadante y volver a centrifugar para obtener una suspensión más concentrada de 5 mL aproximadamente. La solución concentrada se diluyó en 5 mL de ADTE, se filtró con una gasa estéril, y se recolectó en vasos de precipitado estériles. Los 8 mL de cada suspensión se almacenaron en tubos de 2 mL para su conservación y posterior determinación de la tasa de supervivencia. Los 2 mL de suspensión sobrante de cada repetición se utilizaron para la determinación de la viabilidad.

Determinación de la viabilidad

Para la determinación de la viabilidad, se calculó la concentración de conidios/mL al momento de filtrar la solución concentrada con la gasa estéril. Para ello se utilizó la ecuación propuesta por French y Herbert (1980), utilizando un hematocitómetro, este proceso se repitió en cinco ocasiones como réplicas analíticas, y se calculó el promedio de los valores obtenidos.

Determinación de la tasa de supervivencia

Para evaluar la tasa de supervivencia tras la conservación, se calculó el valor de la tasa de supervivencia (BSR%), por sus siglas en inglés, a través de la ecuación propuesta por Morales-García *et al.* (2010):

$$\text{Tasa de supervivencia (BSR\%)} = \frac{\text{Log}\left(1 + N^{\circ} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \text{DC}\right) * 100}{\text{Log}\left(N^{\circ} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \text{AC}\right)}$$

Siendo: **DC**: Después de la Conservación. **AC**: Antes de la Conservación. **UFC**: Unidades Formadoras de Colonias.

Para calcular el BSR%, es necesario conocer las Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL) del T0 (tiempo 0, día 0, día en el que se llevaron las suspensiones a conservación), para compararlo con el del T1 (tiempo 1, día en el que se sacaron las suspensiones de la conservación). El conteo de microorganismos mediante técnica de extensión superficial en placa, según lo descrito por Valencia (2004) y Camacho *et al.* (2009), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = N^{\circ} \text{ de colonias} * \frac{1}{\text{Factor de dilución}} * \frac{1}{ml \text{ de muestra}}$$

Para calcular la UFC/mL, es necesario el factor de dilución:

$$Fd : \text{Factor de dilución} = \frac{g \text{ o ml de muestra}}{g \text{ o ml de muestra} + g \text{ o ml de diluyente}}$$

El UFC se evaluó a partir de 0,2 mL de la solución madre, de cada vaso. Dicha alícuota fue sembrada en placas de Petri con medio PDA en dilución 1/10. El crecimiento de las colonias se observó a intervalos de 24, 48 y 72 horas.

Determinar la estabilidad morfológica y la pureza de las colonias.

Para la evaluación de la viabilidad, estabilidad morfológica y pureza de los hongos filamentosos, se observaron las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos.

Resultados

El método del ADTE para la conservación de hongos fitopatógenos fue eficaz para recuperar 3 de las 4 cepas evaluadas: Alt04, Bp09, Alt01 y Bp11 (Tabla 1). Se observaron sus características macroscópicas y microscópicas de dichas cepas (Figs. 1 y 2) donde se observan las particularidades de los géneros *Alternaria* y *Bipolaris* en cuanto a su coloración de colonia y forma de conidios.

Se realizaron estudios a lo largo de diferentes períodos de tiempo, expresados como T₀ (Día 0), T₁ (20 dpc, para Alt04; y 40 dpc para Bp09, Alt01 y Bp11) y T₂ (60 dpc, para Alt01 y Bp11). Para la cepa Alt04, en el T₀, a las 24 horas, se observó un valor de 161,11 UFC/mL, mientras que, a las

48 horas, el valor aumentó a 205,56 UFC/mL, en el T₁, a las 24 horas, no se evidenció crecimiento visible, pero a las 48 horas, se registró un valor de 22,22 UFC/mL (Fig. 3a), lo que dio un BSR% del 63,54% (Fig. 4). En cuanto a la cepa Alt01, dio los siguientes valores: en el T₀ a las 24 horas, se observó un valor de 166,67 UFC/mL, y a las 48 horas, este valor aumentó a 475 UFC/mL. En el T₁, a las 24 horas, el crecimiento fue de 35 UFC/mL, y a las 48 horas, de 130 UFC/mL. En el T₂, a las 24 horas, el crecimiento fue de 5 UFC/mL, y a las 48 horas, de 10 UFC/mL (Fig. 3c), lo que resultó en un BSR% de 23,41% (Fig. 4).

La cepa Bp09 (Fig. 3b), en el T₀ a las 24 horas, no se detectó crecimiento (0 UFC/mL), pero a las 48 horas, se registraron 27,78 UFC/mL. En el T₁, a las 24 horas, no hubo crecimiento visible, pero a las 48 horas, se registró un valor de 50 UFC/mL, estos resultados dieron un BSR% del 47,69% (Fig. 4). Finalmente, para la cepa Bp11 (Fig. 3d), en el T₀ a las 24 horas, se registró un valor de 366,67 UFC/mL, y a las 48 horas, de 733,33 UFC/mL. En el T₁, a las 24 horas, el crecimiento fue de 200 UFC/mL, y a las 48 horas, de 2530 UFC/mL. En el T₂, tanto a las 24 como a las 48 horas, no se observó crecimiento visible, lo que dio un BSR% de 0 (Fig. 4).

Discusión

El método del ADTE para conservación de hongos fitopatógenos fue eficaz para recuperar 3 de las 4 las cepas evaluadas, una proporción similar a la de Ladino Rey *et al.* (2016), en el que las cinco de las siete cepas conservadas con agua destilada sobrevivieron hasta los cuatro meses evaluados en su estudio.

Tabla 1. Aislados estudiados en este ensayo.

ID aislado	Género	Hospedero/Parte de planta	Año aislamiento	Fecha conservación
Alt01	<i>Alternaria</i>	Trigo/semilla	2023	31/10/2023
Alt04	<i>Alternaria</i>	Trigo/semilla	2023	30/8/2023
Bp09	<i>Bipolaris</i>	Trigo/semilla	2023	8/10/2023
Bp11	<i>Bipolaris</i>	Trigo/semilla	2023	22/11/2023

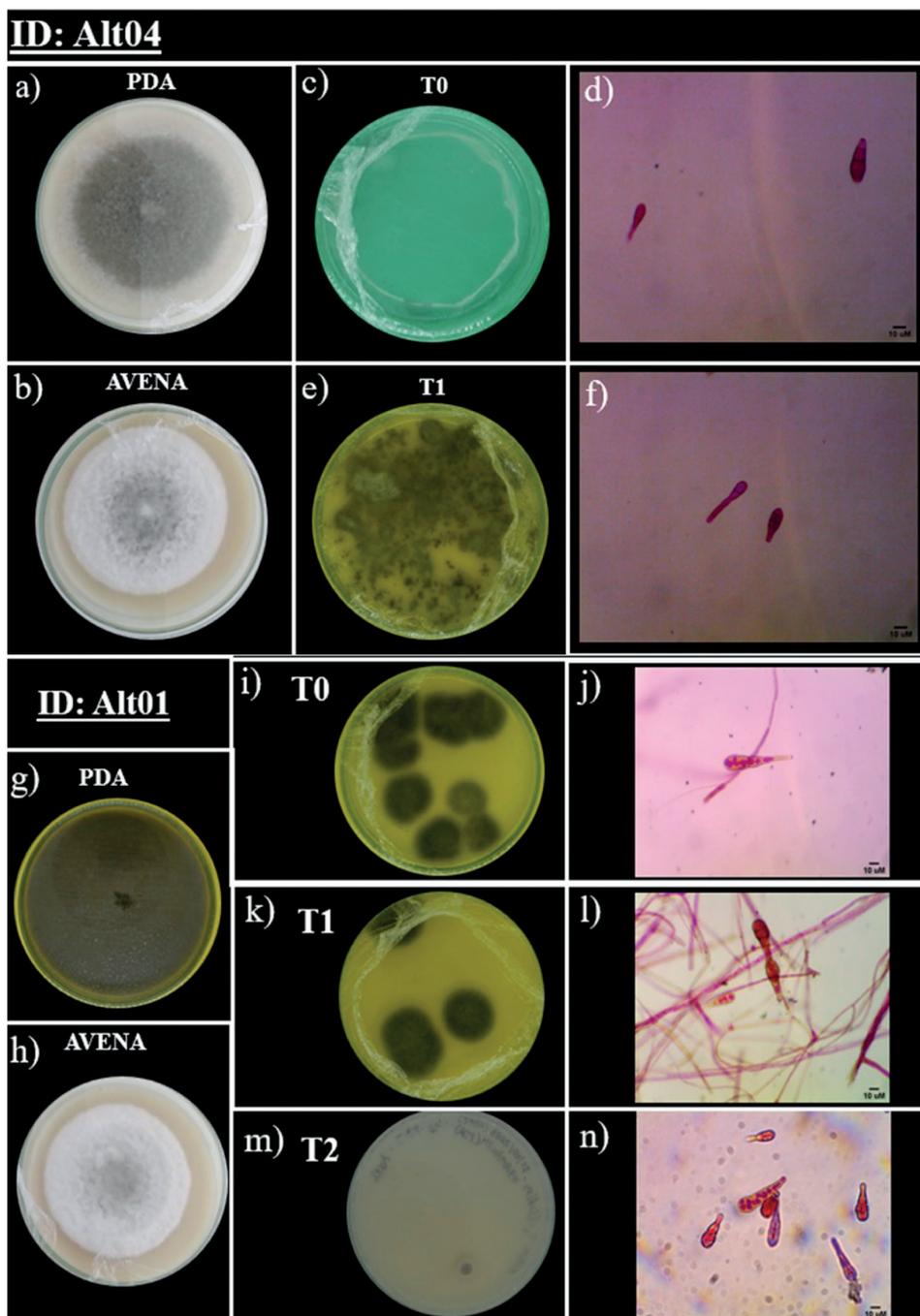


Figura 1. Observaciones macroscópicas y microscópicas de aislados de *Alternaria* (Alt). (a) Cultivo monoespóricico en medio PDA de Alt04. (b) Cultivo monoespóricico en MAA de Alt04. (c) UFC de Alt04 (T₀) tras 48 horas de crecimiento (d) Conidios de colonias de Alt04, antes de la conservación. (e) UFC de Alt04 (T₁) tras 48 horas de crecimiento (f) Conidios de colonias de Alt04, 40 dpc. (g) Cultivo monoespóricico en medio PDA de Alt01. (h) Cultivo monoespóricico en MAA de Alt01. (i) UFC de Alt01 (T₀) tras 48 horas de crecimiento (j) Conidios de colonias de Alt01, antes de la conservación (k) UFC de Alt01 (T₁) tras 48 horas de crecimiento (l) Conidios de colonias de Alt01, 40 dpc. (m) UFC de Alt01 (T₂) tras 48 horas de crecimiento (n) Conidios de colonias de Alt01, 60 dpc.

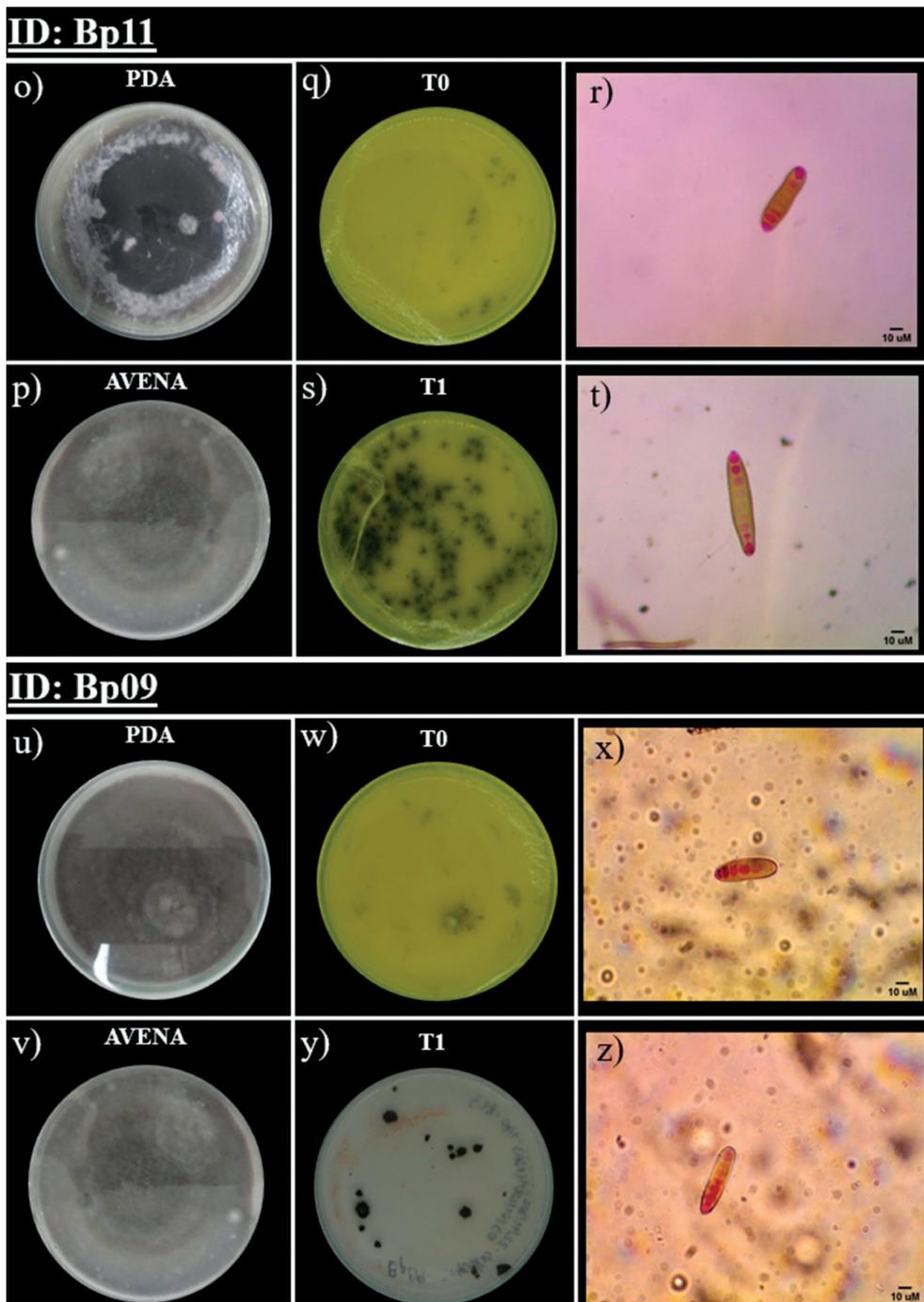


Figura 2. Observaciones macroscópicas y microscópicas de aislados de *Bipolaris* (Bp). (o) Cultivo monoespóricico en medio PDA de Bp11 (p) Cultivo monoespóricico en medio MAA de Bp11 (q) UFC de Bp11 (T_0) tras 48 horas de crecimiento (r) Conidios de colonias de Bp11, antes de la conservación. (s) UFC de Bp11 (T_1) tras 48 horas de crecimiento (t) Conidios de colonias de Bp11, 40 dpc (u) Cultivo monoespóricico en medio PDA de Bp09 (v) Cultivo monoespóricico en medio MAA de Bp09 (w) UFC de Bp09 (T_0) tras 48 horas de crecimiento (x) Conidios de colonias de Bp09, antes de la conservación. (y) UFC de Bp09 (T_1) tras 48 horas de crecimiento (z) Conidios de colonias de Bp09, 40 dpc.

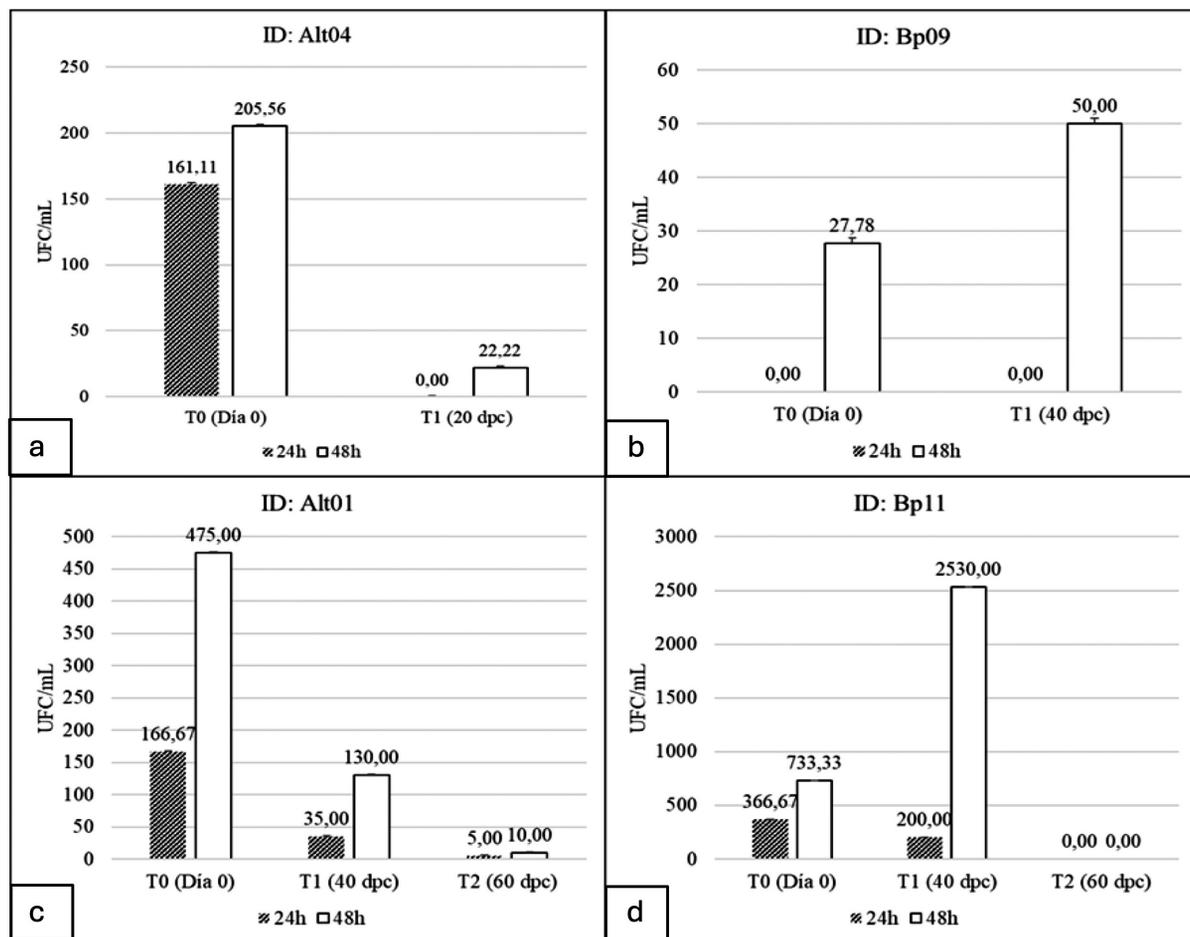


Figura 3. Comparación de las UFC/mL de la dilución 1/10 de diferentes cepas antes de la conservación (T0 = Día 0) y días post-conservación (T1 = 20 DPC/40 DPC y T2 = 60 DPC).

De acuerdo con los estudios de Fernández *et al.* (2012), en donde se reportó un porcentaje total de recuperación del 76,5%, se observó que el BSR% para la conservación de conidios en ADTE fue moderado. Específicamente, se registró un porcentaje de 43,475%, para *Alternaria*; y de 11,705%, para *Bipolaris*. En conjunto, ambos géneros dan, en conjunto, una tasa de supervivencia de 33,66%.

Como destaca Panizo *et al.* (2005), los métodos de conservación con agua son de bajo costo y fácil manejo, pero necesitan de constante vigilancia y atención por parte del personal que se ocupa del mantenimiento de una colección de hongos. Esto también lo mencionan Fernández *et al.* (2012), un método ideal para pequeñas colecciones o laborato-

rios con pocos recursos. Resulta útil prácticamente para todos los hongos patógenos porque ha logrado mantener la viabilidad, pureza y estabilidad por períodos de más de 20 años.

Conclusión

Se puede concluir con esta investigación que la efectividad de la conservación con ADTE para la preservación de los hongos fitopatógenos: *Alternaria* sp. y *Bipolaris* sp. de un 75% de estas especies fúngicas evaluadas durante los períodos mencionados.

Agradecimientos

Agradezco la oportunidad de participar en el Pro-

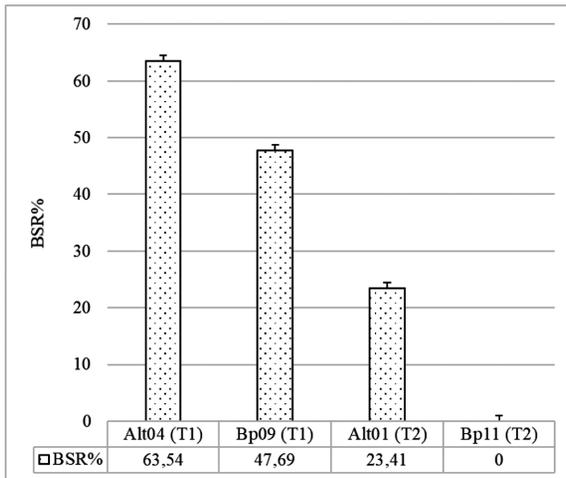


Figura 4. Tasa de supervivencia (BSR), de las cuatro (4) cepas de hongos fitopatógenos tras un crecimiento de 48 horas.

grama de Iniciación Científica a la FACEN-UNA, y al CEMIT por su apoyo financiero. Así mismo, expreso mi gratitud a los profesionales que me guiaron en el desarrollo de este programa.

Contribución de los autores

Concepción del estudio y diseño del experimento y preparación del manuscrito: A.A.M.VG y C.C.C.M. Ejecución del experimento: A.A.M.VG, P.E.F.M., V.G.G.D. Verificación del experimento: C.C.C.M., J.M.M.A. Análisis/interpretación de datos y edición/revisión del manuscrito: A.A.M.VG, C.C.C.M., J.M.M.A. Aprobación de la versión final del manuscrito: A.A.M.VG, C.C.C.M., J.M.M.A. A.A.A.W.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción y Financiación propia.

Literatura citada

Chávez, A. & Kohli, M. (2013). Identificación de hongos presentes en la punta negra de trigo.

Investigación Agraria, 15(2): 133–137.

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. & Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. (2ª ed.). Manual académico. Ciudad de México: Facultad de Química, UNAM. 196 pp.

Fernández, C.M., Díaz, L.A., Illnait, M.T., Aragónés, C., Martínez, G. & Perurena, M.R. (2012). Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(1): 49–54, 2012.

French, E.R. & Hebert, T.T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Turrialba: IICA-CATIE. 289 pp.

Gemeda, N., Woldeamanuel, Y., Asrat, D. & Debella, A. (2014). Effects of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): 373–381.

Khlebova, L.P., Barysheva, N.V., Ziborov, A.I. & Brumberg, I. A. (2019). Black point in spring durum wheat under different environmental conditions. *Ukrainian Journal of Ecology*, 9(4): 713–718.

Ladino Rey, O.E., David Rubio, J. & Chacin Zambrano, C.A. (2016). Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. *Centro Agrícola*, 43(2): 36–41.

Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. (2014). The Genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 79: 221–288.

Morales-García, Y.E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., de la Torre, J., Martínez-Contreras, R.D., Pérez-y-Terrón, R. & Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *BioTecnología*, 14(2): 11–29.

Morejon, K.R., Moraes, M.H.D. & Bach, E.E.

- (2006). Identification of *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 247–250.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W. & Shung-Chang, J. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. Pp. 37–47 in Mueller, G.M., Foster, M.S. & Bills, G.F. (Eds.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. xviii + 777 pp.
- Panizo, M.M., Reviákina, V., Montes, W. & González, G. (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1): 35–40.
- Quintana, L., Gutiérrez, S. & Ortiz, A. (2019). Prevalence of Fungi Associated with Rice leaf spot in the main rice-growing areas in Paraguay. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(8): 60–63.
- Valencia, H.A. (2004). *Manual de prácticas de microbiología básica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. xx + 140 pp.
- Warham F. J., Butler, L.D. & Sutton, R. C. (1997). *Ensayos para la semilla de maíz y de trigo: manual de laboratorio*. Ciudad de México: CIMMYT. vi + 84 fichas (168 pp.).
- Watkins, J.E. (2004). Black Point Disease of Wheat. *University of Nebraska, NebGuide*, G1550: 2 pp.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald1, J. Z., Binder, M. & Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171–212.

Influencia del turismo para el desarrollo local en Carmelo Peralta**Influence of Tourism for the Carmelo Peralta local development**Mario Gustavo Leiva Enrique^{1,*}, Eliane Elizabeth Alderete Garcete²
& Mónica C. Balbuena Portillo²¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Tecnología de Producción, San Lorenzo, Paraguay.²Universidad Nacional de Asunción, Facultad Politécnica, San Lorenzo, Paraguay.*Autor correspondiente: mleiva137@gmail.com.

Resumen: El turismo ha adquirido un papel fundamental en el desarrollo socioeconómico de los países, ya que se considera una de las estrategias clave para impulsar el progreso de un territorio, localidad o región. La llegada de la Ruta Bioceánica en la frontera entre los municipios de Porto Murtinho -Brasil- y Carmelo Peralta -Paraguay- está generando expectativas de cambios sociales en la estructura y la vida cotidiana de estos municipios. Este trabajo es el resultado de una visita técnica realizada por integrantes de la Universidad Nacional de Asunción a la ciudad de Carmelo Peralta, y el análisis de documentos resultantes de estudios previos realizados en dicha localidad. Los datos se recopilaron en agosto de 2022, a través de observaciones en la población local, entrevistas con funcionarios públicos municipales y se complementaron con investigaciones bibliográficas y documentales. Cabe mencionar, que los autores del presente artículo participan de las actividades relacionadas con las mesas temáticas: Red de Universidades y Turismo, del Grupo de Trabajo del Corredor Bioceánico y de la Red Universitaria de la Ruta de Integración Latinoamericana -UNIRILA-. Actualmente la oferta turística de Carmelo Peralta incluye el deporte acuático, la pesca y aventura, resaltando su cercanía al Pantanal. El progreso de Carmelo Peralta como destino turístico fronterizo de alta calidad estará estrechamente ligado a la disposición de sus residentes para fomentar la promoción turística de la localidad y el compromiso y acompañamiento por parte de las instituciones y gobiernos locales y de la administración central, con la finalidad de lograr un progreso ordenado, sobre todo en lo que corresponde al uso de la tierra y el ordenamiento territorial. La puerta de entrada al Gran Pantanal es el elemento diferenciador que impulsará el desarrollo turístico en la región.

Palabras clave: Carmelo Peralta, Turismo, Pantanal, desarrollo local, Corredor Bioceánico

Abstract: Tourism has acquired a fundamental role in the socioeconomic development of countries, as it is considered one of the key strategies for promoting the progress of a territory, locality or region. The arrival of the Bioceanic Route on the border between the municipalities of Porto Murtinho -Brazil- and Carmelo Peralta -Paraguay- is generating expectations of social changes in the structure and daily life of these municipalities. This work is the result of a technical visit made by members of the National University of Asunción to the city of Carmelo Peralta, and the analysis of documents resulting from previous studies carried out in that locality. The data were collected in August 2022, through observations of the local population, interviews with municipal public officials and were complemented with bibliographic and documentary research. It is worth mentioning that the authors of this article participate in the activities related to the thematic roundtables: Network of Universities and Tourism, the Bioceanic Corridor Working Group and the University Network of the Latin American Integration Route -UNIRILA-. Currently, Carmelo Peralta's tourism offer includes water sports, fishing and adventure, highlighting its proximity to the Pantanal. The progress of Carmelo Peralta as a high quality border tourist destination will be closely linked to the willingness of its residents to encourage the promotion of tourism in the locality and the commitment and support of local institutions and governments and the central administration, in order to achieve orderly progress, especially in terms of land use and land use planning. The gateway to the Gran Pantanal is the differentiating element that will drive tourism development in the region.

Key words: Carmelo Peralta, Tourism, Pantanal, local development, Bioceanic Corridor

Introducción

En el presente artículo se describen aspectos relacionados al Turismo, la oportunidad de crecimiento

y desarrollo local que se pueden generar desde su promoción y fortalecimiento. En el caso particular, con la construcción del puente internacional de 1300

Editor responsable: Fernando José Méndez***Recibido:** 18/09/2023**Aceptado:** 20/02/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.

2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).



Figura 1. Mapa del Corredor Vial Bioceánico. Fuente: Itaipú Binacional (2019).

metros de extensión que unirá la ciudad fronteriza de Paraguay “Carmelo Peralta” con la localidad de Brasil, “Porto Murtinho” como consecuencia de la implementación del corredor vial Bioceánico (CB) -del Atlántico al Pacífico- (Fig. 1) resultado de una importante inversión, con relevancia a partir de la firma del tratado entre los países, y en auge, en la medida que avanza la construcción, es pertinente mencionar, que actualmente, se encuentra, según el reporte paraguayo reciente del Ministerio de Obras Públicas y Comunicaciones (MOPC, 2023) del Paraguay, al 27% de su etapa de obra. Juega un papel determinante en este sentido, la ubicación geográfica y estratégica de la localidad paraguaya mencionada, ya que es la puerta de entrada al país, y el inicio de la ruta terrestre hacia el destino final, los puertos del norte de Chile.

Los objetivos que aquí se plantean están relacionados con la forma que la localidad paraguaya de Carmelo Peralta puede contribuir en el desarrollo de su comunidad, mediante la participación de quienes residen en la zona, en actividades turísticas y recreativas, que en cierta medida ya se encuentran en aplicación en la ciudad, pero requieren planificación, organización y acompañamiento institucional de forma a consolidarlas y comprometer a los oferentes con servicios de calidad.

Materiales y métodos

Inicialmente, la metodología aplicada para el elaboración de este estudio, consistió en una revisión documental, accediendo a informes y documentos elaborados en el marco de los llamados a ejecución

del proyecto vial, por las diferentes entidades involucradas en esta mega arquitectura binacional, además de lectura de estudios y propuestas de planificación para el Municipio; seguidamente, con la visita *in situ* realizada a la ciudad en el año 2022 por parte de los autores, ha permitido la observación y el acercamiento a la realidad regional, y una visión integral de los avances de la obra, de manera a contar con un panorama de las condiciones e infraestructuras disponibles en esa área, concreción de entrevistas con las autoridades y residentes, que con sus aportes han nutrido y complementado el presente material.

La participación de los actores locales es fundamental para lograr las metas de desarrollo local propuestos, teniendo en cuenta que los mismos deberían de ocuparse de promover, fortalecer y ejecutar las acciones que conducen a la implementación del turismo sostenible en su comunidad. Las autoridades departamentales y nacionales a su vez deberían acompañar este proceso y ejecución, a fin de garantizar los resultados y reducir riesgos.

Resultados y discusión

Contexto de Carmelo Peralta

Carmelo Peralta es una localidad fronteriza del norte del Paraguay, ubicada en la región Occidental (Chaco), en la zona ecológica denominada “Gran Pantanal”; con categoría de municipio hace más de una década -2 de mayo de 2008, según la Ley N° 3471 (Poder Legislativo, 2008), geográficamente se encuentra a orillas del río Paraguay, colindante a la conocida Isla Margarita, frente a la comunidad brasileña de Porto Murtinho (creada en el año 1912), específicamente, a unos 730 km de Asunción, capital del país, y a unos 80 km de Fuerte Olimpo, capital del departamento de Alto Paraguay (BID, 2022).

Según la proyección poblacional del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2015) para el periodo 2025 contaría con aproximadamente 4.800 habitantes mayoritariamente hombres, compuesto por naturales de la zona, indígenas nativos (ayoreos) y brasileños, distribuidos en sus 13 comunidades, de las cuales 10 de ellas son rurales. Entre los habitan-

tes de la zona urbana predomina la comunicación en castellano (61.6%), en castellano y guaraní (22.6%), y además de los dos anteriores en idioma portugués (8%), una minoría de 2.3% solo en guaraní. En cuanto a la ocupación productiva de sus pobladores, sobresale el empleo en la función pública de salud, educación, trabajos en las estancias de la zona o negocios propios, también hay mano de obra ocupada en diversos servicios en la localidad de Porto Murinho. El 32.8% se declara asalariado y el 67.2 % trabaja por cuenta propia (Municipalidad de Carmelo Peralta, 2023).

En los últimos años, a partir de la firma del acuerdo para la construcción del puente transfronterizo entre el Paraguay y el Brasil, ha tomado fuerza el nombre del lugar, dada su ubicación privilegiada, por ser el primer punto de conexión y de contacto en Paraguay, desde Porto Murinho, estado de Mato Grosso do Sul, en Brasil, haciendo el camino terrenal pasando por Argentina, con destino a los Puertos del Norte de Chile que forman parte del corredor vial Bioceánico del centro de América del Sur, que unirá el océano Pacífico con el Atlántico; por lo mismo, con certeza requerirá acondicionar este territorio, ya que necesariamente tendrá que adaptar su gestión integral como ciudad de frontera, en todos los ámbitos, para obligatoriamente sumarse a este magno proyecto con servicios de buena calidad.

La importancia de Carmelo Peralta se evidencia en los estudios recientes en el año 2022, auspiciados en el marco del programa Ciudades Emergentes y Sostenibles (CES) del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), secundado por organismos nacionales públicos, privados y académicos, donde primeramente, diagnosticaron las condiciones actuales de la ciudad, para luego analizar diferentes aspectos que atañen al crecimiento y al desarrollo que pueden generarse a partir de su incorporación geográfica, al inicio de esta ruta transnacional. Asimismo, otras acciones promovidas con anterioridad por agencias de cooperación como la Unión Europea o la Organización Mundial de Conservación (WWF-Paraguay) ante la riqueza natural existente, destacan la preocupación por el cuidado del medio

ambiente de la zona.

El avance de las obras viales con pavimentación asfáltica de dos carriles desde Loma Plata, en la actualidad, permite acceder a la zona sin mayores contratiempos, abriendo de esta forma oportunidades de comunicación terrestre más fluida y con menos horas de tránsito para llegar hasta allí; sin embargo, un factor fundamental a considerar por los gobiernos local y nacional, sería la inmediata implementación del Plan de Ordenamiento Urbano y Territorial (POUT), que se encuentra aprobado por Ordenanza Municipal, que permitirá la planificación urbana de la ciudad y la gestión territorial, ya que su aspecto de comunidad rural con caminos vecinales de tierra, es la constante; aunque, con una apariencia mínima de zona urbana en el casco central; una vez habilitado el corredor vial de acuerdo a lo previsto, tiende a verse afectada, con más contundencia el área de la costanera, con inapropiadas instalaciones de viviendas y comercios de todo tipo, que no favorecerían su urbanización sostenible.

La comunidad de Carmelo Peralta en lo que respecta a la asistencia de servicios públicos, cuenta con oficinas de la Intendencia Municipal, Comisaría policial, 3 puestos de Salud y 2 unidades de Salud Familiar y 1 unidad sanitaria del Instituto de Previsión Social (IPS) de atención básica, puestos de control migratorio fluvial de la Subadministración de la Dirección Nacional de Aduana (DNA), 8 centros educativos y un centro de formación dependiente de la Municipalidad para capacitar niños y jóvenes, así como cursos ofertados por el Sistema Nacional de Formación y Capacitación Laboral (Sinafocal) y el Servicio Nacional de Promoción Profesional (SNPP) en áreas de informática, carpintería, electricidad y otros oficios; además, dispone de servicios básicos de energía eléctrica (97,9 % de cobertura), agua potable (96 %), la conectividad tecnológica es muy baja, insuficiente capacidad con relación a otras ciudades de la zona (BID, 2022; Municipalidad de Carmelo Peralta, 2023); considerando estos aspectos, el turismo, mediante estrategias de desarrollo local y sostenible, puede dinamizar el territorio en lo económico, sociocultural y ambiental, contemplando todos los factores que en

él intervienen, convirtiéndose en una interesante posibilidad para la ciudad.

El turismo como factor de desarrollo local

Revisando datos e informes sobre el turismo en las últimas décadas, es un tema recurrente desde diferentes aristas, sobre todo por sus aportes a las economías locales y de los países, así como los impactos transversales que ocasiona; la Organización Mundial de Turismo (OMT) ante estas situaciones, hace referencia a “un fenómeno social, cultural y económico” (s.f.) originado por el desplazamiento de las personas fuera de su lugar de residencia, dentro de un país o a las afueras de éste, independiente del motivo que los genere: personal, profesional u ocio, que suponen un gasto enmarcado como turístico, ya que este viajero o turista, adquiere determinados bienes y servicios, como consecuencia de su traslado y las necesidades que se le presentan en el destino escogido; durante la pandemia de Covid19 dejó en evidencia la magnitud y el alcance del rubro para muchas ciudades y países que reciben a los turistas diariamente.

La actividad turística en ese periodo tuvo un descenso abrupto en el desplazamiento de turistas alrededor el mundo, dejando explícito cuán importante resulta el turismo en muchas comunidades, las implicancias y los efectos negativos en las localidades turísticas, fueron contundentes; afectó directamente disminuyendo empleos, además de las ventas de los servicios asociados (alojamiento, aerolíneas, alquileres de transportes terrestres y fluviales, alimentos y bebidas, obsequios y *souvenirs*), y repercutió negativamente a un sinnúmero de proveedores indirectos vinculados con sus ofertas de bienes y servicios (OMT, s.f.; OIT, 2020).

En el caso de Paraguay, los datos estadísticos oficiales según el Observatorio Turístico, ubica al Turismo en el sexto lugar entre los productos de exportación del país, y también durante la Pandemia se vio afectado en el flujo de personas que ingresó al territorio nacional por las diferentes vías de acceso, que, de recibir a 1.245.615 turistas en el año 2019, en el año 2021, recibió a 94.846 turistas, debido a las restricciones sanitarias establecidas

mundialmente (SENATUR, 2023a).

Sin embargo, es oportuno resaltar que mediante estrategias y programas para promocionar Paraguay como destino turístico, antes y durante la propagación del SARS-CoV-2, las políticas de Estado que se ocupan de este campo se encuentran fijadas en el Plan Maestro de Desarrollo Sostenible del Turismo promovido por la Secretaría Nacional de Turismo (SENATUR) hace más de una década, y gozan del acompañamiento de asociaciones y gremios del rubro, así como los prestadores de servicios; Paraguay, ha venido aunando esfuerzos por integrar los recursos tangibles e intangibles disponibles a nivel local, departamental y nacional, inclusive, de manera a consolidarse como un referente turístico en América del Sur, a pesar de la mediterraneidad que le caracteriza, aprovechando sus recursos naturales y culturales, a modo de contribuir en la valorización y potenciamiento en materia turística.

En tal sentido, el turismo ha tomado un rol protagónico en las comunidades tanto rurales como urbanas del país, dejando notar que las dinámicas especialmente de las comunidades rurales han cambiado en los últimos años; a pesar de que numerosas localidades durante la Pandemia Covid19 se vieron obligadas a flexibilizarse, adaptarse y abrirse a los nuevos mercados de consumo y formas de gestionar los recursos existentes, aún requieren reforzar estas dimensiones, de manera responsable y comprometida, con miras al crecimiento y desarrollo local de un territorio en particular, apoyados en la actividad turística.

El desarrollo local entendido por Casalis como el “...producto de una construcción colectiva a nivel local, que tiene como objetivo movilizar los recursos del territorio en torno de un proyecto común e incluir al conjunto de la población” (2009, n/d) considera también como otros autores que abordan la temática, que es un proceso endógeno de la comunidad en cuestión, donde se pretende el mejoramiento de la calidad de vida y el bienestar de las personas que habitan un determinado territorio desde adentro; bajo esta premisa, es una necesidad que quienes constituyen la comunidad de Carmelo Peralta, estén inmersos en la proyección económica,

social, ambiental y cultural que se quiere auspiciar a partir del corredor vial Bioceánico, una realidad imperiosa de observarse, y que debería encaminarse hacia acciones sostenibles del Municipio.

La tendencia de que los Estados debían intervenir las cuestiones de desarrollo local de una entidad, ha quedado en gran medida modificada en los años 90, por la descentralización de acciones y políticas; hoy día, la tendencia está marcada por la participación de los integrantes de las comunidades locales (autoridades, sociedad civil, empresas privadas, instituciones educativas, sanitarias, entre otros), considerándose fundamental, de manera a detectar las necesidades, obtener el compromiso, la integración y la cooperación de los residentes locales, para adaptarse a los cambios social, económico, cultural, ambiental y tecnológicos que este tipo de operaciones, necesariamente generan; de esa forma, reducir las desigualdades que pudieran darse desde una directriz vertical.

Si bien los beneficios económicos y de expansión pueden llegar a ser auspiciosos para una localidad, a su vez se pueden originar situaciones de las cuales no todos puedan beneficiarse, ocasionando consecuencias negativas en las comunidades existentes (Boisier, 2001). Asimismo, el acompañamiento del Estado es trascendental, con miras a proyectar no solo ese espacio físico, sino todo el gran trayecto del Chaco paraguayo que se atraviesa y conduce para llegar al océano Pacífico. Considerando estos puntos, el turismo es una oportunidad, que requiere conjugar una serie de elementos que permitan concretar su implementación, teniendo en cuenta la transversalidad social y económica con la que sucede.

El informe "Turismo y Atenuación de la Pobreza" de la Organización Mundial del Turismo (OMT, 2003), destaca que el turismo ofrece ventajas significativas para los países subdesarrollados. Estas ventajas incluyen:

- a) El consumo turístico se produce en el lugar de origen, lo que significa que los turistas gastan su dinero en el destino visitado, lo que puede impulsar la economía local.

- b) No existen barreras arancelarias significativas para las exportaciones tradicionales de los países en desarrollo.
- c) El turismo es una actividad que aprovecha los recursos locales, como el paisaje natural y cultural, para atraer a los visitantes.
- d) El turismo requiere una cantidad significativa de mano de obra, lo que puede generar empleo en comunidades locales.
- e) Para satisfacer las necesidades de los turistas, es probable que se mejoren la infraestructura y los servicios en la zona. Esto puede incluir la construcción o mejora de carreteras, aeropuertos, hospitales, escuelas y sistemas de agua y saneamiento.
- f) Fomentar la valoración y preservación de la cultura local y el patrimonio histórico.
- g) En esta actividad, hay una mayor proporción de puestos de trabajo ocupados por mujeres en comparación con otros sectores, lo que puede contribuir a la igualdad de género y al empoderamiento de las mujeres.

Estas ventajas resaltan la importancia del turismo como motor económico y social en los países en desarrollo, y cómo puede contribuir a la reducción de la pobreza y al desarrollo local y sostenible.

Según el informe del BID (2022) las ciudades fronterizas son consideradas como una oportunidad de promover el turismo para hacer compras minoristas, acceder a ofertas gastronómicas y al servicio de alojamiento. En el caso de Carmelo Peralta, la actividad turística puede tener una influencia significativa en el desarrollo local, debido a su condición territorial, dando lugar a oportunidades económicas, sociales y culturales para la comunidad, además de promover un crecimiento sostenible

Es primordial destacar que el turismo debe gestionarse de manera sostenible y respetuosa con el entorno. Cabe mencionar que, con la construcción del Corredor Bioceánico, que unirá los océanos Atlántico y Pacífico, a través de territorios de Brasil, Paraguay, Argentina y Chile, permitirá mejorar las perspectivas de desarrollo en Paraguay, convir-

tiéndose en un centro logístico regional de suma importancia. La primera fase de la ruta del CB, unos 277 km, está culminada de Carmelo Peralta a Loma Plata, lo que propiciaría el crecimiento local, la posibilidad de comercializar productos y servicios. Considerando el alto potencial de cambios que se generarán con la implementación de esta importante infraestructura que abrirá las puertas no solo a la zona de influencia, sino a todo un país. El proceso de descentralización municipal es una oportunidad para quien ejerza un buen liderazgo, aquél que trabaje por involucrar a todos los sectores que componen la sociedad local, con la finalidad de operacionalizar la economía, por ende, las actividades turísticas, por supuesto, en el marco del cuidado sostenible del ambiente, de sus recursos naturales y ponderando su excelente localización (CIF-OIT, 2023).

Actualmente, la pesca turística es un tipo de actividad recreativa que se desarrolla en la ciudad “la comunidad de Isla Margarita se dedica mayoritariamente a la venta de insumos de pesca y de artesanías” (BID, 2022, pp 87) y otras actividades acuáticas que hacen parte de la ocupación turística que se realiza en Carmelo Peralta.

Oportunidades para el desarrollo del turismo en el Chaco paraguayo

El turismo, al ser un fenómeno social, delinea las conductas de quienes se ven inmersos en él, generando beneficios para algunos, y disconformidades para otros; por lo mismo, es innegable el impacto social, cultural y económico que genera en la sociedad donde acontece, contribuye en la sociedad donde se ocasiona, y se constituye en “una pieza fundamental para el desarrollo urbanístico y tecnológico en la modernización de los pueblos” (Medina, 2011, n/d) que a la vez enriquece, y genera modificaciones en las actitudes sociales en esa interrelación, sosteniendo de esta forma, que en comunidades urbanas y rurales distantes como las del Chaco Occidental, puede provocar cambios significativos en la forma de vida que allí se origina.

Justamente, estas características hacen mención Segrado y Balbuena (2022) señalando que, “La

combinación única de naturaleza y múltiples grupos sociales con sus lenguas y culturas propias, por motivos migratorios o como etnias originarias, ha creado una concentración multicultural que tiene el potencial de ser atractivo turístico y favorecer en aspectos socioeconómicos a las comunidades locales...” (pp 28) invitando de esa forma a descubrir estos espacios que tienen mucho por ofrecer con su particularidad y características propias debido a la multiculturalidad que deviene de pueblos originarios indígenas, inmigrantes menonitas, descendientes de éstos y personas procedentes de otras regiones del Paraguay.

Es así que, las comunidades menonitas económicamente exitosas, provenientes de la unión soviética en las primeras décadas del Siglo XX, instaladas en Filadelfia, Loma Plata y Neuland (Figs. 2 y 3), han tenido que adaptarse a las realidades y necesidades para promover el intercambio comercial y cultural en la región, lo que hace suponer que era imprescindible contar con infraestructura turística en las colonias, dando valía a estas ciudades, ofreciendo espacios y comodidades para quienes deseen hacer negocios y conocer las áridas e inhóspitas tierras del Chaco, facilitando su breve permanencia por esos sitios. Generalmente reciben tres segmentos de visitantes: estudiantes nacionales de nivel secundario y universitario, con interés educativo, histórico y cultural sobre la zona; familiares y amigos nacionales o extranjeros de los menonitas que por negocios y comercio acuden al lugar; por último, turistas internacionales quienes provienen con fines recreativos y de aventura (Segrado y Balbuena, 2022).

Al respecto, se suma al interés de quienes llegan a la zona, una experiencia vivencial y de gran expectativa impulsada en el Chaco Central, específicamente en Loma Plata donde desde hace varios años se vienen promoviendo actividades relacionadas con las labores industriales que se desarrollan en el sitio. La interesante y singular “Ruta de la leche” forma parte de uno de los atractivos turísticos de la región, insertando un itinerario por las fábricas de lácteos Trébol, acompañados de guías locales capacitados quienes van explicando



Figuras 2-3) Puntos de interés de la ruta bioceánica. 2) Portal de la Libertad, Filadelfia. 3) Expo Rodeo Trébol, Loma Plata.

todo el proceso de la elaboración de este producto hasta llegar al consumidor.

Además, se incorpora la visita a frigoríficos, la propuesta de recorridos culturales por museos, sitios históricos e iglesias de la década del 40 donde se exhiben diversos elementos, decorativos, de uso

doméstico e industrial, equipos, muebles, atuendos de la época, cartas, notas y fotografías, entre otros vestigios del inicio de la colonización de los menonitas en estas tierras; igualmente, se pueden acceder a museos de alta riqueza natural, en los que se encuentran muestras interesantes y fascinantes de insectos, animales domésticos y silvestres de la zona; para los más intrépidos, se ofrece visitar la Laguna Capitán, una reserva natural de agua salada vistosa y admirable por la cantidad de aves que allí se posan, además se puede realizar senderismo y acampar en el sitio; al mismo tiempo, en esta área como se encuentra cerca, conocer el Fortín Isla Po'í, un sitio histórico de la Guerra del Chaco.

Una alternativa moderna de hacer turismo, ubicada desde la ruta de acceso a Filadelfia, es el “Centro de Interpretación del Gran Chaco Americano”, inaugurado en el año 2020, donde se conjugan naturaleza, historia, arquitectura y tecnología sostenible. Un espacio de amplios cristales, rodeado de tremendos árboles de samu'ú adentra a quienes lo visitan a una exposición museográfica permanente, de la evolución de los pueblos originarios, fauna y flora de la zona, hasta la actualidad, permitiendo una mirada de la multiculturalidad existente a través de materiales autóctonos e imágenes y sonidos empleando tecnología multimedia (SENATUR, 2023b; Municipalidad de Filadelfia, 2020).

La actividad turística en Carmelo Peralta

Actualmente, la oferta turística de Carmelo Peralta se destaca por deportes acuáticos de pesca y aventura, su cercanía con el Pantanal y todo el compendio cultural indígena que cuenta, así como el servicio de traslado en taxi-lanchas a Porto Murinho, el barco-hotel que permite recorrer y permanecer sobre el río Paraguay, se constituyen en una magnífica oportunidad para potenciar el turismo en la zona, además dar origen a la posibilidad de que se sume el desarrollo de playas para esparcimiento y recreación de los que visitan la ciudad (Municipalidad de Carmelo Peralta, 2023).

Si bien, las actividades turísticas se llevan a cabo aparentemente, con cierta informalidad, es menester acompañar su progreso mediante un acercamiento

quizás de las autoridades locales con miras a formalizar el trabajo, acercándose a quienes se ocupan de ofrecer los diferentes servicios detallados, con la finalidad de recabar información precisa sobre las dificultades que sortean cada día para realizar sus labores, por ejemplo, las condiciones y la capacidad de las lanchas permitidas, el uso de protectores salvavidas, controles de la marina costera brasileña, restricciones, entre otros.

A los mencionados atractivos turísticos se le podría incorporar la experiencia con las comunidades indígenas aledañas de Carmelo Peralta, potenciando espacios culturales para la difusión y promoción de las artesanías elaboradas por la Asociación de artesanas de Ayoredie, donde también se faciliten datos e informaciones sobre las características originales de estos pueblos, las tradiciones, a modo de conservar y mantener en la memoria sus formas de vida y proyectar la cultura de la zona, desarrollando de esta manera el turismo comunitario o antropológico, para construir una antropología del turismo es necesario conocer lo sagrado, el mito, la ritualidad, el símbolo, el imaginario, la arquitectura, la gastronomía (Escalante y Carrol, 2013), con la posibilidad de revitalizar la comunidad, con un enfoque positivo para el desarrollo turístico, siempre y cuando se realice de manera cuidadosa y respetuosa hacia la comunidad local, buscando el beneficio mutuo.

De manera a cobijar a los turistas, la ciudad posee en el casco urbano un hotel de 32 habitaciones dobles con baño, TV cable, restaurante sencillo, con menú de desayuno y comidas caseras, no solo para sus huéspedes, sino para quienes lleguen a Carmelo Peralta, siendo así una de las alternativas de locales gastronómicos del lugar; además, se puede descansar en otras 2 unidades de alojamiento, localizadas en las afueras de la ciudad; contrastando así con la vecina ciudad de Porto Murтинho donde existen más y variados tipos de alojamiento.

Ante estas características descritas, incentivar la promoción turística de la ciudad mediante un calendario de capacitaciones con la participación de sus residentes, sean autoridades de los organismos locales y departamentales, así como la sociedad

civil, de manera a integrarse al proyecto. El fortalecimiento de la Ciudad de Carmelo Peralta como un destino turístico de frontera con calidad, requiere del compromiso de todos sus habitantes.

Por su parte, la SENATUR como órgano promotor, facilitador y regulador del desarrollo del Turismo en el Paraguay, podría promover actividades que conduzcan a enmendar las debilidades y robustecer las fortalezas turísticas que fueron detectadas de forma general, en estudios realizados por el BID y otros del mismo tenor, apoyándose en estrategias comunicativas permanentes, a través de capacitaciones formativas iniciales y luego periódicas de la población de Carmelo Peralta, para comprender la importancia de la actividad turística, la oferta de servicios de calidad y con responsabilidad, teniendo en cuenta el elevado tránsito de personas y vehicular que se van a generar a partir de la habilitación del puente. Para satisfacer la alta demanda se requerirán de hospedajes, estaciones de servicios, puestos sanitarios, puestos de alimentos y bebidas, tiendas de conveniencia, incluso informaciones turísticas.

Así también, en coordinación con el Municipio, fomentar la utilización de los medios tradicionales de comunicación más difundidos, (cualquiera de sus 3 radioemisoras locales) como los tecnológicos para brindar datos, informaciones e imágenes actualizadas de la zona (CIF-OIT, 2023; Municipalidad de Carmelo Peralta, 2023).

Según Basso y De Souza (2021) la situación fronteriza entre Carmelo Peralta y Puerto Murтинho complejiza y enriquece en lo que respecta al intercambio cultural, la variedad lingüística y consecuentemente, las demandas sociales. Esta diversidad cultural como vecinos internacionales, es positiva desde el punto de vista del turismo, y una vez culminada la construcción del puente que conectará ambas localidades de Paraguay y Brasil, y se dé un flujo continuo de personas y mercancías, se observará un desarrollo significativo de la comunidad.

Conclusiones

El recorrido de más de 3000 km de carretera que atraviesa 4 países y las ciudades de Campo Gran-

de – Porto Murtinho (Brasil) – Carmelo Peralta – Mariscal Estigarribia – Pozo Hondo (Paraguay) – Misión La Paz – Tartagal – Jujuy – Salta (Argentina) – Sico – Jama – Puertos de Antofagasta – Mejillones – Iquique (Chile) es una de las más grandes obras a nivel de conexión rutero regional, que tiene como finalidad el mejoramiento sustancial de la logística del tránsito fronterizo y comercial de bienes y personas, con el consecuente aumento de infraestructura y servicios con su implementación (Conexión INTAL, 2017).

La construcción del corredor bioceánico tendrá un impacto en el mediano y largo plazo, una vez que se concreten los tramos previstos, con el consecuente tráfico de mercancías y personas; hasta ahora, este corredor vial no ha generado flujos adicionales ni de gran magnitud. Se espera que la culminación del puente que conecta Carmelo Peralta y Porto Murtinho propicie el aumento significativo en la circulación y la demanda de servicios hacia las ciudades del Chaco paraguayo.

Ante la cercana materialización del puente, es



Figuras 4-5) Gestión y obras en Carmelo Peralta. 4) Comitativa mesa de trabajo CB y autoridades locales de Carmelo Peralta. 5) Construcción del puente Internacional con Brasil, localidad Carmelo Peralta.

sumamente necesario reforzar el trabajo mancomunado de los actores involucrados en la zona de influencia (gobierno local y nacional, sociedad civil, sector empresarial, ONG, entre otros) a fin de mitigar los efectos que este tipo de obras genera (Figs. 4 y 5), no solo cambios en el diseño del espacio geográfico, sino múltiples aspectos que derivan de su ejecución y que han sido observados en el estudio previo realizado. La revisión de los puntos destacados en los informes presentados y la planificación del desarrollo de programas y actividades debe ser una constante desde ahora, para paliar los posibles embates demográficos, culturales, sociales, ambientales que se pueden dar con la habilitación de este tránsito rutero internacional, sin embargo, puede resultar una oportunidad muy interesante para el incentivo de un turismo sostenible con la participación de la comunidad local, apoyados en estrategias definidas y proyectadas con las autoridades pertinentes, de manera a tener una visión clara y concisa al respecto, antes del arribo masivo de visitantes a Carmelo Peralta.

La SENATUR como entidad coordinadora del Sistema Nacional de Turismo, a través de los desafíos dispuestos en el Plan Maestro de Desarrollo del sector turístico del país 2023-2030, podría brindar el soporte y la orientación, además del acompañamiento con acciones vinculadas para el fomento del desarrollo sostenible que requiere la implementación de este Corredor Vial Bioceánico.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

BID [Banco Interamericano de Desarrollo]. (2022). Carmelo Peralta, en la frontera del desarrollo: plan estratégico de acción.

- Asunción: BID, FACEN-UNA, MUVH, Gobierno Nacional & Municipalidad de Carmelo Peralta. 319 pp.
- Basso, J.D., & de Souza Ferretti, V.A. (2021). Impactos de la Implementación del Corredor Vial Bioceánico en la Educación escolar en la frontera Brasil/Paraguay: conociendo el contexto. *Interações*. 22(4): 1197-1212. <<https://doi.org/10.20435/inter.v22i4.3423>>.
- Boisiera, S. (2001). Desarrollo (Local): ¿De qué estamos hablando? Pp. 48-74, in Vásquez, A. & Madoery, O. (Eds.). *Transformaciones globales, instituciones y políticas de desarrollo local*. Rosario: Editorial Homo Sapiens. 286 pp.
- Casalis, A. (2009) ¿Qué es el desarrollo local y para qué sirve? *CEDEL: Centro de Estudios para el Desarrollo Local*. Febrero 2009: 3 pp.
- CIF-OIT (2023). *Curso de Turismo sostenible y desarrollo local en áreas rurales*. Turín: Centro Internacional de Formación de la Organización Internacional del Trabajo. [Consulted: 11.vii.2023]. <<https://www.itcilo.org/es/courses/curso-certificado-en-turismo-sostenible-y-desarrollo-local-en-areas-rurales-0>>.
- Conexión INTAL [Instituto para la Integración de América Latina y el Caribe]. (2017). Desde San Pablo en Brasil hasta los puertos chilenos de Antofagasta y Mejillones se proyecta una conectividad que recorre más de 3.000 Km de carreteras atravesando cuatro países. *Conexión INTAL*. Buenos Aires: BID-INTAL. [Consulted: 31.v.2023]. <<https://conexionintal.iadb.org/2017/07/11/corredor-vial-entre-el-atlantico-y-el-pacifico/>>.
- Escalante, M. & Carrol, I. (2013). Antropología y turismo. *Cuicuilco*: 20(56): 249 - 259.
- INE [Instituto Nacional de Estadística]. (2015). *Proyecciones de Población*. Asunción: INE. [Consulted: 6.vi.2023]. <<https://www.ine.gov.py/microdatos/index.php?cant=27&tema=Proyecciones%20de%20Poblaci%C3%B3n>>.
- Itaipú Binacional. (2019). Para fortalecer conectividad se revisarán pliego de bases y condiciones del puente bioceánico. *Itaipú Binacional Noticias*. [Consulted: 6.vi.2023]. <<https://www.itaipu.gov.br/es/sala-de-prensa/noticia/para-fortalecer-conectividad-se-revisaran-pliego-de-bases-y-condiciones-del-p>>.
- Poder Legislativo. (2008). *Ley N° 3471: que crea el municipio de Carmelo Peralta en el XVII departamento Alto Paraguay y una municipalidad con asiento en el pueblo de Carmelo Peralta*. Asunción: Congreso de la Nación Paraguaya. 4 pp.
- Medina, J.A. (2011). Los efectos socioculturales del turismo. *TURyDES*, 4(9): 4 pp.
- Morínigo, F. (2018) Retrospectiva y perspectiva del turismo en Paraguay. Pp. 114-127, in Curso de Graduação em Relações Internacionais e Integração (Org.). *Anais da III Semana Acadêmica de Relações Internacionais da UNILA*. 144 pp.
- MOPC [Ministerio de Obras Públicas y Comunicaciones]. (2023). Con más de 27% de ejecución, el puente de la Bioceánica avanza en sus diferentes frentes. *MOPC Noticias*, 8.ii.2023. Asunción: Ministerio de Obras Públicas y Comunicaciones. [Consulted: 31.v.2023]. <<https://www.mopc.gov.py/index.php/noticias/con-mas-de-27-de-ejecucion-el-puente-de-la-bioceanica-avanza-en-sus-diferentes-frentes>>.
- Municipalidad de Carmelo Peralta (2023). Plan de Ordenamiento Urbano Territorial: Municipalidad de Carmelo Peralta. Asunción: UE, WWF-NL & PaCha.
- Municipalidad de Filadelfia. (2020). El Centro de interpretación del Gran Chaco Americano se suma a las riquezas naturales y la multiculturalidad de la Región Occidental o Chaco. Filadelfia: *Municipalidad de Filadelfia, Últimas Noticias*, 13.viii.2020. [Consulted: 11.vii.2023]. <<https://www.filadelfia.gov.py/2020/08/13/el-centro-de-interpretacion-del-gran-chaco-americano-se-suma-a-las-riquezas-naturales-y-la-multiculturalidad-de-la-region-occidental-o-chaco/>>.

- OIT [Organización Internacional del Trabajo]. (2020). El impacto de la COVID-19 en el sector del turismo. *Notas Informativas de la OIT*, 25.vi.2020. 10 pp.
- OMT [Organización Mundial del Turismo]. (2003). *Turismo y atenuación de la pobreza*. Madrid: Organización Mundial del Turismo. 119 pp.
- OMT [Organización Mundial del Turismo]. (2004). *Turismo y atenuación de la pobreza: recomendaciones para la acción*. Madrid: Organización Mundial del Turismo. 47 pp.
- SENATUR [Secretaría Nacional de Turismo]. (2019). *Plan Maestro de desarrollo sostenible del sector turístico del Paraguay 2019-2026*. Asunción: SENATUR. 231 pp.
- SENATUR [Secretaría Nacional de Turismo]. (2023a). Plan Maestro de desarrollo sostenible del sector turístico del Paraguay 2023-2030. Asunción: SENATUR. 189 pp.
- SENATUR [Secretaría Nacional de Turismo]. (2023b). Centro de Interpretación del Gran Chaco Americano. Vista General. *Visita Paraguay*. Asunción: SENATUR. [Consulted: 11.vii.2023]. <<https://visitaparaguay.com.py/lugar/552/centro-de-interpretacion-del-gran-chaco-americano>>.
- Segrado, R. & Balbuena, M. (2022). Multietnicidad como atracción turística del Chaco Paraguayo: Periodo 2020-2030. *Población y Desarrollo*, 28(52): 26-41.

Gestión de una fuente radiactiva de Sr⁹⁰ en desuso en la Comisión Nacional de Energía Atómica. Aspectos técnicos de seguridad radiológica

Management of a disused Sr⁹⁰ radioactive source at the National Atomic Energy Commission. Technical aspects of radiological safety

Richard Florentín Cano¹, Fredy Doncel Invernizzi^{1,2,*} & Francisco Navarro¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Comisión Nacional de Energía Atómica, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: fredydoncelinvernizzi@gmail.com.

Resumen: Fue realizado el gestionamiento de una fuente radiactiva de Sr⁹⁰ en desuso para su posterior acondicionamiento en el Laboratorio de Gestión de Fuentes en Desuso (LAGEFUDE) de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Se detalla los procedimientos para el manejo correcto de la fuente durante el desmontaje, el monitoreo para descartar contaminación, hasta el acondicionamiento final en el almacén temporal de fuentes radiactivas.

Palabras clave: *fuentes radiactivas; estroncio Sr⁹⁰; desmontaje.*

Abstract: The management of a radioactive source of Sr⁹⁰ in disuse was carried out for its subsequent conditioning at the Laboratory for the Management of Disused Sources (LAGEFUDE) of the National Commission of Atomic Energy. It details the procedures for the correct handling of the source during disassembly, monitoring to rule out contamination, until the final conditioning in the temporary storage of radioactive sources.

Key words: *radioactive sources; strontium Sr⁹⁰; dismantling.*

Introducción

La utilización de fuentes radiactivas selladas con fines pacíficos ha permitido obtener enormes beneficios en los diferentes ámbitos de aplicación de las radiaciones ionizantes en el país. Sin embargo también es cierto que una vez que finalice el período de vida útil de las mismas es muy importante realizar una buena gestión y sobre todo una gestión segura de estas fuentes radiactivas de modo a acondicionarlos en un almacén centralizado como deposición final (Rentería Villalobos, 2003; Fernández Niello, 2005) o en el caso de Paraguay en un almacén temporal como lo es el Laboratorio de gestión de fuentes radiactivas en desuso (LAGEFUDE) con el que cuenta la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

En este trabajo se ha realizado la gestión segura de una fuente radiactiva en desuso de Sr⁹⁰ que fue utilizado en su momento para realizar el chequeo operacional de los dosímetros termoluminiscentes de Fluoruro de litio del Laboratorio de Dosimetría Personal de la CNEA teniendo en cuenta princi-

palmente los aspectos de protección radiológica durante la gestión de la fuente radiactiva.

Radiactividad artificial

En enero de 1934 los esposos Curie-Juliot anunciaron el descubrimiento de la radiactividad artificial. Al bombardear B, Mg y Al con partículas alfa hallaron que, al sacar la fuente, el blanco continuaba emitiendo partículas ionizantes. El Al emite protones siendo el producto final el Si³⁹ estable y también neutrones, según la reacción $Al^{27}(\alpha, n)P^{30}$

Los esposos Curie-Juliot establecieron cuidadosamente la naturaleza química de los cuerpos artificialmente radiactivos que encontraron. En la actualidad es posible producir núcleos inestables en todo el sistema periódico mediante el bombardeo con partículas cargadas (Blackwood *et al.*, 1965; Leo, 2012).

Radionucleido Estroncio 90 (Sr⁹⁰)

El estroncio 90 es un isótopo obtenido artificialmen-

Editor responsable: Fernando José Méndez*

Recibido: 22/11/2022

Aceptado: 24/07/2024

*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



Tabla 1. Características del equipo con fuentes radiactivas en desuso.

Marca	Type N°	N° de serie	Procedencia	Tension de operación
Vinten Instruments	623	6-3	Great Britain	220 Voltios

te con un periodo de semidesintegración de 28.5 años. Este decae por emisión de un electron con máximo de 546 keV (decaimiento beta) en ytrio 90. Este decae con un periodo de semidesintegración de 64.1 hs por decaimiento beta con una energía máxima de 2274 keV (NCBI, 2024).

El Sr⁹⁰ es uno de los constituyentes más importantes de los residuos de radiactividad media. Por consiguiente es necesario realizar un inventario preciso de este radionucleido para el almacenamiento de este tipo de residuos. El Sr⁹⁰ tiene un periodo de semidesintegración de 28.1 años siendo un emisor puro de partículas beta con una energía máxima de 546 keV. Su mecanismo primario de producción es por fisión de neutrones térmicos del U²³⁵ y el Pu²³⁹ presentes en los reactores nucleares. El Sr⁹⁰ se desintegra como Y⁹⁰ el cual decae en un 99.98% por emisión de partículas beta con una energía máxima de 2283 keV. El periodo de semidesintegración del Y⁹⁰ es de 64 hs, estando en equilibrio con el Sr⁹⁰, y siendo esta una característica y útil característica para la medida de las muestras que contengan Sr⁹⁰ (Rodríguez Alcalá, 1997).

Fuentes radiactivas en desuso

Una fuente radiactiva sellada es un recipiente de material radiactivo encapsulado, que tiene normalmente el aspecto de una pequeña e inocua pieza de metal. La capsula o el material de la fuente sellada es lo suficientemente resistente para conservar su estanqueidad en las condiciones de uso para las que fue diseñada originalmente y también ante posibles percances. Las fuentes radiactivas selladas se

utilizan en diferentes aplicaciones en la medicina, la agricultura, la industria, el transporte, la construcción, la geología, la minería y la investigación.

Por fuentes en desuso se entienden las fuentes que han dejado de utilizarse y que no se tienen intención de volver a utilizar en las prácticas para las que fueron utilizadas. Las fuentes gastadas que ya no pueden utilizarse para sus fines previstos a consecuencia del decaimiento radiactivo forman un subconjunto de fuentes en desuso. OIEA (2018).

Materiales y métodos

La metodología de trabajo fue realizada en diferentes etapas, en primer lugar se procedió al desmontaje de la fuente radiactiva en desuso de Sr⁹⁰, que estaba alojada dentro del equipo Vinten Instruments. En la Tabla 1 se puede encontrar información sobre las características del equipo que alojaba la fuente radiactiva de Sr⁹⁰ que se pretende gestionar en forma segura a fin de que la misma pueda ser acondicionada en el almacén temporal de fuentes en desuso.

En la Tabla 2 se puede encontrar información sobre la fuente radiactiva de Sr⁹⁰ que va a ser gestionada a fin de que la misma pueda ser almacenada en forma segura en el almacén transitorio.

Condiciones del equipo:

El equipo actualmente se encuentra en desuso por obsolescencia y por decaimiento de las fuentes radiactivas que se encuentra fuera de rango de dosis que entrega para el chequeo operacional de los dosímetros termoluminiscentes.

Tabla 2. Datos Técnicos de las fuentes radiactivas.

Ubicación de la fuente	N° de serie	Actividad (mCi)	Fecha de Medicion	Actividad (mCi) en (01/09/2022)
Superior	1098Bc	1	09/01/1984	0,4
Inferior	1099Bc	1	09/01/19884	0,4

Desmontaje:

Previo al desmontaje, se procede a realizar el monitoreo correspondiente.

- Con detector de monitoreo tipo Geiger Muller se procede a realizar un levantamiento radiométrico con el objeto de contar con lectura de referencia basal y de esa manera se corrobora en caso de que la fuente radiactiva quede al descubierto de su blindaje.
- Seguidamente se procedio a realizar otro monitoreo , esta vez para descartar contaminación superficial utilizando un detector de contaminación tipo contador proporcional para asegurar que no haya pérdida de hermeticidad de las fuente radiactiva en desuso de Sr⁹⁰.

Una vez que se verificó la condición segura de la no existencia de contaminación radiactiva, se procede al desmontaje:

- Se procede a destornillar los cuatro tornillos que sujeta la carcasa los cuales están ubicados en los laterales ver Fig. 1.
- Posterior a la liberación de la carcasa del equipo, con el blindaje de las fuentes se realiza un frotis con el objeto de asegurar que las fuentes no haya perdido su hermeticidad, el mismo se realiza con un papel embebido en alcohol isopropílico con la ayuda de una pinza de 30 cm. Una vez realizada el frotis, el mismo es sometido a la medición con un detector de contaminación Beta, ver Fig. 2.



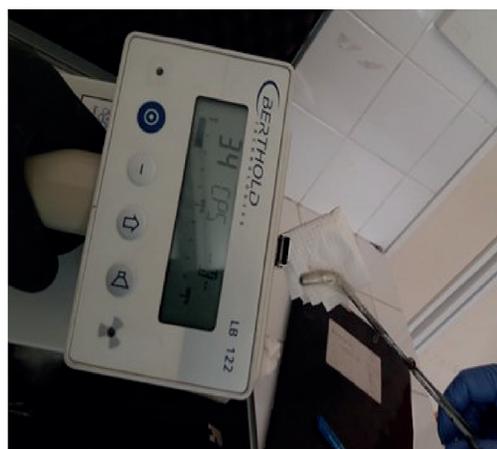
Figura 1. Equipo irradiador de dosímetros con Sr-90/Y-90 Vinten Instruments.



a



b



c

Figura 2. a) Equipo liberado de la carcasa. b) Frotis en la ventana de irradiación (obturador cerrado). c) Medición del frotis.



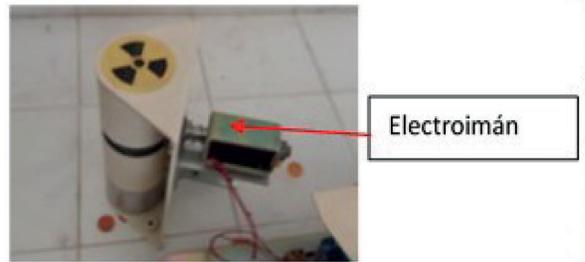
a



b

Figura 3. a) Equipo irradiador de dosímetros sin carcasa. **b)** tornillos ubicados en la parte inferior del equipo.

- c. Una vez que el equipo es liberado de la carcasa, quedan las fuentes $\text{Sr}^{90}/\text{Y}^{90}$ con su blindaje y el disco giratorio sujeto en la base que los soporta. Para liberar las fuentes radiactivas, se procede a desajustar los tornillos ubicados en la parte inferior del equipo ver Fig. 3.
- d. Se debe tener especial cuidado al desmontar las fuentes radiactivas con el contenedor de blindaje, de manera a asegurar que el obturador de la ventana de irradiación esté cerrada. El mecanismo de cierre y de apertura es automático, esto se logra a través de un dispositivo eléctrico (electroimán). El mismo se retira del blindaje de las fuentes radiactivas, desajustando los tornillos ubicados en el soporte que se encuentra justo



a



b

Electroimán

Tornillos de sujeción del electroimán

Figura 4. a) Blindaje con las fuentes radiactivas desmontadas con electroimán (obturador cerrado). **b)** soporte del electroimán.

sobre el blindaje de las fuentes radiactivas ver Fig. 4.

- e. Una vez retirada el electroimán del blindaje de las fuentes radiactivas, se procede a realizar un ajuste del obturador para asegurar que el mismo no se deslice y quede en posición de irradiación Fig. 5.



Figura 5. Blindaje con las fuentes radiactivas desmontadas sin electroimán (obturador cerrado).



Figura 6. Monitoreo de nivel de radiación con detector Geiger Muller.

- f. Posteriormente, se vuelve a realizar los monitoreos de radiación correspondientes, tanto con el detector portátil Geiger Muller como con el detector de Contaminación Superficial Fig. 6.
- g. Por último se retiran las etiquetas identificadora de las fuentes radiactivas existentes en la carcasa del equipo y solamente se deja por el blindaje que contienen las fuentes radiactivas.

Resultados

Como resultados del trabajo de desmontaje de la fuente radiactiva de Sr^{90} que fue realizado en este trabajo, se obtuvo los valores de medición que se pueden observar en la Tabla 3.

En la Tabla 4 se pueden ver los resultados obtenidos después de realizar las mediciones aplicando la técnica de frotis y utilizando el detector

Tabla 4. Datos de monitoreo de contaminación con detector de contaminación Beta para Sr^{90} .

Metodo de medición	Para Beta (CPS)	Con discriminador para Sr^{90} (Bq/cm ²)
Lectura de fondo	33	0,30
Frotis	34	0,30

de contaminación superficial para emisiones beta.

Observando los valores obtenidos se puede decir que se pudo realizar el trabajo en forma exitosa ya que se logró la gestión de la fuente radiactiva sellada en desuso de Sr^{90} , y de esa forma la misma puede ser acondicionada en forma segura dentro del almacén de fuentes en desuso con que cuenta la Comisión Nacional de Energía Atómica de la Universidad Nacional de Asunción.

Conclusiones

Con el trabajo de desmontaje realizado se ha logrado una gestión segura de una fuente radiactiva en desuso, además se ha podido reducir un volumen importante que ayuda a optimizar el espacio disponible para el almacenamiento de fuentes en desuso en el almacén temporal del LaGeFude.

Por otro lado, con el procedimiento minucioso del desmontaje, se ha podido asegurar la protección radiológica y de esa manera evitar una posible contaminación radiactiva que podría ser ocasionado por algún golpe mecánico y que conlleve a la pérdida de hermeticidad de las fuentes radiactivas, ya que en el monitoreo realizado posterior al desmontaje, se pudo constatar que no existe ninguna contami-

Tabla 3. Datos de valores de monitoreo con detector Geiger Muller. Lectura de fondo: 0,23 μ Sv/h.

Posición de monitoreo	Tasa de dosis (μ Sv/h)	Observaciones
En la proximidad del blindaje de la fuente Sr^{90}	4,45	Antes de desmontar
En el borde frontal del equipo (0,25 m)	1,5	Antes de desmontar
A un metro (1 m)	0,33	Antes de desmontar
En contacto al blindaje con el obturador cerrado	5,66	Blindaje con fuentes desmontado
En contacto al blindaje con el obturador abierto	6,8	Blindaje con fuentes desmontado

nación radiactiva. Es de suma importancia realizar una gestión segura de las fuentes radiactivas una vez que las mismas hayan pasado a ser fuentes en desuso y ya no pueda llegar a ser utilizado para el propósito inicial para el que fue adquirido.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

Literatura citada

- Blackwood, O.W., Osgood, T.H., Ruark, A.E., Hutchisson, E., Scott, G.A., Saint Peter, W.N. & Worthing, A.G. (1965). *Física atómica general*. Buenos Aires: Eudeba. 572 pp.
- Fernández Niello, J. (2005). *Radiactividad en el medio ambiente*. Buenos Aires: EUDEBA. 164 pp.
- Leo, W.R. (2012). *Techniques for nuclear and particle physics experiments: A how-to approach*. Heidelberg: Springer Berlin. xviii + 382 pp.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2024). *PubChem Compound Summary for CID 5486204, Strontium-90*. [Consulted: 4.vi.2024]. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Strontium-90>>.
- OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica). (2018). Fuentes en desuso. Gestión de los desechos radiactivos y combustibles gastados. [Consulted: 5.vi.2023]. <<https://www.iaea.org/es/temas/gestion-de-los-desechos-radiactivos-y-el-combustible-gastado>>.
- Rentería Villalobos, M. (2003). *Estudio de la radiactividad natural en la ciudad Aldama, Chihuahua*. (Tesis de maestría). Chihuahua: Centro de Investigación en Materiales Avanzados. iv + 87 pp. + 13 anex.
- Rodríguez Alcalá, M. (1997). *Análisis de radionucleidos emisores de radiación beta presentes en residuos radiactivos procedentes de centrales nucleares, mediante centelleo en fase líquida*. (Tesis de doctorado). Madrid: Universidad Complutense - Facultad de Ciencias Químicas. 331 pp.

GUÍA PARA LOS AUTORES

Reportes Científicos de la FACEN, es una revista de acceso libre y gratuito y es la publicación científica oficial de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción. Es emitida semestralmente y publica **Artículos originales, Artículos de revisión, Tópicos actuales, Reportes de casos, Comunicaciones cortas y Correspondencia**, en las áreas de Biología, Química, Física, Matemática Pura, Matemática Estadística, Geología, Biotecnología y Tecnología de Producción. Los principales criterios para la selección de los artículos son la solidez científica y la originalidad del tema. Los trabajos y opiniones publicados en la revista son de exclusiva responsabilidad de los autores. El idioma oficial de la revista es el español, pero se aceptan trabajos en inglés y en portugués. No existe costo de publicación para los autores.

El trabajo será enviado en formato electrónico a la dirección email de la revista (reportescientificos@gmail.com), consistiendo en archivos de texto, archivos de planilla electrónica y archivos de imagen. **El archivo principal de texto debe contener únicamente texto, sin ilustraciones ni tablas embebidas**, sino únicamente las respectivas citas a las mismas en el texto (numeradas secuencialmente). **Las tablas e ilustraciones deberán ser remitidos en formato digital en archivos independientes**. Los respectivos archivos deberán indicar en su nombre a qué número de tabla o ilustración corresponden.

El archivo de texto debe ser producido con Microsoft Word® u otro editor de texto perfectamente compatible. El texto deberá estar en letra Times New Roman, tamaño 11. Todo trabajo llevará en su primera página los siguientes elementos: **a) el Título** en español e inglés, **b) la lista de Autores** con nombre y apellido, **c) la Afiliación** laboral de cada autor, **d) un Resumen** de un máximo de 250 palabras en español, **e) un máximo de 7 Palabras clave** en español, **f) un Abstract** en inglés, correspondiente a la versión en español y **g) un máximo de 7 Key words** en inglés, correspondientes a la versión en español. **En caso de trabajos en Portugués** se añaden Título, Resumo y Palavras chave en dicho idioma. El resumen sólo podrá obviarse en el caso de Editoriales, Comunicaciones cortas y Correspondencias presentadas como tales. El cuerpo principal del texto podrá contener, según el contexto del trabajo, las secciones de **1) Introducción, 2) Materiales y métodos (o sólo uno de ellos de acuerdo al caso), 3) Resultados, 4) Discusión, 5) Conclusión, 6) Agradecimientos y 7) Literatura citada**. Tales secciones podrán sufrir fusión o no existir, de acuerdo a la metodología de trabajo o enfoque dados por el autor, así como al tipo de escrito (Artículo original, Comunicación corta, etc.) como haya sido presentado por autor o como lo decida el comité editorial. **Los pies de figuras y tablas** deberán ir al final del texto, a continuación de la sección de literatura citada.

Las citas bibliográficas deberán seguir las normas APA. Según estas normas, el año va entre paréntesis y se destacan el autor y año en las citas en texto: “Según González (1999)” o “El método es reciente (González, 1999)”. Para la lista en la sección de Literatura citada la secuencia lógica y formato es de “Autor. (Año). Título. Publicador, Volumen(Número): Páginas.”, poniéndose siempre primero el apellido de cada autor, seguido de sus correspondientes iniciales y separados por comas, con el último autor separado por un signo de ampersand. Se aplicará cursivas respectivamente en el título si se trata de un libro o tesis, o en el publicador si se trata de un artículo. Se ilustra en los siguientes ejemplos:

González, A.P. (1999). *Métodos de análisis crítico*. Asunción: Editorial Nueva. 120 pp.

González, A.P., Martínez, G.T. & Robledo, H.A. (1999). Análisis de la producción científica del país. *Revista de Filosofía Científica*, 45(2): 56-61.

Las tablas y cuadros deberán presentarse en archivos de Microsoft Excell® u otro programa perfectamente compatible, aunque en muchos casos se aceptan también tablas embebidas en archivo de Microsoft Word®, siempre que sea en archivo separado del de texto. **Las ilustraciones (graficos, imágenes, fotos, dibujos, mapas, esquemas o láminas completas) deberán presentarse cada una en un archivo aparte**, en formato JPG o TIF, generados en Adobe Photoshop u otro programa de procesamiento de imágenes. Deberá cuidarse que posean buen enfoque, claridad y contraste, que tengan una resolución mínima de 300 dpi y máxima de 1000 dpi y teniendo en cuenta que su anchura máxima en la revista será de 16 cm.

El proceso de evaluación incluye una primera revisión por el Comité Editorial para determinar si el artículo corresponde a la línea editorial y si cumple con los criterios generales de publicación. Una vez que el artículo se considere pertinente, se someterá a por lo menos dos revisores especialistas en el tema, de cuya opinión depende la aceptación definitiva del artículo. Si existiera una contradicción en la opinión de ambos especialistas, se someterá al Comité editorial o en caso contrario se solicitará una tercera opinión de un tercer especialista. El dictamen podrá ser aceptado, rechazado o condicionado, que será comunicado por escrito al autor principal en un plazo no mayor de tres meses de la recepción del material original. Si el dictamen es condicionado, el autor deberá remitir la nueva versión impresa y en formato digital en el plazo que se le indique que no podrá exceder de los 30 días posteriores a la recepción de la comunicación.

REPORTES CIENTÍFICOS

D E L A F A C E N

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Rep. cient. FACEN	San Lorenzo (Paraguay)	Vol. 15, Nº 1	Enero - Junio de 2024	ISSN 2078-399X (versión impresa) ISSN 2222-145X (versión online)
-------------------	------------------------	------------------	--------------------------	---

- 3–14 **Julio César Benítez-Villalba, Raúl Alejandro Silva Peña, Oscar Daniel Cristaldo-López, Arturo Iván Bogado-Fernández & Liliana Antonia Arrúa-Martínez.** Detección y cuantificación de la norfloxacina en carne de pollos comercializadas en supermercados del Gran Asunción. *[Artículo original]*.
- 15–32 **César Daniel Amarilla.** Cadenas de markov ocultas discretas y los experimentos mendelianos. *[Artículo original]*.
- 33–43 **Elsa Beatriz Cárdenas, Cristina Mayumi Sasaki & Francisco Paulo Ferreira.** Perfil fitoquímico y actividad biológica in vitro del extracto crudo etanólico y fracciones de las raíces de *Eryngium horridum* Malme, del departamento de Cordillera, Paraguay. *[Artículo original]*.
- 44–49 **María del Carmen Rolón Machuca.** Cálculo de órbitas periódicas mediante la Teoría del Promedio. *[Artículo original]*.
- 50–56 **Matías Policani, Camila Ayala, Sandra Álvarez, Yadira Parra, Gabriela Ulke, Danilo Fernández & Tomás López.** Ensayo de inhibición en medio líquido con placa multipocillo de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay contra *Listeria monocytogenes*. *[Artículo original]*.
- 57–65 **Axel Aníbal Marsal von Glasenapp, Vicente Gabriel Gaona Duarte, Paola Ester Fretes Moreno, Andrea Alejandra Arrúa Widmer, Juliana Moura Mendes Arrúa, & Cinthia Carolina Cazal-Martínez.** Efectividad del Agua Destilada-Esterilizada Tres veces (ADTE) como alternativa de conservación de hongos fitopatógenos. *[Artículo original]*.
- 66–76 **Mario Gustavo Leiva Enrique, Eliane Elizabeth Alderete Garcete & Mónica C. Balbuena Portillo.** Influencia del turismo para el desarrollo local en Carmelo Peralta. *[Artículo de revisión]*.
- 77–82 **Richard Florentín Cano, Fredy Doncel Invernizz & Francisco Navarro.** Gestión de una fuente radiactiva de Sr90 en desuso en la Comisión Nacional de Energía Atómica. Aspectos técnicos de seguridad radiológica. *[Reporte de caso]*.

