

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

 EDITORA  
ARTEMIS  
2021

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

 EDITORA  
ARTEMIS  
2021

2021 by Editora Artemis  
Copyright © Editora Artemis  
Copyright do Texto © 2021 Os autores  
Copyright da Edição © 2021 Editora Artemis



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

<b>Editora Chefe</b>	Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira
<b>Editora Executiva</b>	M. <sup>a</sup> Viviane Carvalho Mocellin
<b>Direção de Arte</b>	M. <sup>a</sup> Bruna Bejarano
<b>Diagramação</b>	Elisangela Abreu
<b>Organizador</b>	Prof. Dr. Manuel Simões
<b>Imagem da Capa</b>	Vivilweb/123RF
<b>Bibliotecário</b>	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

#### Conselho Editorial

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, Cuba*  
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, *Universidade Federal de Uberlândia*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Ramalho de Freitas Brito, *Universidade Federal da Paraíba*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano, Peru*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Ester Mallmann Centenaro, *Universidade do Estado de Mato Grosso*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla, Espanha*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Pimentel, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Catarina Castro, *Universidade Nova de Lisboa, Portugal*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Padovesi Fonseca, *Universidade de Brasília-DF*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Neves, *Universidade Aberta de Portugal*  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, *Universidade Federal da Grande Dourados*  
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, Espanha*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deuzimar Costa Serra, *Universidade Estadual do Maranhão*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, *Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal*  
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, *Universidade de São Paulo*  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, *Universidade Federal de Roraima*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Emilias Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*



Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca*, Espanha  
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República*, Uruguay  
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara*, México  
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona*, Espanha  
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, *Universidade Federal do Triângulo Mineiro*  
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis*, Argentina  
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, *Instituto Politécnico da Guarda*, Portugal  
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina  
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, *Universidade São Francisco*  
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura*, Peru  
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
Prof. Dr. Ivan Amaro, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro*  
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío*, Chile  
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, *Universidade Federal do Amazonas*  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College*, USA  
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha*, Espanha  
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, *Universidade de Évora*, Portugal  
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, *UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros*  
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid*, Espanha  
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín*, Colômbia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*  
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, *Universidade Estadual Paulista*  
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, *Universidade Federal de Goiás*  
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, *Universidade de Passo Fundo*  
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha  
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha  
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela*, Espanha  
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, *Universidade Estadual Paulista*  
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, *Universidade Federal de Sergipe*  
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada*, Espanha  
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, *Universidade Federal de Ouro Preto*  
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, *Universidade Federal da Bahia*  
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, *Universidade Nova de Lisboa*, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, *Universidade Federal do Maranhão*  
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, *Instituto Politécnico de Viseu*, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"*, Cuba  
Prof.ª Dr.ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, *Universidade Federal de Lavras*  
Prof.ª Dr.ª Odara Horta Boscolo, *Universidade Federal Fluminense*





Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará  
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal  
Prof. Dr. Turpo Gebera Osbaldo Washington, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru  
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades / Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-87396-50-7

DOI 10.37572/EdArt\_211221507

1. Biociência. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina. 4. Bioética.  
I. Simões, Manuel.

CDD 574

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

## PREFÁCIO

A biotecnologia baseia-se em conhecimentos multidisciplinares fortemente associados às ciências naturais e exatas, e às ciências aplicadas. As ciências biológicas e o seu enquadramento na biotecnologia têm aplicações em grandes áreas de importância socioeconómica, principalmente na medicina humana e animal, ambiente, agronomia e na indústria. Os processos biotecnológicos são caracterizados por usarem células procariotas ou eucariotas, partes das mesmas ou análogos moleculares - com o objetivo de se obterem produtos e serviços. Avanços significativos na biotecnologia surgiram das sinergias estabelecidas entre engenheiros, cientistas e reguladores para transformar descobertas científicas em novos processos e produtos, com impacto socioeconómico. A elevada dinâmica académica e industrial no desenvolvimento de conhecimento em ciências biológicas e biotecnologia é revelador da sua importância. Contudo, a necessidade de atualização dos avanços científicos, em conjugação com a transformação desse novo conhecimento em conteúdo curricular técnico-científico relevante são desafios para um eficaz processo formativo de recursos humanos altamente qualificados. O enquadramento ético e regulamentar de novos processos e produtos é igualmente desafiante.

Este livro foi dividido em quatro partes: a primeira parte reúne capítulos (1 a 6) relacionados com as biociências e a biotecnologia na área biomédica. A segunda parte concentra capítulos (7 a 11) na área do ambiente. A terceira parte é composta pelos capítulos 12 a 14 que se enquadram em aspetos da bioprospeção. A quarta parte contém os capítulos 15 e 16 que abordam aspetos do ensino/aprendizagem em biotecnologia e da bioética, respetivamente. Neste contexto, pretende com este livro contribuir para que estudantes e professores do ensino superior, ligados às biociências e à biotecnologia, quer a nível de graduação quer de pós-graduação, possam ter uma perspetiva de avanços na área. Este livro pode ser também útil a profissionais ligados a setores nos quais as biociências e a biotecnologia têm um papel de relevo, bem como para professores do ensino pré-académico.

**Manuel Simões**

## SUMÁRIO

### BIOMEDICINA

#### **CAPÍTULO 1.....1**

A DESCOBERTA DA INSULINA CELEBRA 100 ANOS

Maria Teresa Rangel-Figueiredo

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215071](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215071)

#### **CAPÍTULO 2..... 16**

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE SUSPENSIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

Arisbel Cerpa-Naranjo

Begoña Ibañez Martínez

Isabel Lado Touriño

Mariana P. Arce

Javier Pérez Piñeiro

Niurka Barrios Bermúdez

María Luisa Rojas Cervantes

Rodrigo Moreno Botella

Sebastián Cerdán García-Esteller

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215072](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215072)

#### **CAPÍTULO 3.....28**

PREMOLARES HUMANOS: ESTUDIO DE FOSITAS INYECTADAS CON COLORANTE Y SU RELACION CON ESTRUCTURAS DENTINALES

Marcela Zaffaroni

Santiago Cueto

Alicia Kohli

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215073](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215073)

#### **CAPÍTULO 4..... 40**

EFFECT OF *Zinnia peruviana* ROOT EXTRACT ON THE PRODUCTION OF MICROBIAL BIOFILMS

Ana Mariel Mohamed

Diego Alberto Cifuentes

Sara Elena Satorres

Claudia Maricel Mattana

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215074](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215074)

**CAPÍTULO 5..... 50**

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE TETRATIOMOLIBDATO DE AMONIO EN LA ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL

Rocío Ayelem Conforti

María Belén Delsouc

Marilina Casais

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215075](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215075)

**CAPÍTULO 6..... 61**

LAS CARDIOPATÍAS, EL EJERCICIO Y SU INTERRELACIÓN AMBIENTAL: REVISION DE LITERATURA

Pedro Jorge Cortes Morales

Eduarda Eugenia Dias de Jesus

Fabricio Faitarone Brasilino

Luis Fernando Rosa

Maria Caroline Marcomini Tezolin

Luana de Andrade Mazia

Gilmar Sidnei Erzinger

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215076](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215076)

**AMBIENTE**

**CAPÍTULO 7..... 74**

MICROFAUNA EM CÓRREGOS DE CABECEIRA DO CERRADO CENTRAL DO BRASIL

Claudia Padovesi-Fonseca

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215077](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215077)

**CAPÍTULO 8..... 85**

ESTUDO SOBRE A GERAÇÃO, O PROCESSO SELETIVO E O DESTINO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DO CAMPUS DE PORTO NACIONAL, UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Brenda Thais Kalife de Assunção

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215078](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215078)



**CAPÍTULO 9..... 95**

TRATAMIENTO BIOLÓGICO EM EFLUENTES DE ÁGUA PARA USINAGEM DE OLIVEIRA

Mariela Beatriz Maldonado

Emiliano Gabriel Fonarsin

Leonel Lisanti

Ariel Marquez

Walter Pirán

Noemi Graciela Maldonado

Pablo Enrique Martín

Daniela Adriana Barrera

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_2112215079](https://doi.org/10.37572/EdArt_2112215079)

**CAPÍTULO 10..... 110**

PRODUCCIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS Y SU USO EN SUELOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

Jairo Vanegas Gordillo

Daniela Forero Gutiérrez

Paola Navarro Munoz

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150710](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150710)

**CAPÍTULO 11..... 132**

USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO HIDROTHERMAL Y RADIACIÓN POR MICROONDAS DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN LA CAPTURA DE CARBONO Y AUMENTO DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS

Jairo Vanegas Gordillo

Laura Milena Bejarano

Paola Alexandra Aguilar Díaz

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150711](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150711)

**BIOPROSPEÇÃO**

**CAPÍTULO 12..... 154**

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXTRAPOLISACÁRIDO DE BACTERIAS PROVENIENTES DE RESIDUOS OLIVÍCOLAS

Fodda Assad Robledo

María Alejandra Soloaga

Patricia Alejandra Córdoba

María Celeste Rosso  
María de los Ángeles Spano Cruz  
Verónica Alejandra Galleguillo  
Gema Blanca Reynoso

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150712](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150712)

**CAPÍTULO 13.....163**

SESQUITERPENOIDES DE PLANTAS NATIVAS DEL NOROESTE ARGENTINO CON ACCION INSECTICIDA

Susana Beatriz Popich

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150713](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150713)

**CAPÍTULO 14.....177**

DORMANT RUPTURE AND HORMONES LEVELS IN *Jatropha curcas* L. AND *Jatropha macrocarpa* GRISEB SEED

Nancy Elisabeth Tavecchio  
Lihué Olmedo Sosa  
Ana Edit Vigliocco  
Oscar Terenti  
Erika Ayelen Escudero  
Hilda Pedranzani

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150714](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150714)

**ENSINO E ÉTICA EM BIOTECNOLOGIA**

**CAPÍTULO 15.....190**

DESAFIOS NO ENSINO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS BIOFILMES

Manuel Simões  
Lúcia Chaves Simões  
Conceição Fernandes  
Maria José Saavedra

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150715](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150715)

**CAPÍTULO 16.....199**

BIOÉTICA EN LA FORMACIÓN EN MEDICINA

Julia Susana Elbaba

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_21122150716](https://doi.org/10.37572/EdArt_21122150716)

<b>SOBRE O ORGANIZADOR.....</b>	<b>206</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO .....</b>	<b>207</b>

# CAPÍTULO 1

## A DESCOBERTA DA INSULINA CELEBRA 100 ANOS

Data de submissão: 16/10/2021

Data de aceite: 05/11/2021

### **Maria Teresa Rangel-Figueiredo**

Grupo de Fisiologia  
Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias  
da Universidade de Trás-os-Montes e  
Alto Douro  
Vila Real 5000-811, Portugal  
CECAV - Centro de Ciência Animal e  
Veterinária Vila Real, Portugal  
<https://orcid.org/0000-0002-9501-2439>

**RESUMO:** No final dos anos 1920s, a medicina permanecia impotente face à doença Diabetes Mellitus. Era sabido que estaria associada ao pâncreas, mas falhavam as tentativas de cura de pacientes e animais experimentais com extratos pancreáticos. Em 1921, cruzaram-se duas linhas: a da pesquisa sobre a doença, já longa desde a Antiguidade, e a da descoberta da insulina, por Frederick Banting (1891-1941) e Charles Best (1899-1978), com a colaboração de John Macleod e James Collip (1892-1965). Este texto foi elaborado como uma ferramenta de ensino que procura transmitir conhecimentos, seguindo um fio condutor, e

incentivar o estudante à pesquisa, ao desafio do desconhecido. Os factos principais e os respetivos protagonistas são assinalados no seu tempo. Esta “história” é repleta de exemplos do esforço que a pesquisa em ciência comporta e, também, um modo de homenajar os mestres do passado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes mellitus. Glicemia. Hormona. Insulina.

### THE DISCOVERY OF INSULIN CELEBRATES 100 YEARS

**ABSTRACT:** In the late 1920s, medicine remained powerless in the face of Diabetes Mellitus. It was known to be associated with the pancreas, but attempts to cure patients and experimental animals with pancreatic extracts failed. In 1921, two lines crossed: that of research on the disease, already long since Antiquity, and that of the discovery of insulin, by Frederick Banting (1891-1941) and Charles Best (1899-1978), with the collaboration of John Macleod and James Collip (1892-1965). This text was designed as a teaching tool that aims to transmit knowledge, following a common thread, and encourage the student to research, the challenge of the unknown. The main facts and their protagonists are noted in their time. This “history” is full of examples of the effort that research in science involves and, also, a way of honoring the masters of the past.

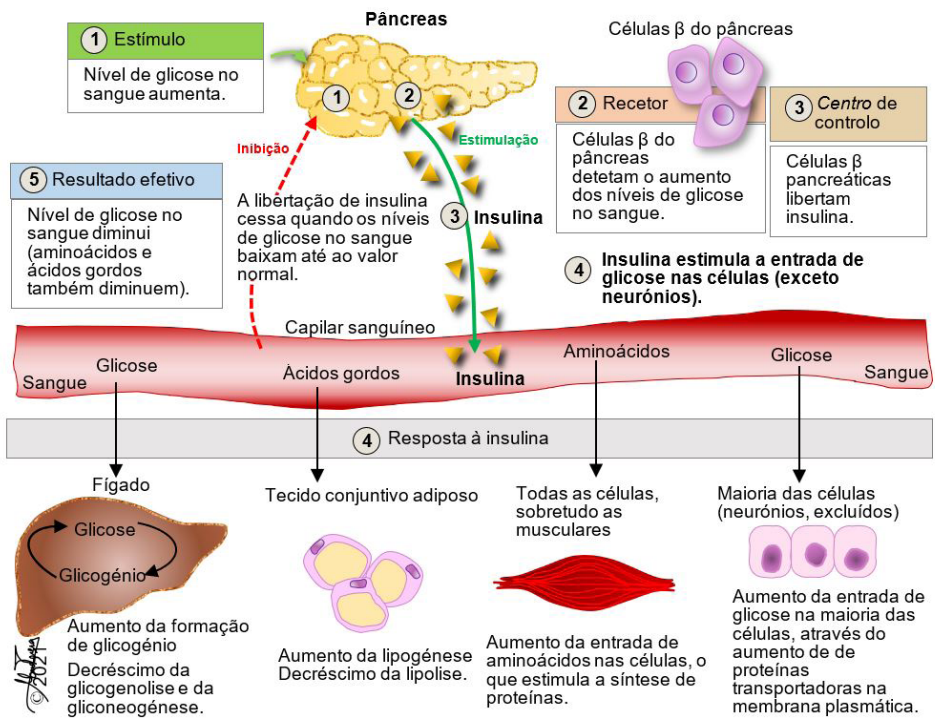
**KEYWORDS:** Diabetes mellitus. Glycemia, Hormone. Insulin.



# 1 INTRODUÇÃO

O metabolismo refere-se a todas as reações químicas que ocorrem nas células de um organismo. Um(a) extraem energia de moléculas que compõem os nutrientes e, outras, sintetizam novas moléculas ou decompõem moléculas. O metabolismo geral é regulado, a longo prazo, por muitas hormonas. A curto prazo (hora a hora) e, em particular, o metabolismo dos hidratos de carbono, é controlado, principalmente, por duas hormonas pancreáticas antagonistas: a **insulina** (Figura 1), produzida pelas células  $\beta$  e a glucagonina ou glucagon pelas células  $\alpha$ .

Figura 1. Modelo geral da regulação e ação da insulina.



A doença **Diabetes Mellitus (DM)**, caracterizada por falta ou ação anormal da insulina (Figura 2), apresenta condições distintas: Tipo 1, Tipo 2, gestacional e outras que ocorrem com muito menor frequência. A diabetes do Tipo 1 (**DM1**), resulta de níveis de insulina insuficientes para manter os valores normais de glicemia; é pouco prevalente e tem maior incidência na infância, principalmente entre 10 e 14 anos de idade, embora possa ocorrer em qualquer idade. A diabetes do Tipo 2 (**DM2**) é a condição mais frequente e surge quando as células-alvo resistem à ação da insulina. Pode verificar-se ambas as

condições. A DM1 é causada, quase sempre, por um mecanismo autoimune ainda pouco claro que destrói, massivamente, as células  $\beta$  pancreáticas. Os principais sintomas são hiperglicemia, poliúria, polidipsia, polifagia, depleção de eletrólitos, cetoacidose e perda de massa muscular. Os efeitos deletérios da DM1 são graves, multifuncionais e, num período de curto a médio-prazo, conduzem à morte, se não for tratada com insulina exógena. Na DM2, a resposta das células  $\beta$  pancreáticas à glicose pode ser tão deficiente que a terapia tem que incluir insulina (WIDMAIER e VANDER, 2019).

Figura 2. Conhecimento da Diabetes Mellitus ao longo do tempo.



Fonte: TATTERSALL, R. B. (2010). *The History of Diabetes Mellitus* in: *Textbook of Diabetes*. 4 ed. Editores: Holt, R.; Cockram, C.; Flyvbjerg, A.; Goldstein, B. Nova Jersey, USA. Wiley-Blackwell 2010.

## 2 OS TERMOS "DIABETES" E "MELLITUS"

As referências mais antigas conhecidas sobre o que se pensa que seria a doença DM, aparecem em papiros do Antigo Egipto e em documentos sânscritos do século VI aC (VON ENGLEHARDT, 1987). A primeira descrição clássica da DM é atribuída a Aretaeus

da Capadócia (81-138 dC) que realçou os efeitos fatais de “uma liquefação da carne e dos ossos na urina”, em alusão à poliúria característica da patologia. Daí ter designado a doença “**diabetes**”, termo grego que significa “sifão” ou “passar por” (BARNETT e KRALL, 2005). Só muito mais tarde, cerca de 1020, em plena era da Idade de Ouro Islâmica, Ibn Sina ou Avicena (980–1037), acrescentou mais detalhes à descrição da DM, na sua obra clássica da medicina, “O Cânone da Medicina”, assinalando dois tipos de pacientes, uns mais magros e jovens e outros mais obesos e idosos (STRAKOSCH, 2002). Por mais de 500 anos, o livro de Avicena serviu como texto médico de referência, no Oriente Islâmico e no Ocidental Cristão. Na Europa do século XVII, a fisiologia desenvolvia-se com alguma base experimental. Thomas Willis (1621-1675), perante a peculiaridade da urina de alguns pacientes com DM ter sabor adocicado, acrescentou o termo **mellitus** (do latim “mel”) para a distinguir de outras doenças poliúricas, mas sem urina doce (que denominou Diabetes Insípida) (BARNETT e KRALL, 2005). Willis falhou quanto à natureza química do composto que estava na origem do sabor, pois associou-a a sais e ácidos (WILLIS, 1678), mas também não foi o primeiro a dar nota dessa característica da DM, pois já tinha sido mencionada num texto Hindu, por Susruta Samhita, professor de Aiurveda (BARNETT e KRALL, 2005).

### 3 QUAL É O ÓRGÃO?

No século VII, decorriam as mais variadas experiências para se conhecer a causa da DM, com base na ideia fundamental: assumir a relação entre um órgão e a patologia, remover o órgão homólogo num animal, observar os resultados e tentar extrair, a partir do órgão removido, a substância que poderia tratar o distúrbio (Figura 3). No entanto, a interpretação dos resultados de pancreatectomias não tinha conduzido a qualquer relação entre o pâncreas, os níveis de glicose plasmática e a DM. Por exemplo, Johann Brunner (1653-1727) em 1683, e a partir de pancreatectomias em cães, fez descrições precisas do órgão e dos sintomas pós-operatórios de polifagia, poliúria e polidipsia nos animais, mas foi incapaz de associa-los à DM, assim como também não reconheceu o seu pioneirismo a induzir, experimentalmente, a doença num modelo animal (BRUNNER, 1722). Outros se lhe seguiram usando cães, aves e coelhos, mas com igual resultado. Mais de meio século depois, em 1778, Thomas Cawley descreveu a autópsia a um indivíduo diabético e sugeriu uma possível relação entre as lesões que observou no tecido pancreático e a DM, mas sem tecer comentários específicos (CAWLEY, 1788). Esta pode ter sido a primeira referência fundamentada sobre a relação pâncreas-DM. Quase um século após, em 1869, Paul Langerhans (1847-1888) foi o primeiro a assinalar “aglomerados de células” interacinares (ilhetas pancreáticas ou de Langerhans) na histologia do pâncreas, mas não lhes atribuiu qualquer função (Figura 3).

## 4 QUAL É O AÇÚCAR?

Em 1776, Matthew Dobson (1732-1784), após ter fervido a urina de um paciente diabético até evaporar, notou que o remanescente tinha o aspeto e o sabor de “açúcar mascavo”, indícios que o levaram a considerar a substância responsável pelo sabor doce na urina de diabéticos ser açúcar que, segundo ele, também existia em excesso no sangue. Contra a ideia corrente na época, Dobson argumentou que a DM não era originada nos rins (DOBSON, 1776). Pouco anos mais tarde, John Rollo (?-1809) apontou para uma disfunção do estômago como a causa de produção excessiva de açúcar. A partir daí, estabeleceu os princípios de uma dieta para a diabéticos: rica em “alimento animal” (gordura e carne) e pobre em ‘matéria vegetal’ (frutas, grãos e pães), e cuja eficácia tentou demonstrar com a diminuição da glicosúria registada em dois pacientes (ROLLO, 1797). Na Europa, a recomendação das dietas pobres em calorias, perduraria muito para além do século XVIII como terapia da DM. Embora Rollo e outros presumissem o excesso de açúcar no sangue e na urina de diabéticos, não existiam provas disso. William Wollaston (1766-1828) tentou-o, mas não logrou ter êxito, pois pesquisava uma substância com as mesmas características do açúcar de mesa (sacarose) (ENGLEHARDT, 1987). Foi em 1815 que Michel Chevreuil (1786-1889) identificou a glicose como o açúcar em excesso no sangue e na urina dos pacientes de DM (CHEVREUIL, 1815).

## 5 O PÂNCREAS, TALVEZ

A DM foi sendo considerada uma doença dos rins, do fígado ou do estômago, até Etienne Lancereaux (1829-1910), em 1877, ter comparado dados anatómicos e clínicos relativos a autópsias de pacientes jovens com diabetes e doença fibrocálcica do pâncreas. Lancereaux associou a DM ao pâncreas e expôs o conceito de “diabetes pancreática” (LANCEREAUX, 1877). Em 1890, Oscar Minkowski (1858-1931) e Josef Von Mering (1849-1908) removeram o pâncreas de um cão, com o intuito de estudar a sua função no processo digestivo e, fortuitamente, acabaram por produzir a prova experimental das observações de Lancereaux (VON MERING e MINKOWSKI 1890). Com a mesma metodologia, Gustave-Édouard Laguesse (1861-1927) em 1893, Sir Edward Sharpey-Schafer (1850-1935) em 1894 e Ssobolew (1876-1919) em 1901, entre outros, alcançaram resultados semelhantes: as características morfológicas das ilhetas indicavam-nas como responsáveis pela secreção interna que relacionava o pâncreas com a glicemia e a DM (LAGUESSE, 1893 e ROSENFELD, 2002). Face às evidências, Bernhard Naunyn (1839-1925), responsável pelo instituto onde Minkowski e Mering trabalhavam, realizou ensaios com vista ao tratamento de pacientes através de dietas que incluíam pâncreas, mas sem resultados (NAUNYN, 1898). Em 1901, Eugene Opie (1873-1971), também com base na



análise de pâncreas obtidos em autópsias de diabéticos, reforçou a ideia de serem as ilhetas pancreáticas a fonte provável de uma secreção que ligaria o metabolismo dos hidratos de carbono à DM (OPIE, 1901a, b) (Figura 3).

## 6 AS “DIETAS DE FOME”

Não obstante a suspeita reiterada quanto à origem pancreática da DM, eram mantidos dois princípios: o tratamento da doença continuava assente em dietas, e o cão era mantido como modelo animal para o estudo da doença. Com base nisso, Frederick Allen (1876-1964) encetou as suas pesquisas, removendo porções variáveis do volume total dos pâncreas de cães e analisando os resultados. O objetivo, concretizado com sucesso, era induzir a doença DM nos animais, mas em graus ligeiro ou grave, equivalentes aos observados nos humanos, para depois desenhar a dieta adequada a cada caso. Allen passou a orientar as dietas dos pacientes “de acordo com o tamanho do seu pâncreas”, e reduzia-lhes a ingestão de alimentos até ao desaparecimento da glicosúria. Allen tinha desenvolvido um modelo mais realista da DM insulino-dependente de humanos (ALLEN, 1913). A aplicação clínica da “dieta de fome” de Allen permitia prolongar a vida dos pacientes, por vezes alguns anos, antes do fim inevitável, devido à fome, cetoacidose ou infeção. Pela dureza das dietas que prescrevia e pelas dúvidas quanto aos seus verdadeiros resultados, Allen foi sempre muito contestado por uma boa parte dos seus pares. Durante anos, os pacientes continuariam a submeterem-se a dietas semelhantes, mas todas inúteis a preservar a sua qualidade de vida, ainda que limitada. A DM1 era fatal.

Figura 3. O conhecimento sobre as origens da Diabetes Mellitus.

### Evolução do conhecimento sobre as causas e órgão de origem da diabetes, até ao início do século XX.

Thomas Willis	(1621 1675)	Excesso de alimento e bebida
Johann Brunner	1683	A partir de pancreatetectomias em cães, fez descrições precisas do órgão e dos sintomas pós-operatórios de polifagia, poliúria e polidipsia nos animais, mas foi incapaz de associa-los à DM.
Thomas Cawley	1778	A partir da autópsia a um indivíduo diabético, sugeriu que as pedras observadas no pâncreas eram a causa da diabetes.
Paul Langerhans	1869	1ª descrição de “aglomerados de células” intercinareas (ilhetas pancreáticas ou de Langerhans) na histologia do pâncreas.
Etienne Lancereaux	1877	Distinção de subtipos: diabéticos magros e obesos. Associou a DM ao pâncreas e expôs o conceito de “diabetes pancreática”.
Oscar Minkowski e Josef Von Mering	1890	A pancreatetectomia causa diabetes no cão
Gustave-Édouard Laguesse Sir Edward Sharpey-Schafer Ssobolew entre outros,	1893 1894 1901	As características morfológicas das ilhetas indicavam-nas como responsáveis pela secreção interna que relaciona o pâncreas com a glicemia e a diabetes.
Bernhard Naunyn	1898	As tentativas de tratamento de pacientes com dietas que incluíam pâncreas não resultaram.
Eugene Opie	1901	Degeneração hialina (amiloidose) de ilhetas (diabetes tipo 2) As ilhetas pancreáticas são a fonte provável da secreção que liga o metabolismo dos hidratos de carbono à diabetes
Eugene Opie	1910	Infiltração linfocítica de ilhetas (“insulite”; diabetes tipo 1)

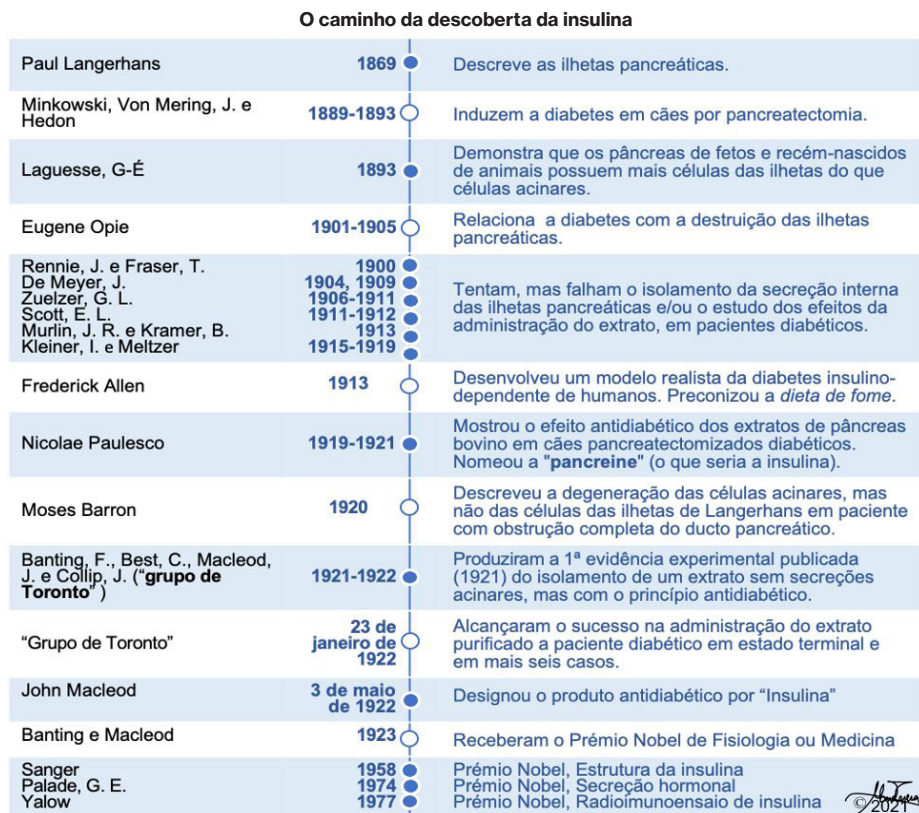
## 7 OS EXTRATOS DE PÂNCREAS

Durante as primeiras duas décadas do século XX, os cientistas empenharam-se na obtenção de extratos pancreáticos de várias origens, incluindo peixes e cobras. O que os norteava era o isolamento da secreção interna das ilhetas pancreáticas e/ou o estudo dos efeitos da administração do extrato, em pacientes diabéticos (J. Rennie e T. Fraser, em 1900; J De Meyer em 1904 e 1909; G. L. Zuelzer, em 1908; E. L. Scott, em 1911 e 1912; I. Kleiner, em 1919; J. R. Murlin e B. Kramer, em 1913; e N. C. Paulesco, em 1921 e outros). Embora o resultado de alguns ensaios fosse auspicioso – quanto induziam uma redução da hiperglicemia ou da glicosúria – muitos foram abandonados, face aos efeitos colaterais graves comuns nos pacientes tratados: abscessos no local das injeções, intensas reações tóxicas, febre e mal-estar. A toxicidade dos extratos foi atribuída, essencialmente, à presença indesejada de enzimas nos extratos. Na época, algum desconhecimento poderá ter conduzido a certas interpretações erradas, por exemplo, à confusão entre o efeito tóxico dos extratos e eventuais convulsões hipoglicémicas resultantes da ação depressora (ignorada na época) da hipoglicemia sobre o sistema nervoso. Por outro lado, quando o extrato era administrado por via oral, o efeito hipoglicémico não ocorria, pois, o princípio antidiabético que desconheciam, a insulina, é uma proteína que está sujeita à digestão no trato digestivo, como qualquer outra.

## 8 A IDEIA DE BANTING

Em outubro de 1920, o cirurgião canadense Frederick Banting (1891-1941) teve acesso a uma publicação de Moses Barron (1884-1974) (Figura 4). Barron dava nota de um paciente cuja obstrução completa do ducto pancreático principal tinha causado a degeneração das células acinares, embora a maioria das células das ilhetas de Langerhans permanecesse intacta (BARRON, 1920). O caso inspirou Banting a conceber a hipótese de ligar (clampar) os ductos pancreáticos de um animal, para atrofia e morte das células acinares secretoras das enzimas digestivas, mas deixar intactas as células das ilhetas, para que produzissem a secreção interna com o agente antidiabético desconhecido. Em novembro desse ano, Banting contactou o professor de fisiologia John Macleod (1876-1935) que, sobre a diabetes, defendia o conceito tradicional: uma hiperglicemia, acompanhada de glicosúria, causadas por uma falha na formação e armazenamento de glicogénio no fígado (MACLEOD, 1913). Macleod permitiu que Banting testasse a sua hipótese no laboratório de fisiologia da Universidade de Toronto, mas avisando que o final provável seria “um resultado negativo de grande importância fisiológica” (MACLEOD, 1921). Macleod, entretanto, decidiu juntar à equipa o assistente Charles Best (1899-1978) (Figura 4).

Figura 4. O caminho da descoberta da insulina.



## 9 AS PESQUISAS DO GRUPO DE TORONTO

Em maio de 1921, Banting e Best iniciaram as experiências. Estas consistiram em induzir a diabetes em cães através da pancreatectomia, ligar os dutos pancreáticos de outros cães para a necrose da parte exócrina da glândula, mas deixando os ilhéus intactos e, por fim, tratar o primeiro grupo de cães diabéticos com extratos obtidos dos pâncreas do segundo grupo de cães. Os primeiros resultados, obtidos no verão de 1921, aproximaram-se do objetivo: alcançaram a primeira evidência experimental do isolamento de um extrato livre das secreções acinares, mas contendo o princípio antidiabético (BANTING *et al.*, 1922). Numa nota sobre este ensaio, o produto é designado por "Isletin" pela primeira vez (BANTING e BEST, 1922; CARDOSO *et al.*, 2017).

A pesquisa de Banting e Best exigia mais experiências e maior volume de extratos. Com base nas descrições que Laguesse (LAGUESSE, 1893), Banting e Best focaram-se em pâncreas fetais de bezerro (ROSENFEL, 2002). Laguesse tinha observado em animais que os pâncreas de fetos e recém-nascidos continham uma proporção muito

superior de células das ilhetas relativamente às células acinares, pois naquelas idades os animais dispensam um tecido acinar ativo por não digerirem alimentos. Ao fim de alguns ensaios, Banting e Best não só demonstraram que os cães diabéticos registavam um notório decréscimo da hiperglicemia e da glicosúria, como conseguiram recuperar um cão em coma diabético que sobreviveu por muito mais tempo do que o habitual (BANTING e BEST, 1922). Não restaram dúvidas quanto à presença do princípio ativo nos extratos, mas estes continham muitas outras substâncias indesejáveis que deviam se eliminadas antes de avançarem com os testes clínicos em humanos. O refinamento da técnica beneficiou da inclusão na equipa de James Collip (1892–1965), bioquímico e professor de Fisiologia que isolou o princípio ativo na forma de pó. O produto obtido, testado em cães diabéticos e em coelhos saudáveis, mostrou-se eficaz a reduzir a glicémia.

## 10 A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA E AS CRÍTICAS

Em dezembro de 1921, os investigadores de Toronto comunicaram à comunidade científica os resultados das suas pesquisas, concluindo que o preparado obtido, administrado a um cão diabético, eliminou a cetose e restaurou a capacidade hepática de formação e armazenamento de glicogénio, sugerindo que o produto permitia o funcionamento normal de um fígado diabético. Afirmaram, ainda, que o refinamento das suas técnicas levaria a obter extratos que poderiam ser injetados com segurança em humanos (BANTING *et al.*, 1922). A empresa farmacêutica norte-americana Eli Lilly logo se mostrou interessada em envolver-se na pesquisa. A pesquisa prosseguiu, mas não isenta de críticas apontadas, nomeadamente, por F. Roberts, investigador do Laboratório de Fisiologia em Cambridge (ROBERTS, 1922) que acusou a dupla Banting e Best, entre outros argumentos, de falta de conhecimentos científicos. O próprio Roberts foi alvo de forte oposição pelo britânico Henry H. Dale (1875-1968), galardoado com o Prémio Nobel em 1936. Dale desvalorizou os erros de Banting e Best e enfatizou o contributo da sua descoberta (DALE, 1922).

## 11 O TRABALHO DESCONHECIDO DE NICOLAE PAULESCO

Os resultados de Toronto foram idênticos aos que Nicolae Paulescu (1869-1931) obteve com experiências iniciadas em 1916, nas quais mostrou o efeito antidiabético dos extratos de pâncreas bovino em cães diabéticos. Paulescu nomeou a substância antidiabética por “**pancreine**” (o princípio correspondente à *isletin*) e prosseguiu com os ensaios na tentativa de isolar e a produzir. Mas os seus resultados só foram reconhecidos

mais tarde, demasiado tarde, pois o grupo de Toronto já tinha anunciado a descoberta da insulina. Alguns historiadores da Ciência consideram que este anúncio foi uma mera confirmação do trabalho de Paulescu (LEIVA *et al.*, 2011; ROGERS, 2021).

## 12 ADMINISTRAÇÃO DOS EXTRATOS EM HUMANOS

Em 1922, a equipa de Toronto incluía Banting, Best, Collip, Macleod e os colaboradores E. C. Noble, J. Hepburn, J.K. Latchford, W.R. Campbell e A.A. Fletcher e, desde há tempos, que eram patentes alguns sentimentos de desconfiança e rivalidade entre elementos, mas o facto não impediu a progressão das pesquisas. A administração dos extratos a pacientes teve início com dois insucessos, um em dezembro de 1921, e outro em de janeiro de 1922. Mas quando o tratamento do segundo paciente, um rapaz de 14 anos em estado terminal, foi retomado em 23 de Janeiro, depois de Collip ter aplicado a sua técnica de purificação dos extratos, a resposta foi um sucesso que repetiram em mais seis casos (BANTING e BEST, 1922). A publicação dos resultados ocorreu em março de 1922 (BANTING *et al.*, 1922) onde fizeram uma revisão dos trabalhos desenvolvidos e concluíram “... esses resultados juntos não deixaram dúvidas de que nesses extratos temos uma medida terapêutica de valor inquestionável no tratamento de certas fases da doença no homem”. Embora tivessem feito algumas alusões às pesquisas de Paulescu, não lhe atribuíram valor, por má interpretação da língua francesa, como Banting alegou mais tarde.

## 13 O PRINCÍPIO ATIVO DOS EXTRATOS É DESIGNADO POR INSULINA

Charles-Édouard Brown-Séquard (1817-1894), professor de fisiologia, foi dos primeiros a conceber a existência de substâncias segregadas por certos órgãos que, uma vez em circulação no sangue, podiam afetar a atividade de outros órgãos distantes. Tais substâncias são as hormonas, mas apenas quase uma década mais tarde, em 1905, o termo “hormona” foi cunhado por Ernest Starling (1866-1927) para designar os mensageiros químicos produzidos pelas glândulas endócrinas (STARLING, 1905). A palavra “insulina”, derivada do latim *insulae* (ilha ou ilhéu) só foi introduzido em 1909, por Jean de Meyer (1878-1934) para designar a substância, ainda desconhecida, segregada pelas ilhetas pancreáticas (MEYER, 1909). Em 3 de maio de 1922, na reunião anual da Associação de Médicos Americanos, Macleod designou o produto antidiabético obtido dos extratos pancreáticos por “Insulina”, para distingui-lo dos anteriores nomeados “Isletina”, ignorando por desconhecimento, como afirmaria mais tarde, que o termo já tinha sido usado por de Meyer (BLISSE, 1982).

## 14 A PRODUÇÃO DE INSULINA

Para a produção de insulina em grande escala, o grupo de Toronto não só se empenhou na pesquisa de fontes adicionais ou alternativas da hormona, como estabeleceu colaboração com os Laboratórios Connaught e, mais tarde, com a empresa farmacêutica Eli Lilly and Company. No entanto, ainda que a questão da quantidade acabasse por ser solucionada, nenhum dos produtos obtidos era suficientemente puro e padronizado, por vezes até se mostravam ineficazes e de deterioração rápida (BLISS, 1982, ROSENFEL, 2002). A questões como estas, e outras que foram surgindo, a comunidade científica foi dando resposta ao longo do tempo e, nos finais de 1923, já um número superior a 25.000 pacientes era tratado em mais de 60 clínicas do Canadá e dos Estados Unidos da América. No final de novembro de 1923, professor August Krogh (1874-1949) da Universidade de Copenhague obteve autorização da Universidade de Toronto para introduzir a insulina na Escandinávia e o *Nordisk Insulin Laboratory* passou a produzi-la sem fins lucrativos (ROSENFEL, 2002). Rapidamente a terapia ultrapassou fronteiras.

## 15 O PRÉMIO NOBEL DE FISIOLOGIA OU MEDICINA

Dezoito meses após o anúncio da sua descoberta, Banting e Macleod receberam o Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1923, cujas partes pecuniárias repartiram, respetivamente com Best e Collip. O facto refletiu a importância que o tratamento médico constituiu para a humanidade. A escolha dos galardoados foi alvo de algumas contestações, nomeadamente, da parte de Georg Zuelzer e Nicholas Paulesco, cada um reivindicando para si o pioneirismo de algum dos aspetos da descoberta da insulina, mas as contestações não tiveram qualquer efeito (LEIVA-PÉREZ *et al.*, 2010).

## 16 DEPOIS DA DESCOBERTA

A nova terapia para a diabetes mellitus tipo I reduziu drasticamente o sofrimento causado pela patologia e a mortalidade associada. Este ganho extraordinário para a humanidade também teve um efeito “não esperado” – o que até então era uma patologia aguda e inexoravelmente fatal, passou a ser uma doença crónica que, a longo prazo, gera complicações graves com necessidade de tratamentos continuados.

As formulações iniciais de insulina e o seu mecanismo de ação rápida exigiam várias injeções diárias, em quantidades medidas e variáveis e os pacientes estavam sujeitos à ameaça constante de uma hipoglicemia. Em 1936, Hans Hagedorn, apresentou a primeira preparação de ação prolongada, insulinato de protamina (CZUPRYNIAK, 2020) a que se seguiram a insulina protamina zinco, ainda no mesmo ano, e a insulina globina

em 1939, NPH (protamina neutra Hagedorn ou isofano) em 1946 e a série lenta em 1952 (TATTERSALL, 2010). O prolongamento dos efeitos da insulina permitiu que os diabéticos dependentes de insulina diminuíssem o número injeções necessárias diariamente. A vantagem que isso constituiu para os pacientes não correspondeu a um melhor controlo da glicemia. Durante muitos anos, os avanços mais relevantes continuariam a surgir nas técnicas de obtenção e grau de pureza da hormona com origem em pâncreas de suínos ou bovinos.

Na década de 1970s, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante permitiu cultivar bactérias que incluíam genes sintéticos para síntese de proteínas humanas. A primeira produção, clonagem e expressão dos genes da insulina humana, uma proteína com 51 aminoácidos, foi reportada com sucesso por Goeddel e colaboradores em 1979 (Goeddel *et al.*,1979), em *E. coli*. Esta insulina era idêntica à produzida pelos humanos, era altamente purificada e podia ser produzida em quantidades ilimitadas. A partir dos primeiros anos da década de 1980s, a produção de insulina humana passou a ser garantida por uma fonte prática e constante, o que expandiu grandemente o acesso dos pacientes de DM à terapia. Em 1982, nos EUA, foi aprovado, para o tratamento de diabéticos, o fármaco Humulin, cujo princípio ativo era a insulina sintética.

Desde então, a evolução na pesquisa básica e clínica em torno do conhecimento da DM e de novas estratégias terapêuticas tem produzido progressos relevantes, incluindo tratamentos para a DM tipo 2. Os pacientes de DM2 que necessitam do controlo da glicemia, também passaram a beneficiar, por exemplo, da introdução dos agonistas do GLP-1 (péptido semelhante ao glucagon-1, uma hormona natural que estimula a secreção de insulina pós-prandial moderando a elevação precoce da glicose no sangue) e, posteriormente, dos inibidores de SGLT-2 (cotransportador de glicose dependente de sódio que contribui para a reabsorção renal de glicose).

Novos tratamentos, com os análogos de insulina de nova geração, antidiabéticos orais de última geração, inovações em dispositivos de injeção, novas soluções digitais, terapias a partir de células estaminais continuarão a permitir ganhos crescentes tanto na flexibilidade como na redução da carga diária de cuidados com a DM. A possibilidade da pesquisa científica um dia chegar a um tratamento curativo da diabetes mellitus é cada vez mais real.

## 17 CONCLUSÃO

A descoberta da insulina em 1921 está no rol das grandes conquistas científicas do século passado e a sua produção, de início, a partir de extratos pancreáticos de animais



e, depois, a partir de clonagem e expressão dos genes da insulina humana em bactérias, marcou definitivamente duas etapas no tratamento da doença diabetes mellitus. Na primeira, antes dos anos 1920, a meta visada pelas várias terapias, limitava-se a tentar manter os pacientes vivos, na segunda, o foco passou a ser salvar e melhorar a vida de milhões de pessoas, evitando e prevenindo as complicações crônicas da doença. Apesar de hoje a medicina ter à sua disposição medicamentos melhores do que nunca, o número de pessoas que vivem com diabetes continua a aumentar a uma taxa preocupante.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, F.M. (1913). **Studies Concerning Glycosuria and Diabetes**. Cambridge MA: Harvard University Press; 1913. *in*: MAZUR, A. (2011).
2. BANTING, F. G. e BEST, C. H. (1922). **The internal secretion of the pancreas**. *J Lab Clin Med*. 1922; 7:251-66.
3. BANTING, F.G., BEST, C.H., COLLIP, J.B., CAMPBELL, W.R. e FLETCHER, A.A. (1922). **Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus**. Preliminary Report. *Can Med Assoc J*. 1922; 12(3):141-146.
4. BARNETT, D.M. e KRALL, L.P. (2005). **A história do diabetes**. *in*: KAHN, Ronald; WEIR, Gordon; KING, George; JACOBSON, Alan; MOSES, Alan; SMITH, Robert. **Joslin: Diabetes Mellito**. USA. Joslin Diabetes Center e Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health Inc., 2005.
5. BARRON, M. (1920). **Relation of the Islets of Langerhans to diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis**. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, **XXXI** (5) p437.
6. BLISS, M. (1982) **The Discovery of Insulin**. Chicago, The University of Chicago Press, 1982; *Diabetes Care* **6**(4): 425-426. Doi.org/10.2337 /diacare.6.4.425.
7. BRUNNER, J.C. (1722). **Experimenta nova circa pancreas**. *In*: KECK, F. S. e DUNTAS, L. H. (2007).
8. CARDOSO, L., RODRIGUESA, D., GOMES, L. e CARRILHOA, F. (2017) **Banting and Best: The Extraordinary Discovery of Insulin**. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 2017;**12**(1):106-115.
9. CAWLEY, T. (1788). **A single case of diabetes, consisting entirely in the quality of the urine; with an inquiry into the diferente theories of that disease**. London Medical Journal 1788. **9**:286-308 *in*: STYLIANOU, C. e KELNAR, C. (2009).
10. CHEVREUIL, M.E. (1815). **Note sur le sucre de diabète**. Annales de Chemie, Paris, 1815. **95**:319 *in*: GOLDBERGER, R. F. e YAMAMMOTO, K. R. (1982).
11. CZUPRYNIAK, L. (2020). **Starting Insulin Therapy in Europe: The Early Days**. *in*: Jorgens, V. e Porta, M. (eds): Unveiling Diabetes – Historical Milestones in Diabetology. *Frontiers in Diabetes*. Basel, Karger, 2020, vol 29, pp 103-114 (DOI:10.1159/000507688). Consulta 2021-09-5: <https://books.google.pt/books>.
12. DALE, H.H. (1922) **Insulin** [Letter to the editor] *British Medical Journal* 1922 (Dec 23):1241.



13. DOBSON, M. (1776). **Experiments and observations on the urine in diabetes.** 1776. *in*: BARNETT, D. M. e KRALL, L. P. (2005).
14. FOSSATI, P. (2004). **Edouard Laguesse à Lille en 1893 crée le terme “endocrine” et ouvre l’ère de l’endocrinologie Son modèle: l’îlot endocrine du pancréas et le diabète.** La Société française d’Histoire de la Médecine, 2004. *Histoire Des Sciences Médicales – Tome XXXVIII* (4) -20.
15. GOEDEL, D.V., KLEID, D.G., BOLIVAR, F. (1979). **Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;**76**(1):106–110.
16. GOLDBERGER, R.F. e YAMAMOTO, K.R. (1982). **Biological Regulation and Development, Vol 3A Hormone Action.** 1 ed. New York. Springer Science+Business Media, 1982. ISBN 879-1-4684-1225-6 (eBook). Consulta 2021.08.25 <https://books.google.pt>.
17. GRANGER, A. e KUSHNER, J.A. (2009). **Cellular Origins of Beta Cell Regeneration: a Legacy view of Historical Controversies.** *J Intern Med.* 2009; 266(4): 325–338. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02156.x.
18. KECK, F.S. e DUNTAS, L.H. (2007). **Brunner’s missing? Aha experience? delayed progress in diabetes research by 200 years.** *HORMONES International Journal of Endocrinology and Metabolism 2007.* **6**(3): 251-254).
19. LAGUESSE, E. (1893). **Sur la formation des îlots de Langerhans dans le pancréas.** *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la société de biologie* 1893. **5**:819–20. *in*: FOSSATI (2004).
20. LANCEREAUX, E. (1877). **Notes et réflexions a propos de deux cas de diabète sucré avec altération du pancréas.** *Bull. Acad. Med. Paris,* **6**: 1215-1240. *in*: WRIGHT, J. R. Jr. e MCINTYRE, L. (2020).
21. LEIVA, A., BRUGUÉS, E., LEIVA-PÉREZ, A. (2011). **The discovery of insulin: Continued controversies after ninety years.** *Endocrinol Nutr.* 2011;**58**(9):449-456.
22. MACLEOD, J.J.R. (1913). **Diabetes: Its Pathological Physiology.** London: Edward Arnold, 1913.
23. MACLEOD, J.J.R. (1921). **Letter to Dr. F. G. Banting** March 11, 1921.
24. MAZUR, A. (2011). **Why were “starvation diets” promoted for diabetes in the pre-insulin period?** *Nutrition Journal* 2011, 10:23 <http://www.nutritionj.com/content/10/1/23>.
25. MEYER, J. (1909). **Action de la sécrétion interne du pancréas sur différents organes et en particulier sur la sécrétion rénale.** *Arch Fisiol* 7:96–9. 1909 <https://iif.library.utoronto.ca>.
26. NAUNYN, B. (1898). **Der Diabetes mellitus.** Wiena, Alfred Hölder, 1898. Consulta 2021-08-14: <https://iif.wellcomecollection.org>.
27. OPIE, E.L. (1901a). **On the Relation of Chronic Interstitial Pancreatitis to the Islands of Langerhans and to Diabetes Mellitus.** *J Exp Med* **5** (4):397-428, 1901. doi: 10.1084/jem.5.4.397.
28. OPIE, E.L. (1901b). **The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas. Hyaline degeneration of the islands of Langerhans.** *J Exp Med* **5** (5): 527-540, 1901.
29. ROBERTS, Ff. (1922). **Insulin** [Letter to the editor] *British Medical Journal* 1922 (Dec 16):1193-4.

30. ROGERS, K. (2021). **Nicolas C. Paulescu**. Encyclopaedia Britannica, Inc. 1 January 2021.
31. ROLLO, J. (1797). **Diabetes Mellitus: An account of two cases of diabetes mellitus; with remarks as they arose during the progress of the cure**. Vol. II. London, C. Dilly. MDCCXCVII. Consulta 2021-09-24 <https://ia802703.us.archive.org/19/items/b21469179-0002/b21469179-0002.pdf>.
32. ROSENFELD, L. (2002). **Insulin: Discovery and Controversy**. *Clinical Chemistry* **48** (12): 2270–2288.
33. STARLING, E.H. (1905). **The Croonian lectures on the chemical correlation of the functions of the body**. Lecture I. Delivered before the Royal College of Physicians of London on June 20, 22, 27 & 29, 1905, by Ernest Henry Starling. London, Royal College of Physicians. <https://wellcomecollection.org>.
34. STRAKOSCH, C. (2002). **The Discovery of Insulin**. Brisbane Australia. 2002 University Endocrine Department, Greenslopes Private Hospital. Consulta em 2021-08-24, 18:40h [www.ramsayhealth.com.au](http://www.ramsayhealth.com.au).
35. STYLIANOU, C. e KELNAR, C. (2009). **The introduction of successful treatment of diabetes mellitus with insulin**. *J R Soc Med* 2009. **102**: 298-303. DOI 10.1258/jrsm.2009.09k035.
36. TATTERSALL, R. B. (2010). **The History of Diabetes Mellitus** in: Textbook of Diabetes. 4 ed. Editores: Holt, R.; Cockram, C.; Flyvbjerg, A.; Goldstein, B. Nova Jersey, USA. Wiley-Blackwell 2010.
37. VON ENGLEHARDT, D. (1987). **Diabetes, Its Medical and Cultural History**. Springer Verlag, Berlin, 1987:43–100. in: BARNETT, D.M. e KRALL, L.P. (2005).
38. VON MERING, J. e MINKOWSKI, O. (1890). Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. **Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol** 26: 371-387 (1890). <https://doi.org/10.1007/BF01831214>.
39. WIDMAIER, E.P. e VANDER, A.J. (2019). **Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. Cap. 16. Regulation of Organic Metabolism and Energy Balance**. 15 ed. New York. McGraw-Hill Education. 2019. ISBN 978-1-259-90388-5.
40. WILLIS T. (1674). **Pharmaceutice Rationalis**; sive, Diatriba de Medicamentorum Operationibus in Humano Corpore [2 parts - 1 vol]. Oxford: Sheldonian Theatre, 1674. in: TATTERSALL, R. B. (2010).
41. WRIGHT, J.R. Jr. e MCINTYRE, L. (2020). **Misread and mistaken: Étienne Lancereaux's enduring legacy in the classification of diabetes mellitus**. *Journal of Medical Biography* April 2020. doi:10.1177/0967772020914797.

## CAPÍTULO 2

### COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE SUSPENSIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

Data de submissão: 20/10/2021

Data de aceite: 05/11/2021

**María Luisa Rojas Cervantes**

Facultad de Ciencias

UNED – Madrid

ORCID: 0000-0001-5528-9276

**Rodrigo Moreno Botella**

Instituto de Cerámica y Vidrio

CSIC, Madrid – España

ORCID: 0000-0002-4826-5193

**Arisbel Cerpa-Naranjo**

Universidad Europea de Madrid

Madrid - España

ORCID: 0000-0002-4767-880X

**Begoña Ibañez Martínez**

Universidad Europea de Madrid

Madrid - España

**Sebastián Cerdán García-Esteller**

LIERM

Instituto de Investigaciones Biomédicas

“Alberto Sols”, CSIC

Madrid - España

ORCID: 0000-0001-9965-0270

**Isabel Lado Touriño**

Universidad Europea de Madrid

Madrid - España

ORCID: 0000-0003-2594-3040

**Mariana P. Arce**

Universidad Europea de Madrid

Madrid - España

ORCID: 0000-0001-5563-0745

**Javier Pérez Piñeiro**

Universidad Europea de Madrid

Madrid - España

ORCID: 0000-0002-4618-8219

**Niurka Barrios Bermúdez**

Universidad Europea de Madrid

Madrid – España

ORCID: 0000-0003-4932-544X

**RESUMEN:** Se estudió el comportamiento reológico de diferentes suspensiones de nanotubos de carbono en régimen diluido. Se estudiaron suspensiones de nanotubos de carbono de paredes múltiples comerciales sin funcionalización, nanotubos de carbono de paredes múltiples oxidados en nuestro laboratorio con ácido nítrico a reflujo durante 24 horas y nanotubos de carbono de paredes múltiples comerciales funcionalizados con grupos carboxílicos. El estudio se realizó en dos medios dispersantes: agua y suero fetal bovino (FBS). Los resultados se compararon con los obtenidos en trabajos previos realizados para suspensiones de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs)

con el fin de comprender la influencia de la estructura de los nanotubos de carbono en las propiedades reológicas en presencia de un medio biológico. La caracterización estructural se realizó con diferentes técnicas: XRD, IR, TGA, TEM, SEM y AFM. Para la caracterización coloidal, se determinó el potencial zeta de las suspensiones a valores de pH comprendidos entre 4 y 9, siendo nuestro rango de interés entre pH = 6-8, cercanos al pH fisiológico. Las medidas reológicas se realizaron para diferentes concentraciones de las suspensiones (1, 1.5 y 3 mg/ mL), y temperatura de 25, 30 and 37 °C.

**PALABRAS CLAVES:** Reología. Nanotubos de carbono. Potencial zeta. Suero fetal bovino. Aplicaciones biomédicas.

## RHEOLOGICAL BEHAVIOUR OF CARBON NANOTUBES SUSPENSIONS WITH BIOMEDICAL APPLICATIONS

**ABSTRACT:** The rheological behaviour of different carbon nanotubes suspensions in the dilute regime was evaluated. Suspensions of commercial multi-walled carbon nanotubes without functionalization, multi-walled carbon nanotubes oxidized in our laboratory with nitric acid under reflux for 24 hours and commercial multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic groups were studied. The study was performed in two dispersing media: water and fetal bovine serum (FBS). The results were compared with those obtained in previous work carried out for suspensions of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) to understand the influence of the structure of carbon nanotubes on the rheological properties when a biological medium is present. Structural characterization was performed with different techniques: XRD, IR, TGA, TEM, SEM and AFM. For the colloidal characterization, the zeta potential of the suspensions was determined at pH values between 4 and 9, our range of interest being between pH = 6-8, close to physiological pH. The measurements were done for different concentrations of suspensions (1, 1.5, 3 mg/mL) and temperature of 25, 30 and 37 °C.

**KEYWORDS:** Rheology. Carbon nanotubes. Zeta potential. Fetal bovine serum. Biomedical application.

### 1 INTRODUCCIÓN

En 1991 se produce el descubrimiento de una nueva forma alotrópica del carbono, los nanotubos de carbono (CNTs) que son estructuras nanométricas en forma tubular (Iijima, 1991). Se pueden clasificar en dos tipos en función del número de capas, los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) y los de pared múltiples (MWCNTs), los cuales están formados por varias capas concéntricas que se mantienen unidas gracias a las fuerzas de Van der Waals.

También, existe una manera de clasificarlos en función de cómo se forme el plegamiento de la lámina de grafeno. Los anillos hexagonales pueden tener un plano de simetría ortogonal o no respecto al eje del cilindro. Se pueden formar tres tipos diferentes: zigzag, quiral y armchair. Entre ellos tiene propiedades diferentes que vienen determinadas

por su diámetro y ángulo de quiralidad. Las propiedades mecánicas, elásticas, eléctricas, electrónicas, térmicas, magnéticas y químicas tan favorables que tienen los nanotubos de carbono, dependen de una serie de factores estructurales en función del tipo de nanotubo, ya sea por su número de capas o por su quiralidad.

Las excepcionales propiedades de los nanotubos de carbono mencionadas anteriormente, los hacen un material idóneo tanto para la creación de nuevos materiales y productos, como para la mejora de otros ya existentes.

El desarrollo de la nanotecnología en la última década ha brindado la posibilidad de emplear los materiales a escala molecular, atómica y subatómica, lo que ha generado una gran cantidad de aplicaciones en medioambiente, exploración espacial, tecnologías de la comunicación e informática, sector energético, textil, electrónica, biomédica, entre otras (Mejias et al., 2009; Piret et al., 2009; Cheng et al., 2011; Yusof et al., 2012).

Hoy en día existen una gran cantidad de productos que están siendo ensayados en el uso industrial, como es en la medicina y la biología, con aplicación en el diagnóstico, tratamiento, monitoreo y control de sistemas biológicos. Existen tres áreas principales en la nanomedicina donde se han conseguido importantes logros: el nanodiagnóstico, que consiste en el desarrollo de un sistema de análisis e imagen para la pronta detección de una enfermedad o funcionamiento erróneo de las células; la liberación controlada de fármacos transportando los medicamentos directamente a las células afectadas para que de esta manera el tratamiento sea más eficaz y con menos efectos secundarios; y, por último, la medicina regenerativa cuyo objetivo es el reemplazamiento o reparación de tejidos u órganos dañados (Mejias et al., 2009). Pocos son los trabajos publicados acerca del comportamiento reológico de nanoestructuras de carbono en suero fetal bovino.

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el comportamiento reológico de diferentes suspensiones de nanotubos de carbono en régimen diluido. En este caso, se estudiaron suspensiones de nanotubos de carbono de pared múltiples no funcionalizados (MWCNTs Com), nanotubos de carbono de pared múltiples oxidados con ácido nítrico a reflujo durante 24 horas preparados en nuestro laboratorio (MWCNTs Oxi) y nanotubos de carbono de pared múltiples comerciales con grupos carboxílicos (MWCNTs Com-Oxi) en dos medios de dispersión: agua y suero fetal bovino (FBS). Además, los resultados se compararon con estudios anteriores para el caso de suspensiones de SWCNTs (Cerpa et al., 2019).

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Nanotubos de carbono comerciales de pared múltiple (Sigma-Aldrich), pureza del carbón: >95%, longitud: 5  $\mu\text{m}$  y diámetro: 6-9 nm. Nanotubos de carbono

comerciales funcionalizados con grupos carboxílicos (Sigma-Aldrich). Nanotubos de carbono comerciales de pared múltiple oxidados con ácido nítrico a reflujo durante 24 horas (Bourlinos et al., 2006). Agua ultrapura, destilada y desionizada obtenida mediante el sistema Milli-Q (Millipore). Y como medio biológico Suero Fetal Bovino, FBS (Gibco, Thermo Scientific).

La caracterización estructural de las muestras en polvo se realizó, utilizando diferentes técnicas: Difracción de Rayos X (XRD), Espectroscopia Infrarroja (IR), Análisis Termogravimétrico (TGA), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM). En este trabajo, solo se muestran los resultados obtenidos mediante, IR; TEM y AFM. Las medidas de IR se realizaron utilizando un espectrofotómetro FT-IR Vector 22 (Bruker) equipado con analizador ATR de germanio en el rango de número de onda de 3500–700  $\text{cm}^{-1}$ . El análisis de las muestras por TEM fueron realizadas con un microscopio modelo JOEL JEM 2100. Para ello, se añade una gota de la dispersión acuosa preparada con una concentración de 0.005 mg/mL de sólidos sobre una rejilla de cobre y se deja secar durante un tiempo, antes de la observación. En el caso del análisis mediante SEM, se utilizó un microscopio JOEL JSM 6335F. La muestra en polvo se deposita en un porta de aluminio que previamente se le ha adherido un cinta de carbono. Posteriormente, se realizó un revestimiento de oro para la mejor visualización de la muestra.

Las imágenes mediante microscopía de fuerzas atómicas se obtuvieron con un AFM comercial (Nanotech Electronica, Cervantes Full Mode AFM System), en modo tapping. Los MWCNTs se dispersaron en agua y FBS mediante agitación ultrasónica (baño de ultrasonidos, 15 min) a una concentración de aproximadamente 0.0005 mg/mL. Posteriormente, se depositaron dos microlitros de dispersión sobre un sustrato de mica y se dejaron secar al aire para su posterior observación.

Para estudiar el comportamiento coloidal, se determinó el potencial zeta de las suspensiones a  $25.0 \pm 0.1$  °C y valores de pH entre 4 y 9. El potencial zeta (ZP) fue medido con un equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern (Reino Unido).

La caracterización reológica fue realizada en un reómetro rotacional (RheoStress 6000, Thermo Hakee, Alemania) mediante un sistema de doble cono y plato, de 60 mm de diámetro y ángulo de cono 20°. El software empleado para registrar los datos es el Rheowin Job y para el tratamiento y análisis de los mismos se utilizó el Rheowin Data. Durante las mediciones, el ciclo de velocidad controlada (CR) consta de varias etapas, primero un aumento del gradiente de velocidad de 0 a 1000  $\text{s}^{-1}$  en 300 s, posteriormente un periodo de velocidad constante a 1000  $\text{s}^{-1}$  durante 60 s y, por último, una disminución de velocidad desde 1000  $\text{s}^{-1}$  a 0  $\text{s}^{-1}$  en 300 s.

Las medidas reológicas se han realizado en suspensiones preparadas a diferentes concentraciones (1, 1.5 y 3 mg/mL) y con los tres tipos de nanotubos de pared múltiples (MWCNTs) que han sido seleccionados para su estudio, a temperaturas de 25, 30 y 37 °C, utilizando agua y FBS como medio de dispersión. Antes de realizar la medida reológica, las muestras se han sometido a 5 min de ultrasonidos (US) en un sonicador de punta Sonicador (SONOPLUS HD 2070 BANDELIN) a una potencia del 50% para conseguir una mejor dispersión de los nanotubos de carbono. Para cada muestra se realizan 3 réplicas.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

En trabajos previos realizados por los autores (Negri et al., 2010, Cerpa et al., 2013, Cerpa et al., 2019) se pueden encontrar más detalles de la caracterización estructural de los diferentes nanotubos SWCNTs utilizados en la comparativa realizada con los MWCNTs estudiados en este trabajo.

Los espectros de IR mostrados en la Figura 1 confirmaron la presencia de grupos carboxílicos con la banda de estiramiento del grupo (C=O) a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , la vibración de estiramiento (C–O) del grupo carboxílico alrededor de  $1200\text{ cm}^{-1}$  y la banda de estiramiento O–H a  $3400\text{ cm}^{-1}$ . El pico alrededor de  $1570\text{ cm}^{-1}$  se asignó al estiramiento C=C del esqueleto de carbono. Las imágenes TEM muestran la estructura tubular de los nanotubos de carbono que tienden a mostrarse en forma de manojos agrupados. Los MWCNTs Com tienen longitudes de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , mientras que los MWCNTs Oxi y MWCNTs Com-Oxi presentan una distribución de longitudes entre 100-400 nm y 400 nm-1.5  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

La Figura 2, muestra la alta tendencia a la agregación de los nanotubos de carbono con la proteína de albúmina de suero bovino (BSA) presente en el suero fetal bovino, cuya proteína es la predominante. Este comportamiento también se observó mediante el modelado de simulaciones utilizando cálculos de dinámica molecular (Cerpa et al., 2019).



Figura 1. Caracterización fisicoquímica de MWCNTs Com, MWCNTs Com-Oxi y MWCNTs Oxi. (a) Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), (b) Espectros infrarrojos (IR).

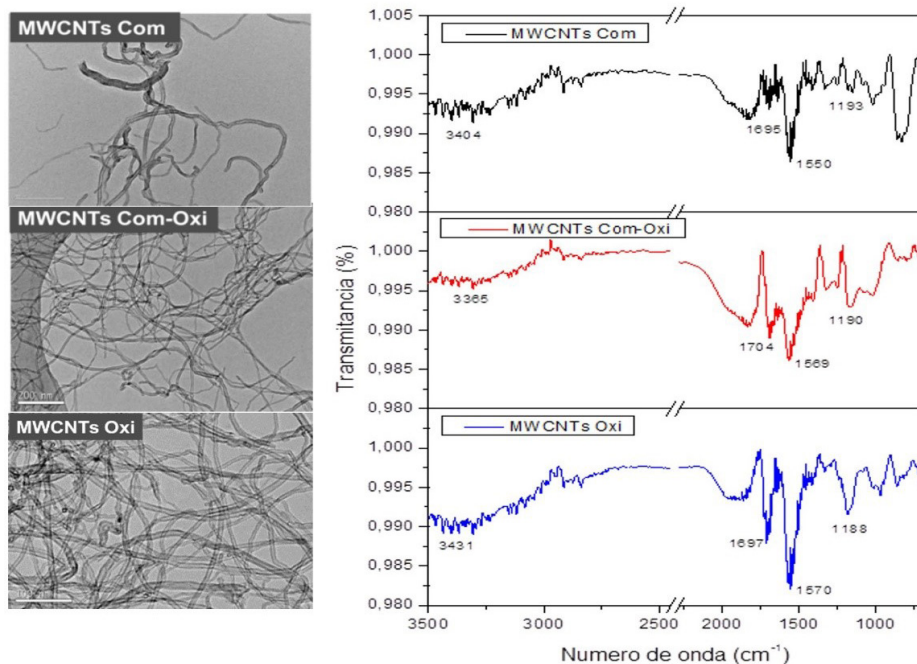
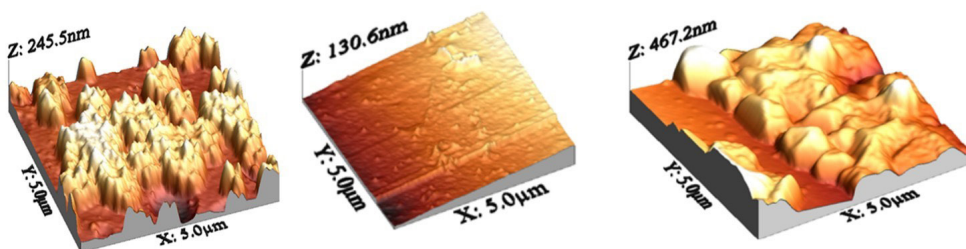


Figura 2. AFM, Representación tridimensional (3D) de (a) suero fetal bovino (FBS), (b) MWCNTs Com-Oxi y (c) SWCNT oxidados durante 24 horas en suspensiones FBS.

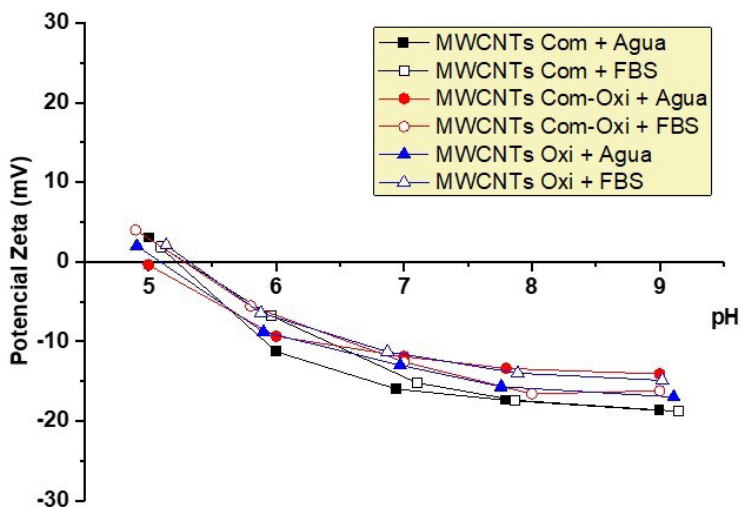


### 3.2 ESTABILIDAD COLOIDAL

En la Figura 3, se muestran los valores potencial zeta de los diferentes nanotubos tipo MWCNTs medidos en dos medios de dispersión: agua y FBS. Las suspensiones en agua son ligeramente más estables que en FBS y tienen un ZP mayoritariamente con valores negativo y comprendido entre -10 y -18 mV, mientras que en el medio FBS su potencial zeta varían de -6 a -18 mV a pH = 6-8, que es el rango de pH de más interés en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, el ZP del FBS sin presencia de nanotubos de

carbono fue también determinado, obteniéndose un valor medio de potencial zeta de alrededor de -20 mV y un valor de PIE = 5.8. Este mismo comportamiento se observó para los SWCNTs (Cerpa et al., 2019).

Figura 3. Potencial zeta vs pH para diferentes suspensiones de nanotubos de carbono (MWCNTs) en agua y FBS a T = 25 °C.



A continuación, en la Tabla 1 se muestra los valores de potencial zeta (ZP) y punto isoeléctrico (PIE) obtenidos para las suspensiones de los diferentes MWCNTs estudiados a temperatura de 25 °C. Podemos apreciar que los valores de PIE se encuentran alrededor de pH = 5. Además, se compara con los valores de ZP obtenidos por Cerpa et al. (2019) en nanotubos SWCNTs.

Tabla 1. Comparativa del potencial zeta (PZ) a pH = 7 y el valor de pH del PIE para diferentes suspensiones de nanotubos de carbono en agua y FBS a T = 25 °C.

Tipos de nanotubos	AGUA		FBS	
	PZ (mV)	PIE	PZ (mV)	PIE
MWCNTs Com	-17	5.09	-15.2	5.32
MWCNTs Com-Oxi	-12	4,96	-12.3	5.27
MWCNTs Oxi	-13	5.21	-11.3	5.28
SWCNTs Com	-30	-	-18	-
SWCNTs Oxi	-70	-	-21	-

### 3.3 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

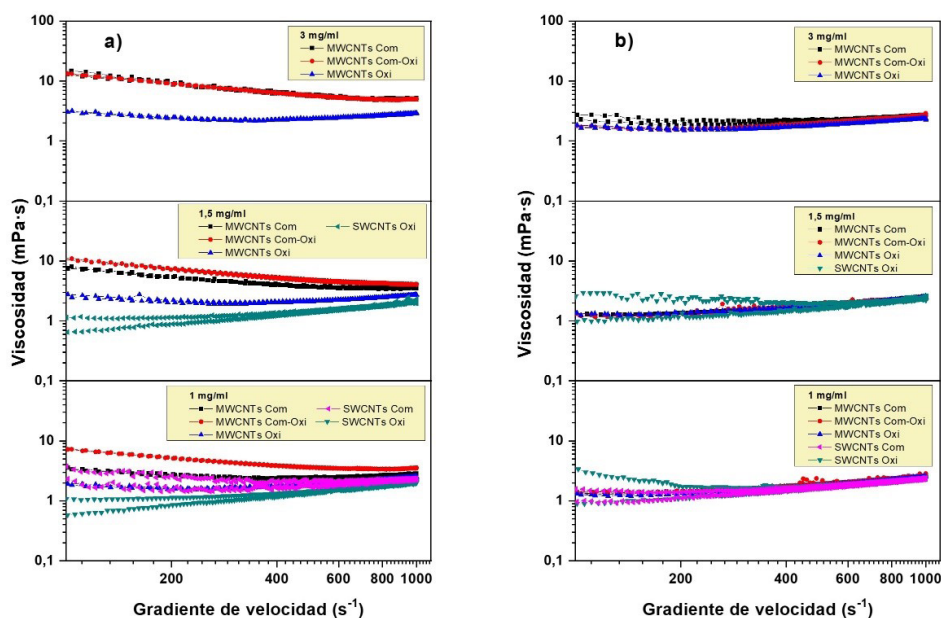
#### 3.3.1 Efecto del tipo y concentración de CNTs

En la Figura 4, se muestra la viscosidad en función del gradiente de velocidad para las diferentes suspensiones de MWCNTs estudiadas a diferentes concentraciones y temperatura de 37 °C en agua y FBS. Además, se compara con los resultados obtenidos para las suspensiones de SWCNTs en los mismos medios de dispersión (Cerpa et al., 2019). Las suspensiones preparadas en ambos medios de dispersión muestran un comportamiento de un fluido newtoniano.

Se aprecia que el cambio de concentración en la suspensión preparada con FBS no provoca cambios significativos en los valores de viscosidad, mientras que, en las suspensiones acuosas la viscosidad aumenta al aumentar la concentración. Los valores de viscosidad de las suspensiones de MWCNTs son mayores que los de las suspensiones de SWCNTs cuando el medio de dispersión es agua. Los valores de viscosidad de las suspensiones de MWCNTs se encuentran entre 2 y 6 mPa·s y para el caso de las suspensiones de SWCNTs son inferiores a 3 mPa·s.

Se confirma que en el medio acuoso la concentración es un parámetro influyente en el valor de viscosidad, mientras que en el FBS no se aprecia variación considerable en la curva de viscosidad respecto a la concentración.

Figura 4. Viscosidad vs gradiente de velocidad para diferentes suspensiones de nanotubos de carbono y distintas concentraciones a temperatura de 37 °C. a) Agua y b) FBS.



En la Tabla 2, se muestra una comparativa de la viscosidad para los MWCNTs y SWCNTs a 37 °C en agua y FBS y para gradientes de velocidad de 500 s<sup>-1</sup> y 1000 s<sup>-1</sup>. Se puede apreciar que los cambios de viscosidad son poco significativos, los valores obtenidos se diferencian poco, como consecuencia del comportamiento de un fluido newtoniano. Se observa un aumento de la viscosidad con la concentración de la suspensión, así como la variación de esta con el tipo de nanotubo de carbono utilizado, obteniendo valores mayores cuando se utilizan los nanotubos de pared múltiple (MWCNTs).

Tabla 2. Comparativa de la viscosidad para los distintos nanotubos de carbono (MWCNTs y SWCNTs) en agua y FBS a 37 °C.

Tipos de nanotubos	Gradiente de velocidad (s <sup>-1</sup> )	Viscosidad en mPa·s (37 °C)					
		AGUA			FBS		
		Concentración en mg/mL					
		1	1.5	3	1	1.5	3
MWCNTs Com	500	2.448	3.658	5.624	1.923	1.851	2.315
	1000	2.835	3.527	5.004	2.605	2.538	2.754
MWCNTs Com-Oxi	500	3.562	4.652	5.645	1.841	1.870	2.038
	1000	3.519	4.052	5.002	2.530	2.511	2.698
MWCNTs Oxi	500	1.912	2.198	2.384	1.820	1.818	1.885
	1000	2.529	2.718	2.886	2.523	2.512	2.392
SWCNTs Com	500	2.117	-	-	1.740	-	-
	1000	2.257	-	-	2.358	-	-
SWCNTs Oxi	500	1.457	1.472	-	1.853	2.018	-
	1000	2.084	2.029	-	2.376	2.474	-

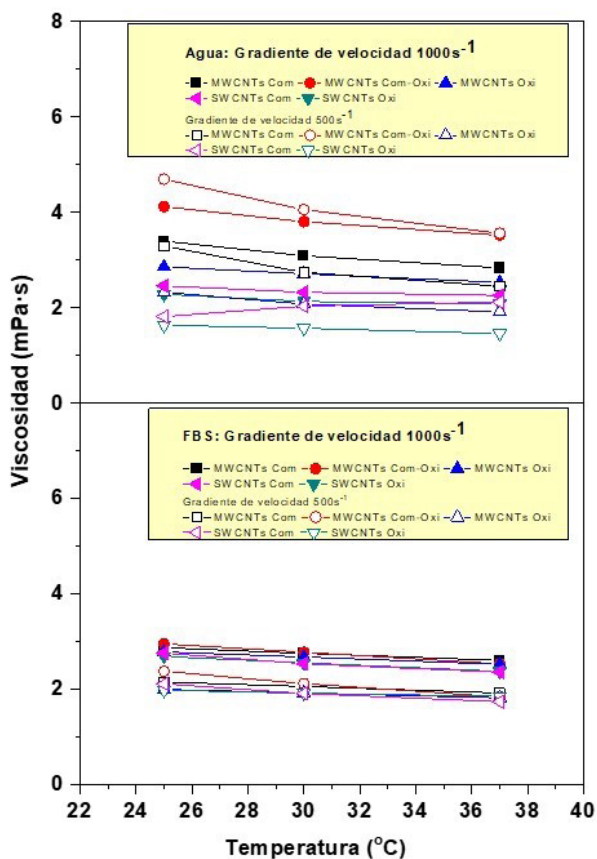
### 3.3.2 Efecto de la temperatura y el medio de dispersión

En la Figura 5, se ha representado de manera esquemática los valores que de viscosidad en función de la temperatura a una concentración de 1 mg/ mL para los dos medios de dispersión estudiados (agua y FBS).

Como se puede observar la viscosidad disminuye con la temperatura, tal como es esperado. Por otro lado, se aprecia que el medio de dispersión es un factor que influye en la estabilidad y comportamiento reológico de las suspensiones. Para los distintos tipos de nanotubos MWCNTs dispersados en agua, se aprecia que los MWCNTs Com-Oxi son los que tienen valores de viscosidad más altos (4-5 mPa·s) a una temperatura de 25 °C y, por lo tanto, se trata de suspensiones menos estables o con valores de potencial zeta

más bajos (-12 mV). Además, se puede observar que el rango de viscosidad es más amplio para los diferentes MWCNTs estudiados (2 y 6 mPa·s) comparados con los resultados obtenidos para SWCNTs (Cerpa et al., 2019) cuyos valores de viscosidad son más bajos (<3 mPa·s), cuando el gradiente de velocidad es 1000 s<sup>-1</sup>. En cambio, cuando el medio de dispersión es FBS, el rango de viscosidad de los nanotubos MWCNTs es más estrecho, comprendidos entre (1.8 – 2.8 mPa·s). Lo mismo sucede al comparar con los valores obtenidos para los SWCNTs (Cerpa et al., 2019).

Figura 5. Viscosidad vs Temperatura para diferentes suspensiones de nanotubos de carbono a una concentración de 1 mg/mL en agua y FBS.



#### 4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por Atomic Force Microscope muestran una alta tendencia a la agregación entre los nanotubos de carbono y la proteína de albúmina de suero bovino (BSA) presente en el suero fetal bovino.

La estabilidad coloidal de los nanotubos de carbono cambia con el tipo y tamaño, así como, con el medio de dispersión.

Las suspensiones preparadas en agua y FBS muestran un comportamiento de flujo newtoniano. Dependiendo del medio de dispersión y tipo de nanotubos de carbono utilizado, la viscosidad cambia. Los valores de viscosidad de las suspensiones de MWCNTs son mayores (2 y 6 mPa·s) comparadas con las de los SWCNTs (<3 mPa·s), cuando se utiliza agua como medio de dispersión.

El cambio de concentración en la suspensión preparada con FBS no provoca cambios significativos en los valores de viscosidad mientras que en las suspensiones acuosas la viscosidad aumenta al aumentar la concentración. Además, observamos que la viscosidad disminuye linealmente con el aumento de temperatura de 25 °C a 37 °C, aunque los cambios son pequeños.

## 5 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto UEM14 (Universidad Europea de Madrid) y MICINN CTQ2010-20960-C02-01 (BQU), MINECO CTQ2013-47699-R.

## REFERENCIAS

Bourlinos, A., Georgakilas, V., Tzitzios, V., Boukos, N., Herrera, R., & Giannelis, E. (2006). Functionalized Carbon Nanotubes: Synthesis of Meltable and Amphiphilic Derivatives. *Small*, 2(10), 1188–1191. <https://doi.org/10.1002/smll.200600221>

Cerpa, A., Köber, M., Calle, D., Negri, V., Gavira, J. M., Hernanz, A., Briones, F., Cerdán, S., & Ballesteros, P. (2013). Single-walled carbon nanotubes as anisotropic relaxation probes for magnetic resonance imaging. *MedChemComm*, 4(4), 669. <https://doi.org/10.1039/c3md20235f>

Cerpa, A., Lado, I., Quiroga, O., Moreno, R., García, R., Cerdán, S., & Abu-Lail, N. I. (2019). Colloidal and rheological characterization of SWCNT in biological media. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 10(4), 300–315. <https://doi.org/10.1080/19475411.2019.1694555>

Cheng, X., Zhong, J., Meng, J., Yang, M., Jia, F., Xu, Z., Kong, H., & Xu, H. (2011). Characterization of Multiwalled Carbon Nanotubes Dispersing in Water and Association with Biological Effects. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2011/938491>

Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354(6348), 56–58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>

Mejías Sánchez, Y., Cabrera Cruz, N., Toledo Fernández, A. M., & Duany Machado, O. J. (2009). La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*, 35(3), 0. <https://doi.org/10.1590/s0864-34662009000300006>

Negri, V., Cerpa, A., López-Larrubia, P., Nieto-Charques, L., Cerdán, S., & Ballesteros, P. (2010). Nanotubular Paramagnetic Probes as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging Based on the Diffusion Tensor. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(10), 1813–1815. <https://doi.org/10.1002/anie.200906415>

Piret, J. P., Detriche, S., Vigneron, R., Vankoningsloo, S., Rolin, S., Mejia Mendoza, J. H., Masereel, B., Lucas, S., Delhalle, J., Luiz, F., Saout, C., & Toussaint, O. (2009). Dispersion of multi-walled carbon nanotubes in biocompatible dispersants. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1), 75–82. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9697-8>

Yusof, A. M., Abdul Rashid, N. A., Abbasi, M. J., Kopaiee Malek, T., & Kopaieemalek, S. (2012). Study of stability and Dispersibility of oxidized multiwall carbon nanotube and characterization with analytical methods for bioapplication. *Journal of Chemical Health Risks*, 1(2). <https://dx.doi.org/10.22034/jchr.2012.543975>



## CAPÍTULO 3

### PREMOLARES HUMANOS: ESTUDIO DE FOSITAS INYECTADAS CON COLORANTE Y SU RELACION CON ESTRUCTURAS DENTINALES

Data de submissão: 21/10/2021

Data de aceite: 05/11/2021

#### **Marcela Zaffaroni**

Odontóloga

Auxiliar Docente Cat

Biología, Histología y Embriología Genética

Facultad de Odontología

Inst. Univ. Italiano de Rosario (IUNIR)

Rosario (2000), Santa Fe

República Argentina

marcelazaffaroni@hotmail.com

#### **Santiago Cueto**

Matemático

Licenciado en Estadística Aplicada

Profesor Adjunto Cat

Cibernética Médica y Bioinformática

Facultad de Medicina, IUNIR

Rosario (2000), Santa Fe

República Argentina

santiagocueto@gmail.com

CV

#### **Alicia Kohli**

Dra. en Odontología y

Dra. en Ciencias Biomédicas

Profesora Titular Cat

Anatomía, Histología y Embriología Dentaria

Facultad de Odontología, IUNIR

Rosario (2000), Santa Fe

República Argentina

aliciakohli2009@hotmail.com

**RESUMEN:** La cara oclusal de premolares se desarrolla por unión de cuatro lóbulos adamantinos. Su falta de coalescencia origina las fosas excavadas en esmalte las que pueden comunicarse con la dentina subyacente. Esmalte y dentina están separados por el límite amelodentinal y relacionados por estructuras dentinales como canalículos, husos y penachos de Linderer. La permeabilidad de la dentina permite la invasión bacteriana, junto con sus toxinas y ácidos, favoreciendo el avance de caries. Objetivos: analizar histológicamente: las formas de la fosa y de su parte terminal, tipo de esmalte alrededor del terminal y paso de colorante desde la fosa hacia dentina. Se incluyeron premolares superiores (PMS) e inferiores (PMI) sanos, ambos sexos, extraídos en servicios públicos, privados y del IUNIR. Las raíces se inmovilizaron en moldes con sus coronas emergentes, se inyectó fucsina y se la dejó secar. Las caras libres vestibular, palatina o lingual fueron devastadas hasta su proximidad a las fosas. Mediante la técnica de desgaste se obtuvieron láminas transparentes que se examinaron con microscopio óptico (MO). Total, 30 premolares, 15 superiores y 15 inferiores. La fosa con forma de tubo amplio fue mayoría ( $p=0,0255$ ); predominaron el terminal redondeado de mayor tamaño ( $p=0,0049$ ); el esmalte fisurado adherido a estructuras dentinales ( $p=0,0068$ ). En ambos grupos hubo paso mínimo de tinción ( $p<0,0001$ ). En PMI, la mayoría fueron varones con mayor edad promedio, a diferencia del grupo de PMS. El

esmalte irregular alrededor de la parte terminal fue similar al nudoso de las cúspides y podría tener la misma función. Las características en PMI que pueden predisponer a la caries: esmalte fisurado adherido a estructuras dentinales y la forma de terminación de las fosas que originan una mayor superficie de contacto. El paso del colorante fue mínimo, se debería probar otros métodos para difundirlo profundizando en este tema.

**PALABRAS CLAVES:** Tipos de esmalte. Permeabilidad dentinal. Factores de caries.

## HUMAN PREMOLARS: STUDY OF OCCLUSAL PITS INJECTED WITH DYE AND THEIR RELATIONSHIP WITH DENTINAL STRUCTURES

**ABSTRACT:** The occlusal face of the premolars is developed by the union of four adamantine lobes. Its lack of coalescence results in pits excavated in enamel which can communicate with the underlying dentin. Enamel and dentin are separated by the amelodentinal limit and related by dentinal structures such as canaliculi, spindles, and Linderer's plumes. The permeability of dentin allows bacterial invasion, together with its toxins and acids, favoring the advancement of cavities. Objectives: histologically analyze: the shapes of the fossa and its terminal part, type of enamel around the terminal and passage of dye from across the fossa to dentin. Healthy upper (PMS) and lower (PMI) premolars were included, both sexes, extracted in public, private and the IUNIR services. The roots were immobilized in molds with their emerging crowns, fuchsin was injected and allowed to dry. The buccal, palatal or lingual free faces were devastated up to their proximity to the fossae. Through the wear technique, transparent sheets were obtained which were examined with an optical microscope (MO). Total, 30 premolars, 15 upper and 15 lower. The tube-shaped big fossa was the majority ( $p = 0.0255$ ); the big he rounded terminal were predominated ( $p = 0.0049$ ) and he were the fissured enamel joined to dentinal structures ( $p = 0.0068$ ). In both groups there was a minimal staining step ( $p < 0.0001$ ). In PMI, the most there was men with an older average age, unlike the PMS group. We found irregular enamel around the terminal part of the pit similar at found in cusps. The characteristics in PMI that can predispose to caries are fissured enamel adhered to dentinal structures and the termination of the pits that create a greater contact surface. The dye step was minimal but other methods should be tried and to depth on this topic.

**KEYWORDS:** Enamel types. Dentinal permeability. Caries factors.

### 1 INTRODUCCIÓN

**a-** Estos dientes, ubicados por detrás de los caninos, se desarrollan por la unión de cuatro lóbulos embriológicos: tres vestibulares y uno palatino o lingual cuyo mayor desarrollo permite la aparición de la cara oclusal con dos cúspides separadas por un surco, éste es una hendidura que señala el fin de la zona de coalescencia. Adoptan una forma y disposición útiles para definir las diferencias anatómicas entre premolares superiores e inferiores.

**b-** También se forman excavaciones irregulares algo más profundas que los surcos llamadas fosas principales una mesial y otra distal las que no siempre se hallan

alineadas entre sí (Aprile H. 1967). En la profundidad de las fosas se unen dichos lóbulos y cuando su coalescencia es incompleta dejarían dentina al descubierto (Aprile H. 1967; Figún M. 2008; Gomez de Ferraris M.E.2009). Están excavadas superficialmente pero se profundizan y transcurren por la corona hasta terminar cercanas al tejido dentinal. Este tejido es permeable por la presencia de tubulos dentinales, los que permiten el avance de gérmenes cariogénicos, sus toxinas y ácidos producidos por su metabolismo (Nikiforuk G. 1991). Además, su dureza es menor por tener mayor contenido orgánico en su composición química (Gomez de Ferraris M.E.2009); García Barbero 1997). Esmalte y dentina están separados por el límite amelodentinal (LAD) traspasado por estructuras dentinales, también llamadas ajenas como: túbulos o canaliculos dentinales penetrantes, husos adamantinos y penachos de Linderer (Gomez de Ferraris M.E. 2009).

**c-** La función de los premolares es triturar el alimento, confinado en el sitio de molienda y uno de los factores de riesgo para enfermar de caries son las características de la cara oclusal que favorece la acumulación de placa bacteriana y restos de alimentos como sucede con las fosas (García Barbero 1997).

**d-** Son importantes los cuidados parentales como el cepillado dental y tratamientos fluorados entre ellos los dentífricos y selladores oclusales (Yuca G. 1998; Sonbul H. 2011; Lin Y. 2001). También influye el control de dieta aplicado desde la infancia y que debería ser puesto en practica durante todas las etapas de la vida (Lalic M. 2013). El consumo de hidratos de carbono cariogénicos esta difundido en nuestra población, porque son de fácil acceso por su bajo costo y disponibilidad (Kohli A. 2007). Si son consumidos en bocas con factores anatómicos desfavorables se incrementaría el riesgo de caries. Estudios epidemiológicos realizados durante el siglo XIX, han demostrado que la caries es baja en poblaciones que siguen una dieta con poco azúcar pero que aumenta la tasa de caries cuando se deja la dieta y se adquieren los hábitos convencionales de alimentación (Gustaffson B. 2008). Si los alimentos y bebidas son azucarados y adhesivos, son más difíciles de eliminar, pasan mayor tiempo en contacto con la superficie dental y los gérmenes producen mayor desmineralización (García Barbero 1997).

**e-** Nuestros objetivos fueron analizar histológicamente, las formas de la fosa y de su parte terminal, tipo de esmalte alrededor de ellas y filtración de colorante en fosas oclusales de premolares res humanos para detectar factores microscópicos que pueden influir en el desarrollo de caries.

**f-** Los datos fueron evaluados con un análisis descriptivo-relacional, comparación entre e intra grupos, test de Mann-Whitney/Pueba bilateral y se complementaron con el test Z de comparación de proporciones para muestras independientes, con un nivel de significación del 5%.

## 2 MATERIAL Y METODO

a- No consideramos que fuera necesaria la aprobación del Comité de Ética, porque los dientes fueron donados a estudiantes de Odontología espontáneamente por los pacientes, quienes los extrajeron en servicios públicos, privados y del IUNIR donde posteriormente realizaron tratamiento ortodóncico.

b- Se incluyeron premolares superiores (PMS) e inferiores (PMI) sanos, de ambos sexos. Fueron separados en grupos, según pertenecieran al arco superior o inferior. Luego, las raíces dentales fueron cubiertas con cera y se inmovilizaron con yeso taller en moldes, dejando las coronas emergentes, como se puede observar en la fotografía número 1.

c- Con jeringa, se les inyectó fucsina a presión y se la dejó secar. Se utilizó instrumental rotatorio para desvastar sus caras libres en sentido mesio-distal, se preservó la parte central con las fosas, como se aprecia en la fotografía número 2.

d- Se separó el tejido remanente y con técnica por desgaste, se lo redujo a una lámina transparente frotándolo sobre piedras de grano grueso, mediano y fino, el avance del trabajo se comprueba en la fotografía número 3.

Fotografía N° 1



Fotografía N° 2



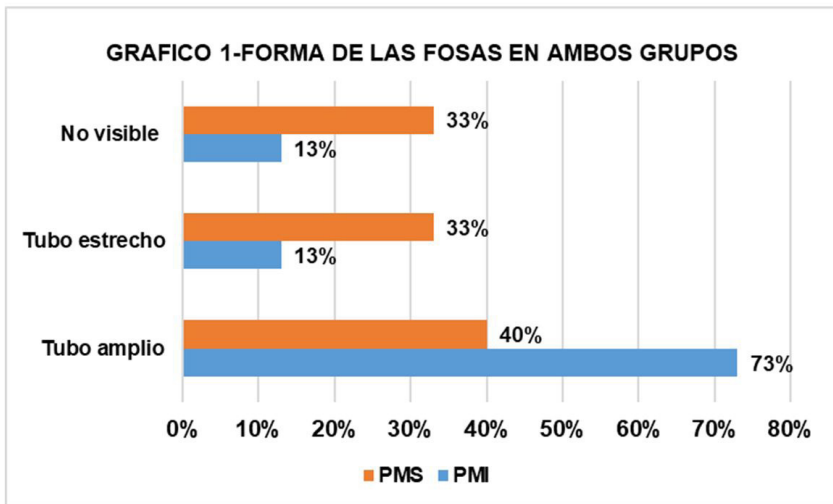
Fotografía N° 3



e- Las fosas fueron analizadas con MO a menor (100X) y mayor aumento (400X) y se tomaron fotografías de los campos más representativos.

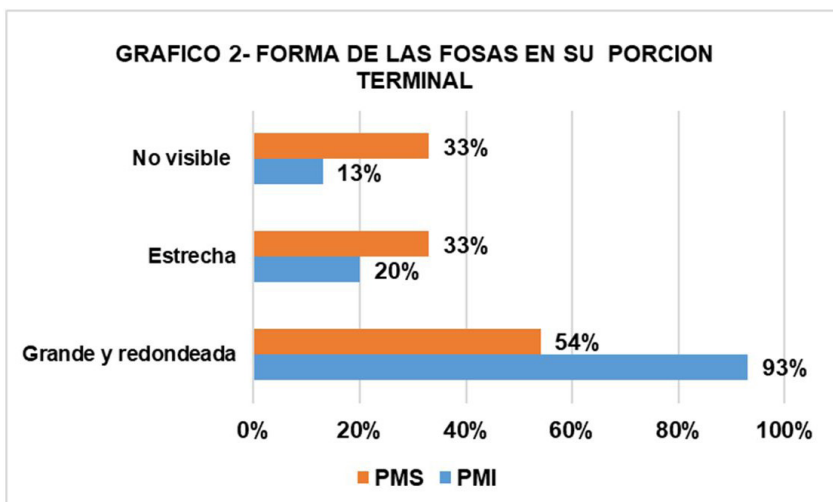
## 3 RESULTADOS

a- Obtuvimos un total treinta dientes: 15 PMS, provenientes de pacientes masculinos en un 33% y femenino en un 67%; edad promedio  $15 \pm 7,6$ . El segundo grupo contó con 15 PMI, un 53% de varones y 47% de mujeres; edad promedio de  $18 \pm 9$ . Cuando se analizó la **forma de la fosa**, hubo algunas **no visibles**: 33% en PMS y 13% en PMI ( $p=0.0998$ ); otras con forma de **tubo estrecho**: 33% y 13% respectivamente ( $p=0.0998$ ) y de **tubo amplio**: 40% en PMS y 73% en los PMI, con diferencia significativa ( $p=0.0255$ ). Datos estadísticos en el gráfico número 1.

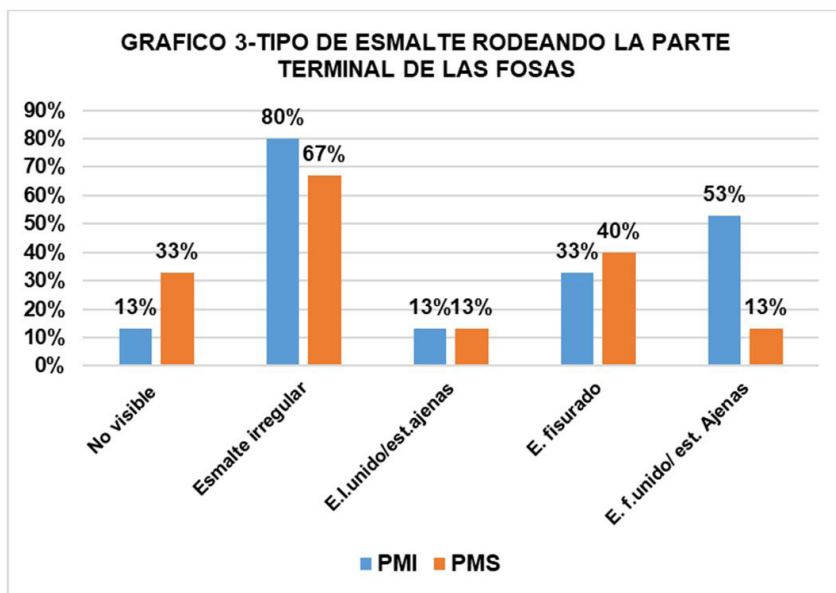


b- Según terminara cercana o no al LAD, la **longitud de la fosa** fue **No visible** 33% en PMS y 13% en PMI ( $p=0,0998$ ); **cortas** superiores 41% y 67% en inferiores ( $p=0,1643$ ), **largas** 26% y 20% respectivamente ( $p=0,742$ ), comprobamos que ninguna diferencia estadística fue significativa.

c- A 400X, examinamos la **forma de la fosa en su porción terminal** hallándose algunas no visibles 33% en PMS y 13% en PMI, terminales de diámetro **estrecho** 33% en PMS y 20% en PMI ( $p=0,35$ ); **grande y redondeada** 54% en PMS y 93% en inferiores, siendo esta diferencia significativa ( $p=0,0049$ ). La distribución estadística, se observa en el grafico número 2.

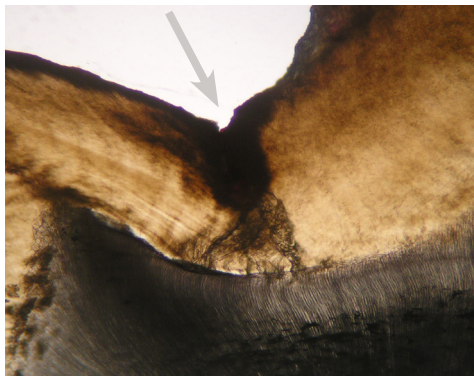


**d-** El aspecto histológico del esmalte alrededor de la porción terminal de la fosa fue **no visible** 33% en superiores y 13% en inferiores, **irregular** 67% en PMS y 80% en PMI ( $p=0.3483$ ); **irregular unido a estructuras dentinales o ajenas** 13% en ambos grupos ( $p=0.99$ ); **fisurado** 40% en PMS y 33% en los PMI ( $p=0.99$ ) y **fisurado-unido a estructuras ajenas** 13% en superiores y 53% en PMI, con diferencia significativa ( $p=0.0068$ ). Datos en el grafico número 3.

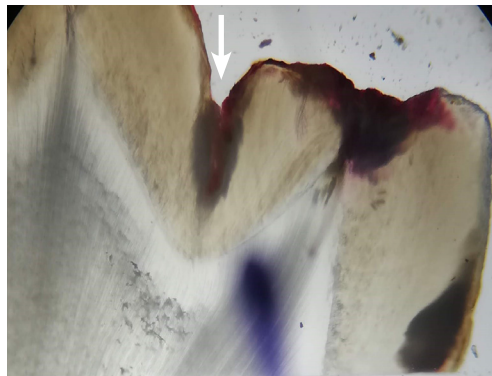


**e-**A 100X, se observan tipos de fosas, en la fotografía número 4 una fosa corta con forma de tubo amplio, cuya terminación está rodeada con esmalte fisurado comunicado con la dentina. En la número 5, otra con características similares, pero sin defectos de esmalte ni comunicación con dentina.

**Fotografía N° 4**

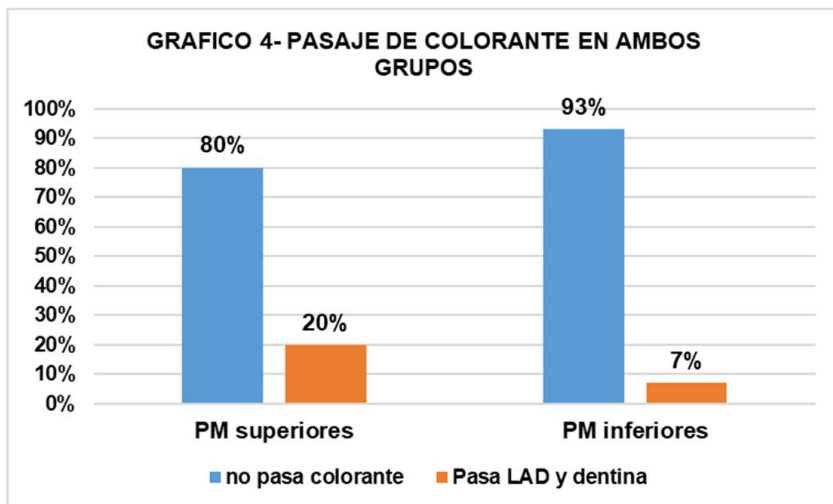


**Fotografía N° 5**



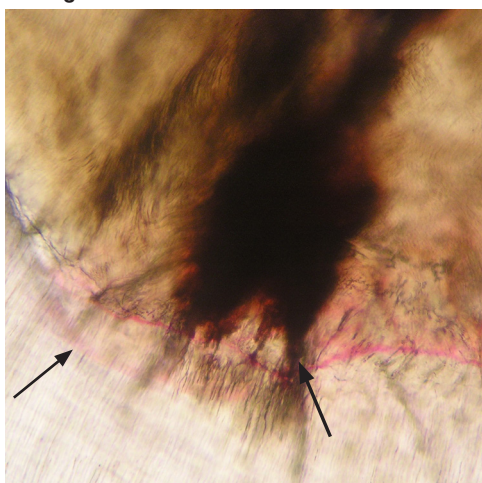


f- El colorante en PMS, mostró un 80% de no pasaje a dentina y estructuras dentinales y solamente hubo un 20% de pasaje. En PMI el no pasaje fue de 93% y solamente hubo un 7% de infiltración, con una diferencia muy significativa ( $p < 0.0001$ ). Los datos se constatan en el grafico 4.



g- A 400 X, en la fotografía número 6, se aprecia la parte terminal de una fosa redondeada, de mayor tamaño comunicada con la dentina por los canalículos dentinales a través de los cuales se comprobó el pasaje de colorante. En la número 7, la parte terminal está rodeada de esmalte irregular, fisurado y unido a estructuras dentinales, con paso de colorante a través de la fisura.

**Fotografía N°6**



**Fotografía N°7**





## 4 DISCUSIÓN

**a-** Este fue un estudio observacional descriptivo de características morfo-histológicas en dos grupos de premolares. Por sus características anatómicas fueron discriminados por arco de pertenencia concordando nuestra descripción con los datos aportados por anatomistas odontológicos (Aprile H. 1967).

**b-** Cuando se desgastaron las caras libres se preservó la parte central con el surco y ambas fosas. Pero al reducir el volumen dental, llevándolo a un plano y obtener una lámina transparente, se perdió la visibilidad en forma total o parcial de una de ellas. Este resultado concuerda con las descripciones de los anatomistas que sostienen que ambas fosas no son simétricas, pueden estar ligeramente desplazadas hacia vestibular o lingual y más cerca o lejos de los rebordes marginales respectivos (Aprile H. (1967); Figún 2008).

**c-** Hemos comprobado que en ambos grupos de PM existen fosas de longitud y forma diferentes. Este hallazgo concuerda con los resultados de un estudio realizado sobre réplicas de resina de vinilo que incluía la parte terminal de las fosas de PM. Estas fueron observadas con microscopio electrónico de barrido, obtuvieron microfotografías y las clasificaron en cuatro tipos diferentes: puntiagudas, curvas, con varias separaciones que luego se reúnen y con forma redondeada y grande también denominada de cabeza de rosa) (Galil, Khadry A 1973). Si bien nosotros no las hemos clasificado, nuestra descripción concuerda con algunas de las formas descritas, entre ellas las que denominamos estrechas las que pueden identificarse con las puntiagudas y las redondeadas de mayor tamaño similares a la forma denominada cabeza de rosa. Estas terminaciones actuarían como nichos retentivos para la placa bacteriana, restos de alimentos y gérmenes cariogénicos, pero no hallamos trabajos similares con los cuales comparar nuestros resultados.

**d-** El esmalte nudoso, descrito en bordes incisales y cúspides tiene por función resistir las fuerzas de la masticación (Gomez de Ferraris M.E. 2009). El esmalte irregular hallado por nosotros alrededor de las fosas en ambos grupos, es similar histológicamente, pero ocupa otro lugar anatómico. También hemos hallado defectos en el esmalte que rodea la porción terminal de las fosas, los que hemos denominados fisuras por ser muy similares a líneas de fractura. Esta denominación tal vez no sea la apropiada, podría confundirse nuestro hallazgo histológico con el nombre con que suele definirse al surco oclusal durante su mineralización (Campos A. 2000). Comprobamos que algunas fisuras comunican el esmalte con dentina e involucran a las estructuras dentinales, este defecto podría desorganizar la matriz dentinal facilitando el avance de

la caries. Consideramos que a los factores anatómicos descritos en la bibliografía, se los debería complementar con datos histológicos porque en mayor o menor grado influyen en el desarrollo de caries.

**e-** Esta afecta sobre todo a los pacientes que carecen de autocuidados dentales y no realizan las restauraciones correspondientes (Kohli A. 2011). Pero nunca contamos con los datos sobre dichos cuidados en los donantes (Lalic M. 2013) y no hallamos investigaciones similares para realizar una comparación.

En Rosario, hay pacientes que por motivos económicos, gusto o costumbres, no utilizan elementos fluorados de venta libre como dentífricos y colutorios (Yuca G. 1998; Sonbul H. 2011; Hirata Y. 2003). Tampoco recurren al sellado preventivo de fosas y fisuras como se aconseja (Beauchamp J. 2008), pero no es el caso de nuestros donantes quienes extrajeron sus premolares sanos para realizar tratamiento ortodóncico. Además, las caras oclusales no mostraron rastros que evidenciaran el haber sido tratados con sellantes.

Otro factor que influye en el desarrollo de caries es la calidad de la dieta, siendo importante evitar aquellos alimentos considerados peligrosos para la integridad de los tejidos dentales. Entre ellos el consumo excesivo de hidratos de carbono cariogénicos porque se comprobó que jóvenes y adultos con consumo de estos alimentos en forma diaria en reiteradas ocasiones presentaban un índice CPO más elevado que aquellos que los consumían ocasionalmente (Kohli A. 2007). Otro es el consumo excesivo de alimentos azucarados sobre el cual investigadores concluyeron que ocho exposiciones diarias del esmalte a la sacarosa produce mayor desmineralización en el esmalte y aumento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de estreptococos mutans en la placa dental (Cury J. 2001). También se comprobó que los dulces adhesivos, tardan mayor tiempo en ser eliminados de la superficie dental aumentando la desmineralización superficial del esmalte (Krasse B. 2001). Pero en nuestro estudio no se incluyeron datos sobre consumo de los alimentos descritos, debido a este hecho, consideramos útil difundir consejos de dieta (Al-Dajani M.2012).

**f-** Hemos hallado un paso mínimo del colorante en ambos grupos, aunque éste fue algo mayor en PMS comparado con los inferiores. Deberíamos probar otros medios para difundirlo por eso consideramos que se debería profundizar en este tema. Pero nuestro resultado puede ser útil para decidir que piezas sellar preventivamente primero en un plan de tratamiento. También, aconsejamos recurrir al sellado preventivo de fosas, para aislar los posibles defectos del esmalte del medio bucal, evitar las grandes caries y la pérdida de piezas dentales recuperables.

## 5 CONCLUSIONES

**a-** En el grupo de PMI hubo mayoría de pacientes masculinos y mayor promedio de edad a diferencia del grupo de premolares superiores.

**b-** En los PMI, las fosas cortas con forma de tubo amplio son un riesgo predisponente de caries por favorecer el empaquetamiento de placa bacteriana y restos de alimentos.

**c-** Además, si la porción terminal es redondeada y de mayor tamaño también lo es, porque pone en contacto los ácidos resultantes del metabolismo microbiano con la permeabilidad dentinal y sus estructuras.

**d-** En ambos grupos, el esmalte irregular alrededor de las fosas, podría tener la función de resistir las fuerzas de la masticación.

**e-** Mientras que la proporción similar de fisuras podría estar asociado a una falta de fusión entre los lóbulos embrionarios.

**f-** Si bien hubo un paso mínimo de colorante, no lo descartamos como un riesgo, aunque éste sea menor, porque los defectos hallados ponen en comunicación al medio bucal con la permeabilidad dentinal.

## 6 AGRADECIMIENTOS

**a-** A los pacientes quienes con su donación facilitaron este trabajo.

**b-** A Ramiro Beltrandi, Odontólogo del Servicio Odontológico Público Provincial, por su colaboración en la extracción y entrega de PM.

**c-** A Marcela Zaffaroni, Odontóloga, Auxiliar Docente de la cátedra de Biología del IUNIR. Como integrante de nuestro equipo, tuvo a su cargo la obtención de los PM donados por profesionales de consultorios privados. Además, es autora de las fotos histológicas que presentamos.

## 7 COMITÉ DE ETICA

No fue necesaria la intervención del Tribunal de Ética del IUNIR, porque las piezas fueron donadas después de su extracción y todas fueron provenientes de extracciones indicadas por Especialistas de Ortodoncia.

## 8 CONFLICTOS DE INTERES

No existe ningún motivo para ocasionarlos.

## REFERENCIAS

Al-Dajani M, Limeback H. (2012). Emerging science in the dietary control and prevention of dental caries. *J. Calif. Dent. Assoc.* 40(10):799-804.

Aprile H, Figun M, Garino R. (1967). *Anatomía odontológica orocervicofacial*. Edit. El Ateneo, 4ª edición.

Beauchamp J, Caulfield PW, Crall JJ, et al. (2008). Evidence-based clinical recommendations for the use of pit and fissure sealants. *J. Am. Dent. Assoc.* 139:257-67.

Campos A, Rodriguez I.A., Sanchez-Quevedo M.C., et al. (2000). Mineralization of human premolar occlusal fissures. A quantitative histochemical microanalysis. *Histol. Histopathol.* 15: 499-502. 001:10.14670/HH-15.499. <http://www.hh.um.es>

Cury J, Francisco S, Del Bel Cury A, et al. (2001). In situ study of sucrose exposure, Mutans Streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz Dent. J.* 12: 101-104.

Figún M, Garino R. (2008). *Anatomía Odontológica funcional y aplicada*. Edit. El Ateneo, 2ª edición. ISBN 978-950-02-0125-9.

Galil, Khadry A. (1973). Study Of Pits And Fissures On Occlusal Surfaces Of Human Teeth. Digitized Theses. <https://ir.lib.uwo.ca/digitizedtheses/691>

García Barbero J. (1997). *Patología y Terapéutica Dental*. Edit. Síntesis. 1ª edición.

Gomez de Ferraris ME, Campos Muñoz (2009). *A Histología, Embriología e Ingeniería tisular bucodental*. Edit. Panamericana, 3ª edición.

Gustaffson B, Quensel C, Lauke L. (1954). The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odont. Scand.* 11: 232-64.

Hirata Y, Kubota K, Kuroha K, et al. (2003). State of toothbrushing habits and use of fluoride dentifrice of children and guardians in a City enforced Dental Health Program. *Bull. Kanagawa Dent Coll.* 31:107-116.

Kohli A, Poletto L, Pezzotto S. (2007). Hábitos alimentarios y experiencia de caries en adultos jóvenes en Rosario, Argentina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(4):381-86.

Kohli A, Poletto L, Pezzotto S. (2011). Factores de riesgo de extracciones dentarias en Rosario, Argentina. Edit. Académica Española (eae). 1ª edición. ISBN 978-3-8465-7197-2.

Krasse B. (2001). The Vipeholm Dental Caries Study: Recollections and Reflections 50 Years Later. *J. Dent. Res.* 80 (1): 1785-88.

Lalic M., Aleksic E., Gajic M, Malesevic D. (2013). Oral health related knowledge and behavior of parents and school children. *Med. Pregl.* 66 (1-2): 70-79.

Nikiforuk G. (1991). *Understanding Dental Caries: Etiology and mechanisms, basic and clinical aspects*. Edit. Karger. 1ª edición. 2 (3): 61-81

Sonbul H, Merdad K, Birkhed D. (2011). The effects of modified fluoride toothpaste technique on buccal enamel caries in adults with high caries prevalence: a 2-year clinical trial. *Community Dental Health.* 28 (4): 292-296.

Sullivan H, Harris R. (1958). The biology of the children of Hopewood House, Bowral N: II. Observations extending over five years (1952–1956). *Australian Dental journal*. 3 (5): 311-17.

Yuca G, Akihito T, Osamu S. (1998). The effects of fluorides in the prevention of caries in adults. *Dent. Japan*. 34:84-86.

# CAPÍTULO 4

## EFFECT OF *Zinnia peruviana* ROOT EXTRACT ON THE PRODUCTION OF MICROBIAL BIOFILMS<sup>1</sup>

Data de submissão: 09/09/2021

Data de aceite: 28/09/2021

### Ana Mariel Mohamed

Universidad Nacional de San Luis  
CONICET

Área de Microbiología e Inmunología  
San Luis, Argentina

Enlace a CV: <https://bit.ly/3zQulKS>

### Diego Alberto Cifuentes

Universidad Nacional de San Luis  
CONICET

Área de Química Orgánica  
San Luis, Argentina

Enlace a CV: <https://bit.ly/3l6CsJl>

### Sara Elena Satorres

Universidad Nacional de San Luis  
Área de Microbiología e Inmunología  
San Luis, Argentina

Enlace a CV: <https://bit.ly/3to07M0>

### Claudia Maricel Mattana

Universidad Nacional de San Luis  
Área de Microbiología e Inmunología  
San Luis, Argentina

Enlace a CV: <https://bit.ly/3ndqAln>

**ABSTRACT:** The increase of antimicrobial resistance is a growing global public health. One mechanism by which microorganisms acquire resistance to antibiotics is the biofilms. Approximately 80% of chronic and recurrent microbial infections are due to this resistance strategy produced by a diverse group of microorganisms. This context has motivated the search for new antimicrobial substances with anti-biofilm activity. The extensive and varied flora of the Central West Region of Argentina offers an important resource for the study of natural products in the search for antimicrobials with potential therapeutic use in clinical infections. Within these species, *Zinnia peruviana* (L.), is an herb with proven antimicrobial properties in its aerial part. The objective of this work was to evaluate the effect of the addition of acetonic extract from the roots of *Z. peruviana* at different concentrations on the biofilm production of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *C. albicans*. Biofilm production was evaluated by determining adherence to 96-well microplates U-bottom. The tested extract inhibited 29% and 50% of the biofilm production of *L. monocytogenes* with 0.625 mg ml<sup>-1</sup> and 5 mg ml<sup>-1</sup> respectively. For *E. coli* the reduction was 33% (0.625 mg ml<sup>-1</sup>) and 51% (0.078 mg ml<sup>-1</sup>) while for *C. albicans* a significant reduction in biofilm formation was observed with 3 concentrations of extract: 59% (5 mg ml<sup>-1</sup>), 42% (0.625 mg ml<sup>-1</sup>) and 44% (0.078 mg ml<sup>-1</sup>). All the biofilm reduction values showed significant differences ( $p < 0.05$ ). The

<sup>1</sup> Trabajo presentado anteriormente como Abstract en BIOCELL, 45(3):62, 2021. ISSN 0327- 9545 / ISSN 1667-5746 (versión en línea). Este estudio fue financiado por Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis (PROICO 02-0218 y 02-2516). Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

high biological activity of the roots of *Z. peruviana* represents an alternative potential for the treatment and control of microbial infections. Further studies on toxicity and bioapplicability are needed.

**KEYWORDS:** *Zinnia peruviana*. Acetonic root extract. Microbial biofilms.

## EFEECTO DE EXTRACTO DE RAÍZ DE *Zinnia peruviana* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS MICROBIANAS

**RESUMEN:** El aumento de la resistencia a los antimicrobianos constituye una creciente preocupación de la salud pública mundial. Un mecanismo por el cual los microorganismos adquieren resistencia a los antibióticos es la formación de biopelículas. Aproximadamente el 80% de las infecciones microbianas crónicas y recurrentes se deben a esta estrategia de resistencia producida por un grupo diverso de microorganismos. Este contexto ha motivado la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas con actividad anti-biofilm. La extensa y variada flora de la Región Centro-Oeste de Argentina ofrece un importante recurso para el estudio de productos naturales en la búsqueda de antimicrobianos con potencial uso terapéutico en infecciones clínicas. Dentro de estas especies, *Zinnia peruviana* (L.), es una hierba con propiedades antimicrobianas demostradas en su parte aérea. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de extracto acetónico de raíces de *Z. peruviana* a distintas concentraciones sobre la producción de biofilm de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *C. albicans*. La producción de biofilm se evaluó por determinación de la adherencia a microplacas de 96 pocillos fondo en U. El extracto ensayado inhibió el 29% y 50% de la producción del biofilm de *L. monocytogenes* con 0,625 mg ml<sup>-1</sup> y 5 mg ml<sup>-1</sup> respectivamente. Para *E. coli* la reducción fue de 33 % (0,625 mg ml<sup>-1</sup>) y 51% (0,078 mg ml<sup>-1</sup>) mientras que para *C. albicans* se observó una significativa reducción en la formación de biofilm con 3 concentraciones de extracto: 59 % (5 mg ml<sup>-1</sup>), 42 % (0,625 mg ml<sup>-1</sup>) y 44 % (0,078 mg ml<sup>-1</sup>). Todos los valores de reducción de la producción del biofilm presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). La elevada actividad biológica de las raíces de *Z. peruviana* representa un potencial alternativo y alentador para el tratamiento y control de infecciones microbianas. Se necesitan más estudios sobre toxicidad y bioaplicación.

**PALABRAS CLAVE:** *Zinnia peruviana*. Extracto acetónico de raíz. Biopelículas microbianas.

### 1 INTRODUCTION

Worldwide, antibiotics are used to treat infections in humans and animals. In addition to therapeutic use, antibiotics are commonly added to animal feed in small amounts as prophylaxis and for growth promotion purposes, promoting a steady increase in antimicrobial resistance of microbes and a decrease in the ability of available antimicrobials to treat common infections. Antimicrobial resistance (AMR) represents a health threat and an emerging risk to the global population of entering a post-antibiotic era in which existing antibiotics are gradually rendered ineffective due to resistance. This increased resistance is mainly associated with the overuse and misuse of antibiotics, the appearance of



resistant strains and the slowdown in the discovery of antimicrobial drugs (Lofa *et al.*, 2019; Asmerom *et al.*, 2020). One important mechanism whereby microorganisms acquire resistance to antibiotics and evade the immune system is by forming biofilms. Microbial biofilms are communities of bacteria, embedded in a self-producing matrix, forming on living and nonliving solid surfaces (Vasudevan, 2014). Biofilm-associated cells have the ability to adhere irreversibly on a wide variety of surfaces, including living tissues and indwelling medical devices as catheters, valves, prosthesis, and so forth (Parsek and Singh, 2003). They are considered an important virulence factor that causes persistent chronic and recurrent infections; they are highly resistant to antibiotics and host immune defenses (Grant and Hung, 2013).

Bacteria protected within biofilm exopolysaccharides are up to 1,000 times more resistant to antibiotics than free-floating (planktonic cells) (Sharma *et al.*, 2019), which generates serious consequences for therapy and severely complicates treatment options (Sun *et al.*, 2013). Biofilm resistance is due to several reasons, like restricted diffusion of antibiotics into biofilm matrix, expression of multidrug efflux pumps, type IV secretion systems, decreased permeability, and the action of antibiotic-modifying enzymes (Alekhshun and Levy, 2007). The increased biofilm resistance to conventional treatments enhances the need to develop new control strategies (Simoes *et al.*, 2007). Biofilm inhibition is considered a major drug target for the treatment of various bacterial and fungal infections, and pharmacological development of these drugs is now extensively studied (Namasivayam *et al.*, 2013).

The microorganisms producing biofilm comprise a diverse group of organisms, including both Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as fungal species. Gram-positive specie involved in infections associated with the formation of biofilm is *Listeria monocytogenes* that produces listeriosis due to food contamination and coinfections with other bacterial species. Among Gram-negative infections, *Escherichia coli* is responsible for hemolytic uremic syndrome, acute diarrhea, and urinary tract infections. *Candida* species have emerged as a significant cause of morbidity and mortality and account for approximately 72% of all nosocomial fungal infections. *C. albicans* is a very common opportunistic pathogen producing oral, vaginal and or systemic candidiasis. Furthermore, biofilm formation by *Candida* has been documented on a variety of medical devices such as catheters, dialysis and joint devices. While fungal implant infections are less common than bacterial infections, they tend to be more serious or troublesome. Antifungal drugs, mainly polyenes and azoles, are commonly used to treat *Candida* infections. However, efficacy of these drugs is limited in many cases due

to development of resistance, poor penetration power in biofilm and undesirable side effects (Jafri and Ahmad 2019; Ahmad *et al.*, 2020). Given the alarming incidence of antimicrobial resistance in microorganisms of clinical importance, there is a continuing need for new and effective therapeutic agents. This context has led to the investigation of new antimicrobial substances from plant species popularly used in folk medicine. Therefore, the study of new agents of natural origin with antimicrobial and antibiofilm activity constitutes an important clinical challenge.

The field of natural products of plant origin currently links two axes of study. From a structural point of view, natural products pose significant challenges for the application of strategies that allow their isolation, purification and structural elucidation. However, the axis of greatest importance is undoubtedly their bioapplicability, since the bioactivity reported in the literature for many secondary or chemically derived metabolites makes them potentially interesting in the search and development of molecular models in the design of new drugs. In this framework, the extensive and varied flora of the Central-West Region of Argentina is an important source of renewable resources in the study of natural products and their applications in the search for antimicrobials with potential therapeutic use in clinical infections. *Zinnia* genus contains annual and perennial plants belonging to the family Asteraceae and comprises about 20 species native to South America (Goma *et al.*, 2019). *Zinnia peruviana* (L.) L., commonly known as “Chinita del Campo”, is a native plant that grows in the center and north of Argentina (Del Vitto *et al.*, 1997). The aerial parts of this species present diverse ethnopharmacological uses and have been evaluated for different biological properties (Barboza *et al.*, 2009; Satorres *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2017).

On the other hand, the genus *Zinnia* has shown the presence of a diversity of secondary metabolites of different classes (Bastos *et al.* 2020). Among them, the sesquiterpene lactones are one of the main constituents that have been isolated and they are responsible of various biological activities such as anticancer, anti-inflammatory and immunomodulatory effects, anti-ulcer, antifungal and antiviral activities (Lent *et al.*, 1977; Subramaniam *et al.*, 2014).

Previous works of our research group (Mattana *et al.*, 2016; Satorres *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2017; Mohamed *et al.*, 2018) motivate the progress and deepening of the study of this promising plant as a possible source of new antimicrobial agents with direct application in clinical microbiology and, as part of our studies of antimicrobial herbal constituents, was studied the *in vitro* the inhibitory effect of *Z. peruviana* roots against biofilm of *L. monocytogenes*, *E. coli* y *C. albicans*.

## 2 MATERIALS AND METHODS

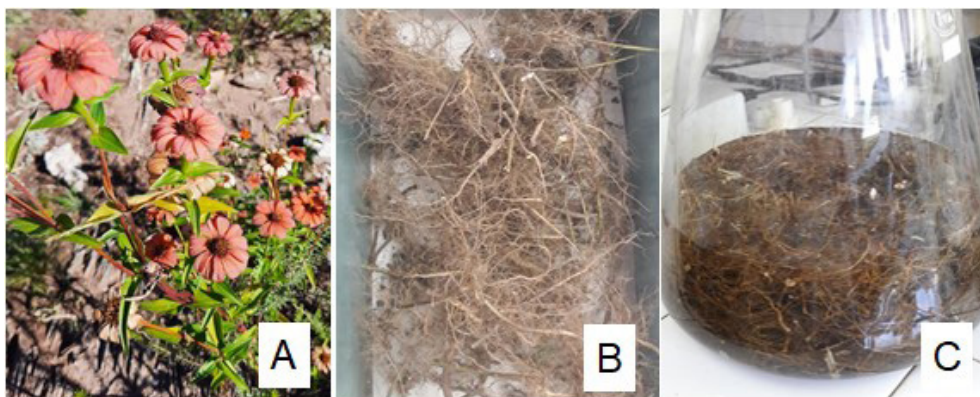
### 2.1 PLANT MATERIAL

*Zinnia peruviana* (L.) L. were collected in El Trapiche and La Florida, San Luis, Argentina (latitude: 33° 7' 0" S; longitude: 65° 5' 0" W), in March 2018/February 2019. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the National University of San Luis (L.A. del Vitto N° 8841).

### 2.2 PREPARATION OF ACETONIC EXTRACT

*Z. peruviana* roots collected were air-dried and ground in knife mills to fine grain size. Powdered air-dried material of *Z. peruviana* (200 g) was macerated in 500 ml of acetone at room temperature for one week (Figure 1). The crude acetonetic extract was filtered through Whatman filter paper N° 1, and the filtrates were concentrated under reduced pressure at 40 °C. The extract was dried, weighed (3.1 g) and stored at 4 °C in storage vials for preliminary antimicrobial screening.

Figure 1. **A:** *Zinnia peruviana* plant. **B:** *Z. peruviana* roots collected. **C:** Maceration of *Z. peruviana* roots in acetone.



Photos: own authorship.

### 2.3 MICROBIAL STRAINS

The microorganisms tested included *Listeria monocytogenes* CLIP 74904, *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Candida albicans* ATCC 36801.

### 2.4 ANTIBIOFILM ACTIVITY. INHIBITION OF THE BIOFILM FORMATION

The potential of the acetonetic extracts from *Z. peruviana* roots to prevent initial cell attachment was investigated through the biofilm inhibition assay on microplate U-bottoms

(Microplate method). In brief, 50 µl of culture medium (supplemented with 1% glucose), 50 µl of bacterial inoculum ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) and 100 µl of extract at different concentrations were added to each well and incubated at 37 °C for 48 h. Three concentrations were tested: 5 mg ml<sup>-1</sup> (C1), 0.625 mg ml<sup>-1</sup> (C2) and 0.078 mg ml<sup>-1</sup> (C3). The culture was discarded and the adhered content (sessile cells) was washed with sterile physiological solution, fixed with methanol and stained with crystal violet. The optical density reading was performed at 550 nm in ELISA reader (Microplate Reader Benchmark, BIO-RAD). The experiment was carried out in quadruplicate and was repeated 2 times.

Percentages of inhibition for each sample were determined by comparing the mean optical density (OD) of control wells (without extracts added) with the bacterial suspension (with the addition of extracts). Thus the percentage of biofilm inhibition was determined by the formula:

$$\text{Biofilm reduction \%} = \frac{\text{OD control} - \text{OD sample}}{\text{OD control}} \times 100\%$$

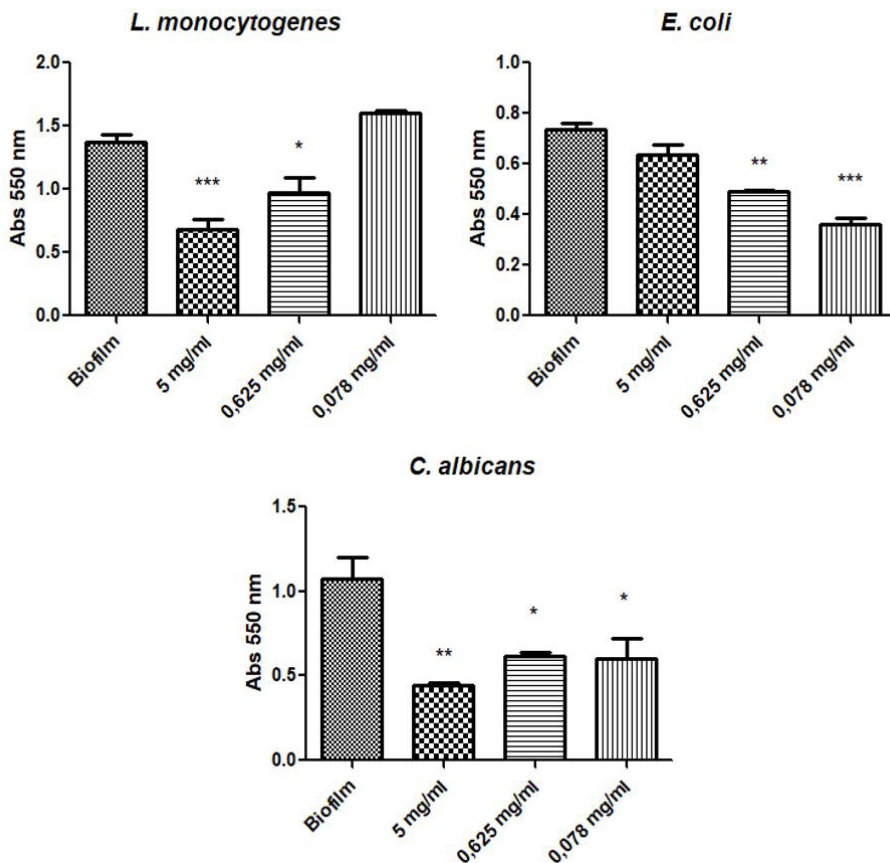
## 2.5 STATISTICAL ANALYSIS

GraphPad Prism 5 program, One-way analysis of variance (ANOVA), Bonferroni test were used to analyze the result and p values less than 0.05 were considered statistically significant. All experimental data were derived from at least 2 independent experiments.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

There is recently an increased interest in using green antimicrobials as an alternative to prevent and destroy biofilms, such as plant extracts and phytochemicals. Natural products derived from *Z. peruviana* present biological activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts. This study assessed the ability of acetic extract obtained from the roots of *Z. peruviana* to prevent further formation of biofilms at 48 h. This extract showed significant inhibition of the biofilm production *L. monocytogenes*, *E. coli* and *C. albicans* ( $p < 0.05$ ) (Figure 2).

Figure 2. Reduction of biofilm production with the addition of *Zinnia peruviana* root extract at three concentrations. \* $p < 0.05$  compared with control. \*\* $p < 0.01$  compared with control. \*\*\* $p < 0.001$  compared with control (biofilm). Each value represents means  $\pm$  SD.



The acetonetic extract inhibited 29% and 50% of the biofilm production of *L. monocytogenes* with 0.625 mg ml<sup>-1</sup> and 5 mg ml<sup>-1</sup> respectively, following a dose-dependent effect. Concentrations lower than 0.625 mg ml<sup>-1</sup> did not show antibiofilm effect for this bacterium. Against *E. coli*, the reduction in biofilm production was 33% (0.625 mg ml<sup>-1</sup>) and 51% (0.078 mg ml<sup>-1</sup>) however, the reduction was not dose-dependent. In contrast, *C. albicans* reduced biofilm production with the three concentrations tested with dose-dependent effect with values of 59% (5 mg ml<sup>-1</sup>) and 44% (0.625 mg ml<sup>-1</sup> and 0.078 mg ml<sup>-1</sup>).

The secondary metabolites of plants present a wide chemical diversity and important pharmaceutical properties. Among them, several classes of phytochemicals have been shown to present antimicrobial properties, either when used alone or together with other antimicrobials products, against clinically important pathogens, interfering

with some of the main factors involved in biofilm development, such as motility, adhesion, intercellular aggregation, and communication (Sakarikou *et al.* 2019). In this case, regarding the antibiofilm activity of the *Zinnia* root extract, the ziniolide compound identified as the major secondary metabolite, would be responsible for this activity by a mechanism that has not yet been elucidated.

It is generally more difficult to eradicate pre-existing biofilms by the extracts. Some reports have also noted that it is less difficult to inhibit cell attachment than to get rid of established biofilm (Cerca *et al.*, 2005; Sandasi *et al.*, 2011). We have carried out studies of the antibiofilm activity of *Zinnia* root extract on the already formed biofilm (data not shown in this work) with less active results to eradicate the biofilm. This confirms that pathogens are able to resist the action of antimicrobials more when they exist in biofilms and their infections are able to persist on different biotic and abiotic surfaces (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Factors which cause resistance in biofilms include presence of an extracellular polymeric matrix which causes strong attachment of microbes to surfaces and low antibiotic penetration or increased activity of efflux pumps which expel antimicrobial agents from cells (Jamal *et al.*, 2018) and too interfering with intercellular communication strategies (quorum sensing) of the bacteria, thereby reducing biofilm formation (Merghni *et al.*, 2018). The plant extracts may have interfered with any of these factors. Specifically, the excellent ability of the plant extracts to interfere with the initial stage of biofilms formation may be attributed to interference with forces, such as Brownian, sedimentation, Lifshitz–Van der Waals and electrostatic interaction forces, that favour the deposition and adherence of bacteria to surfaces (Tiwari *et al.*, 2018). Also, since certain organic and inorganic molecules and other nutrients are important for cell growth and hence cell adhesion (Sandasi *et al.*, 2010), it is possible that the plant extracts may inhibit the availability of nutrients.

The strong biological activity of the acetonic extract of the root of *Z. peruviana* demonstrated in this work represents an alternative potential for the treatment of microbial infections. We are conducting other studies to elucidate the antibiofilm action mechanism, as well as cytotoxicity and genotoxicity studies to determine the safety of the acetonic extract of the root of *Z. peruviana*.

## REFERENCES

Ahmad Khan, M. S., Alshehrei, F., Al-Ghamdi, S. B., Bamaga, M. A., Al-Thubiani, A. S. and Alam, M. Z. (2020). Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. **Future Sci OA**, 6, FSO440. doi: 10.2144/fsoa-2019-0027

Alekshun, M. N. and Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, 128 (6), 1037-1050.

Asmerom, D., Hailu, G. S., Yimer, E. M., Bitew, H. and Kahsay, G. (2020). Antimicrobial Evaluation of Latex and TLC Fractions from the Leaves of *Aloe adigratana* Reynolds. **Evid Based Complement Alternat Med**, 1-10. doi:10.1155/2020/8312471

Barboza, G.E., Cantero, J.J., Núñez C., Pacciaroni, A. and Espinar, L.A. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. **Kurtziana**, 34 (1), 1-20.

Bastos Cavalcante, N., da Conceição Santos, A. D. and da Silva Almeida, J.R.G. (2020). The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chem Biol Interact**, 318 (1), 1-18.

Cerca N., Martins S., Oliveira R, Azeredo J. (2005). The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-Mics of antibiotics and subsequent development of a biofilm. **Res Microbiol**, 156 (5–6), 650-655.

De La Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Fernández, L.; Rew, H. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Curr Opin Microbiol**, 16(5),580-589.

Del Vitto, L., Petenatti, V. and Petenatti, E. (1997). Recursos Herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas herbal resources of San Luis (Argentina). First part: native plants. **Multequina**, 6 (1), 49-66.

Grant S.S. and Hung, D. T. (2013). Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. **Virulence**, 4 (4), 273-283.

Gomaa, A.A., Samy, M.N., Desoukey, S.Y. and Kamel, M.S. (2019). A comprehensive review of phytoconstituents and biological activities of genus *Zinnia*. **J Adv Biomed and Pharm Sci**, 2 (1), 29-37.

Jafri, H. and Ahmad, I. (2019). *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J Mycol Med**, 100911. doi:10.1016/j.mycmed.2019.100911

Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Ma, N.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Ma, K. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc**, 81(1),7-11.

Lent, K-H., Ibuka T., Wu, R-Y. and Geiman, T. A. (1977). Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. **PhyChemistry**, 16 (5), 1177-1181.

Lofa, A., Velasco, V., Gerding, M., López, M. D., Vallejos, D., Bonilla, A. M. and Logue, C. M. (2019). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains of swine origin: molecular typing and susceptibility to oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] extract. **J Appl Microbiol**. doi:10.1111/jam.14393

Mattana, C.M., Cangiano, M.A., Satorres, S.E., Alcaráz, L.E. and Laciari, A.L. (2016). Potential genotoxicity of *Zinnia peruviana* extract. **PhOL**, 30 (2), 72-80.

Merghni, A., Noumi, E., Hadded, O., Dridi, N., Panwar, H., Ceylan, O., Mastouri, M., Snoussi, M. (2018). Assessment of the Antibiofilm and Antiquorum sensing activities of Eucalyptus Globulus essential oil and its Main component 1, 8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microb Pathog**, 118,74-80.



- Mohamed, A.M., Salinas, A., Mattana, C., Satorres, S., Ortega, C., Favier, L. and Cifuentes, D.A. (2017). Improving in the antibacterial activity and the antioxidant properties of chemically modified extracts of *Zinnia peruviana*. **PhOL**, 2 (1), 162-168.
- Mohamed, A.M., Cifuentes, D. and Mattana, C. (2018). Anti-*Listeria* activity of natural products single and mixed obtained from native plants of Argentina. **PhOL**, 3, 150-160.
- Namasivayam, S. K. R., Beninton, B., Christo, B., Karthigai, S. M., Arun Muthu Kumar, K., and Deepak, K. (2013). Anti-biofilm effect of biogenic silver nanoparticles coated medical devices against biofilm of clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **Globl J Med Res**, 13 (3), 1-7.
- Parsek, M.R. and Singh, P.K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, 57, 677-701.
- Sakarikou, C., Kostoglou, D., Simões, M. and Giaouris, E. (2019). Exploitation of plant extracts and phytochemicals against resistant *Salmonella* spp. in biofilms. **Food Res Int**, 128, 108806. doi:10.1016/j.foodres.2019.108806.
- Sandasi, M.; Leonard, C.; Viljoen, A. (2010). The in vitro Antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. **Lett Appl Microbiol**, 50(1):30-35.
- Sandasi M, Leonard C, Van Vuuren S, Viljoen A. (2011). Peppermint (*Mentha Piperita*) inhibits microbial biofilms *In Vitro*. **S Afr J Bot**, 77(1),80-85.
- Satorres, S.E., Chiaramello, A.I., Tonn, C.E. and Laciari, A.L. (2012). Antibacterial activity of organic extracts from *Zinnia peruviana* (L.) against gram-positive and gram-negative bacteria. **Emir J Food Agric**, 24 (4), 344-347.
- Sharma, D., Misba, L. and Khan, A. U. (2019) Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrob Resist Infect Control**, 8 (1). doi:10.1186/s13756-019-0533-3.
- Simoies, L. C., Simoes, M., and Vieira, M. J. (2007). Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. **Appl Environ Microbiol**, 73 (19), 6192-6200.
- Subramaniam, S., Keerthiraja, M. and Sivasubramanian, A. (2014). Synergistic antibacterial action of  $\beta$ -sitosterol-d-glucopyranoside isolated from *Desmostachya bipinnata* leaves with antibiotics against common human pathogens. **Rev Bras Farma**, 24 (1), 44-50. doi:10.1590/0102-695x20142413348.
- Sun, F., Qu, F, Ling, Y. (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, 8 (7), 877-886.
- Tiwari, M.; Donelli, G.; Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action au - Roy, Ranita. **Virulence**, 9 (1), 522-554.
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. **J Microbiol Exp**, 1(3), 84-98.

# CAPÍTULO 5

## EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE TETRATIOMOLIBDATO DE AMONIO EN LA ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL<sup>1</sup>

Data de submissão: 30/09/2021

Data de aceite: 15/10/2021

**Marilina Casais**

Laboratorio de Biología de la Reproducción  
(LaBiR)  
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional de San Luis (UNSL)  
Instituto Multidisciplinario de Investigaciones  
Biológicas de San Luis (IMIBIO-SL)  
CONICET  
San Luis, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0003-4334-5845>

**Rocío Ayelem Conforti**

Laboratorio de Biología de la Reproducción  
(LaBiR)  
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional de San Luis (UNSL)  
Instituto Multidisciplinario de Investigaciones  
Biológicas de San Luis (IMIBIO-SL)  
CONICET  
San Luis, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-3434-2178>

**María Belén Delsouc**

Laboratorio de Biología de la Reproducción  
(LaBiR)  
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional de San Luis (UNSL)  
Instituto Multidisciplinario de Investigaciones  
Biológicas de San Luis (IMIBIO-SL)  
CONICET  
San Luis, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-2556-1205>

**RESUMEN:** La endometriosis (EDT) se define como el crecimiento de tejido tipo endometrial fuera de la cavidad uterina. Se trata de una enfermedad crónica, estrógeno dependiente, que afecta al 5-15% de las mujeres en edad reproductiva. Esta patología aún no tiene cura y los tratamientos actuales suelen presentar efectos secundarios indeseados. Recientemente, nuestro grupo de investigación informó correlación positiva entre los niveles de cobre (Cu) en fluido peritoneal (FP) y el volumen de las lesiones inducidas en ratones. También existen reportes de otros autores sobre niveles elevados de Cu en muestras de pacientes con EDT. En muchos cánceres, la desregulación en la homeostasis de Cu promueve la progresión tumoral. Por consiguiente, nuestro objetivo fue evaluar el impacto de tetratiomolibdato de amonio (TM, quelante de Cu) en la progresión de la EDT experimental. Veintiún ratones hembra C57BL/6 se dividieron en tres grupos:

<sup>1</sup> Este trabajo fue presentado en la IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Un resumen del mismo fue publicado en Revista Biocell 2021; 45(3). ISSN 1667-5746.

Sham (cirugía placebo), EDT y EDT+TM. La inducción de la EDT se realizó mediante transferencia autóloga de tejido uterino al mesenterio intestinal. El grupo EDT+TM recibió 0,70 mg de TM/día/ratón en el agua de bebida durante tres semanas, comenzando el día 8 postoperatorio. Luego de un mes de inducida la patología, los ratones fueron sacrificados. Las lesiones fueron identificadas, contadas, medidas con calibre y pesadas. También se recolectó FP para la determinación de estradiol por quimioluminiscencia. El tratamiento con TM redujo el peso y volumen de las lesiones establecidas en ratones, en comparación con el grupo EDT ( $p < 0,05$ ). Además, el quelante de Cu disminuyó la concentración de estradiol, logrando un nivel similar al dosado en el grupo Sham ( $p < 0,05$ ). Esta hormona mostró correlación positiva con el volumen de los implantes ( $r = 0,5644$ ,  $p < 0,05$ ). En conclusión, nuestro trabajo muestra resultados prometedores para continuar con el estudio del TM como posible terapia para la EDT.

**PALABRAS CLAVE:** Endometriosis. estradiol. Cobre. Tetratiomolibdato de amonio.

## EVALUATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF AMMONIUM TETRATHIOMOLYBDATE IN EXPERIMENTAL ENDOMETRIOSIS

**ABSTRACT:** Endometriosis (EDT) is defined as the growth of endometrial-like tissue outside the uterine cavity. It is a chronic, estrogen-dependent disease that affects 5-15% of women of reproductive age. This pathology still has no cure, and current treatments often have unwanted side effects. Recently, our research group reported a positive correlation between copper (Cu) levels in peritoneal fluid (PF) and the volume of induced lesions in mice. There are also reports by other authors on elevated Cu in samples from patients with EDT. In many cancers, dysregulation in Cu homeostasis promotes tumor progression. Therefore, our aim was to evaluate the impact of ammonium tetrathiomolybdate (TM, Cu chelator) on the progression of experimental EDT. Twenty-one female C57BL/6 mice were divided into three groups: Sham (placebo surgery), EDT, and EDT+TM. The EDT induction was performed by autologous transfer of uterine tissue to the intestinal mesentery. The EDT+TM group received 0.70 mg of TM/day/mouse in the drinking water for three weeks, starting on postoperative day 8. After one month of induction of the pathology, the mice were sacrificed. The lesions were identified, counted, measured with calipers, and weighed. PF was also collected for the determination of estradiol by chemiluminescence. Treatment with TM reduced the weight and volume of established lesions in mice compared to the EDT group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the Cu chelator decreased the estradiol concentration, reaching a level similar to those of the Sham group ( $p < 0.05$ ). This hormone showed a positive correlation with the volume of the implants ( $r = 0.5644$ ,  $p < 0.05$ ). In conclusion, our work shows promising results to continue with the study of TM as a possible therapy for EDT.

**KEYWORDS:** Endometriosis. Estradiol. Copper. Ammonium tetrathiomolybdate.

### 1 INTRODUCCIÓN

La endometriosis (EDT) se define clásicamente como una enfermedad ginecológica crónica y progresiva, caracterizada por el establecimiento y crecimiento de tejido tipo endometrial (glandular y estromal) fuera de la cavidad uterina. Estos implantes

endometriósicos responden a hormonas sexuales y originan microsangrados que producen un foco inflamatorio constante. En consecuencia, la EDT es la causa más común de dolor pélvico crónico. También se han descrito otros síntomas como dismenorrea, dispareunia, disuria y subfertilidad, lo que repercute negativamente en la calidad de vida de las pacientes (Bulun y cols., 2019). Dado que afecta el metabolismo en el hígado y el tejido adiposo, conduce a inflamación generalizada y altera la expresión de genes en el cerebro causando sensibilización al dolor y trastornos del estado de ánimo, ahora se la considera una enfermedad sistémica en lugar de una enfermedad exclusiva de la zona pélvica (Taylor y cols., 2021).

La EDT afecta al 5-15% de las mujeres en edad reproductiva en todo el mundo y aún no existe una cura. Las estrategias de tratamiento se limitan a la resección quirúrgica de las lesiones o a la supresión de la función ovárica y la acción del estradiol. Sin embargo, los síntomas reaparecen en el 20-40% de los casos después de la cirugía, y la supresión ovárica a largo plazo suele ser ineficaz, suprime la fertilidad y un estado hipoestrogénico tiene efectos secundarios no deseados. Existe, por lo tanto, una necesidad clínica insatisfecha de nuevos tratamientos, principalmente no hormonales, que permitan controlar los procesos que favorecen la progresión de la EDT (McKinnon y cols., 2016; Rogers y cols., 2017).

Los desequilibrios en la homeostasis de elementos traza parecen desempeñar un papel importante en la progresión de la EDT (Turgut y cols., 2013; Pollack y cols., 2013; Rzymiski y cols., 2015). Nuestro grupo de investigación demostró que los niveles de cobre (Cu) en el fluido peritoneal (FP) se correlacionan positivamente con el volumen de las lesiones tipo endometriósicas inducidas en ratón (Delsouc y cols., 2019). También existen reportes de niveles elevados de Cu en muestras de suero y orina de pacientes con EDT (Turgut y cols., 2013; Pollack y cols., 2013). Cu ha sido asociado particularmente con el estrés oxidativo en esta patología. Sin embargo, en otras patologías proliferativas, se ha demostrado que la desregulación de la homeostasis de Cu está implicada en múltiples aspectos de la progresión tumoral, incluida la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis (Denoyer y cols., 2015; Lelièvre y cols., 2020). Además, puede potenciar la acción estrogénica, favoreciendo la proliferación de células tumorales dependientes de estradiol (Darbre, 2006). Por consiguiente, una modalidad terapéutica que permita reducir los niveles de Cu en EDT resulta un enfoque novedoso para el tratamiento médico de la afección.

El tetratiomolibdato de amonio (TM;  $[\text{NH}_4]_2\text{MoS}_4$ ) es un quelante de Cu de rápida acción y buen perfil de seguridad, que se está investigando como estrategia contra el cáncer debido a sus propiedades antiangiogénicas y antiproliferativas (Brewer y cols.,

2000; Pan y cols., 2002; Cox y cols., 2003; Redman y cols., 2003; Chan y cols., 2017; Xu y cols., 2018). Lo distingue de otros quelantes de Cu su mecanismo de acción dual: por una parte, TM interfiere en la absorción de Cu a nivel gastrointestinal y, por otra parte, forma un complejo tripartito estable con la albúmina sérica y el Cu libre en el torrente sanguíneo, reduciendo la carga de Cu en el paciente.

Hasta ahora, ningún trabajo previo ha analizado los efectos de TM sobre la EDT teniendo en cuenta que, al igual que el cáncer, esta patología se caracteriza por la invasión celular y el crecimiento sin restricciones, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y la disminución del número de células apoptóticas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de TM en la progresión de la EDT experimental.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de dos meses de edad, con un peso de 19-21 g. Las colonias de cría se establecieron en el Bioterio de la Universidad Nacional de San Luis (San Luis, Argentina) bajo rigurosas condiciones de luz (12 h de luz, 12 h de oscuridad), temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), con la administración de agua estéril y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la *Guide for the care and use of laboratory animals of the National Institutes of Health*. El estudio en animales fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad Nacional de San Luis (Protocolo N° B-304/19).

### 2.1 INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE LA ENDOMETRIOSIS PERITONEAL EN RATONES

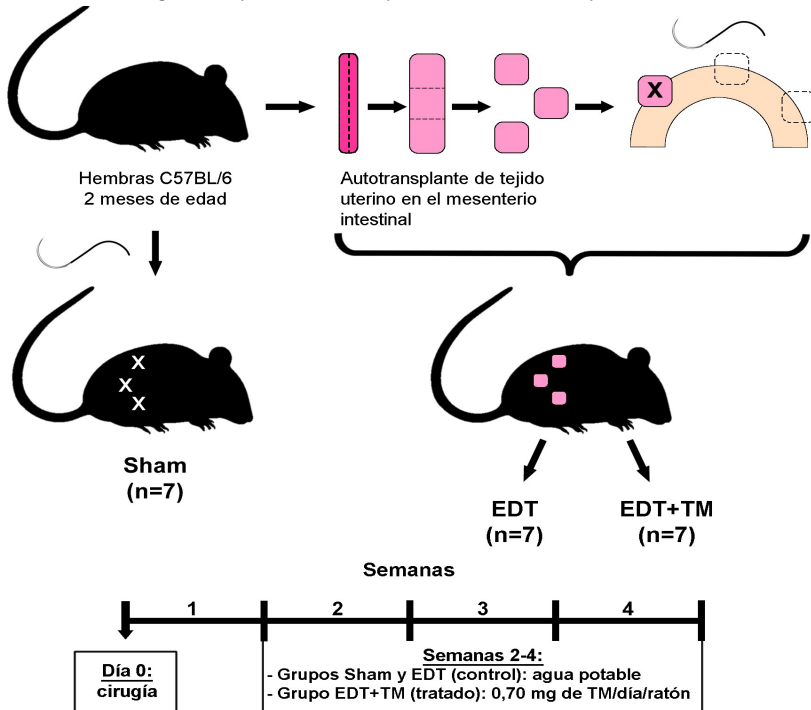
Veintiún ratones hembra se dividieron aleatoriamente en tres grupos: 1) Sham (cirugía placebo), 2) EDT (ratones con EDT inducida) y 3) EDT+TM (ratones con EDT inducida, tratados con TM). Primero, los animales fueron anestesiados con 100 mg/kg de ketamina (Holliday Scott, Buenos Aires, Argentina) y 10 mg/kg de xilacina (Richmond, Buenos Aires, Argentina) administrados vía intraperitoneal. Posteriormente, se hizo una incisión ventral media y se extrajo el cuerno uterino derecho del animal, el cual se colocó en medio DMEM-F12 (Gibco, Life Sciences, Great Island, NY, EE. UU.). Luego, el cuerno uterino se abrió longitudinalmente y se cortó en tres piezas cuadradas de aproximadamente 4 mm<sup>2</sup> cada una, las cuales se suturaron al mesenterio intestinal con un solo punto (Supralon 6-0, Ethicon, Somerville, Nueva Jersey). En ratones pertenecientes al grupo Sham, se realizaron tres suturas en el mesenterio intestinal sin la adición de tejido (Figura 1). Por último, el área se hidrató con solución fisiológica estéril suplementada con antibiótico-antimicótico y el abdomen de los animales se cerró con el mismo material de sutura y puntos contiguos.

## 2.2 ADMINISTRACIÓN DE TM

Se verificó y registró el consumo diario de agua de cada ratón durante 10 días (Cox y cols., 2003). A partir de esa información, cada animal del grupo EDT+TM recibió TM (catálogo #323446; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU) diariamente en agua potable estéril (dosis óptima: 0,7 mg/día/ratón; Cox y cols., 2003), desde el día 8 postoperatorio hasta el día de la eutanasia. Los animales de los grupos Sham y EDT recibieron sólo agua potable estéril (Figura 1). Para controlar que no ocurriera deficiencia severa de Cu en ratones tratados con TM, semanalmente se verificó que el peso de cada animal no disminuyera más del 10% del valor inicial y que el hematocrito no disminuyera por debajo del 80% de la línea base (Brewer y cols., 2000, Brewer y cols., 2003).

Luego de un mes de inducida la EDT, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, en estadio de diestro. Inmediatamente, se abrió un pequeño orificio medioventral a través del cual 1,5 mL de buffer fosfato salino se inyectó en la cavidad peritoneal de cada animal. El FP se recogió y se centrifugó a 250 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta la determinación de estradiol. Finalmente, se abrió completamente el abdomen para tener acceso a las lesiones tipo endometriósicas presentes en los animales inducidos.

Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental.



Protocolo CICUA-FQByF-UNSL: B-304/19

## 2.3 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS IMPLANTES

Las lesiones fueron identificadas, contadas y medidas con calibre en dos diámetros perpendiculares para el cálculo del volumen, mediante la siguiente ecuación:  $V = (4/3) \pi r_1^2 r_2$  ( $r_1$  y  $r_2$  son los radios y  $r_1 < r_2$ ). Luego, fueron pesadas utilizando una balanza analítica (precisión 0,1 mg).

## 2.4 ENSAYO DE ESTRADIOL

Las muestras de FP se enviaron a un laboratorio clínico para el análisis de rutina de estradiol mediante el método de quimioluminiscencia, usando el instrumento ADVIA Centaur XP system (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Deerfield, IL, USA). Los niveles de estradiol en FP se expresaron en pg/mL.

## 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos se utilizó el software GraphPad Prism. Los valores se presentan como la media  $\pm$  S.E.M de 7 animales por grupo. Las diferencias entre las medias de cada grupo experimental se analizaron utilizando la prueba de *t*-Student o ANOVA I seguido de la Prueba de Tukey, según correspondiera. La relación entre volumen de lesión y estradiol se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

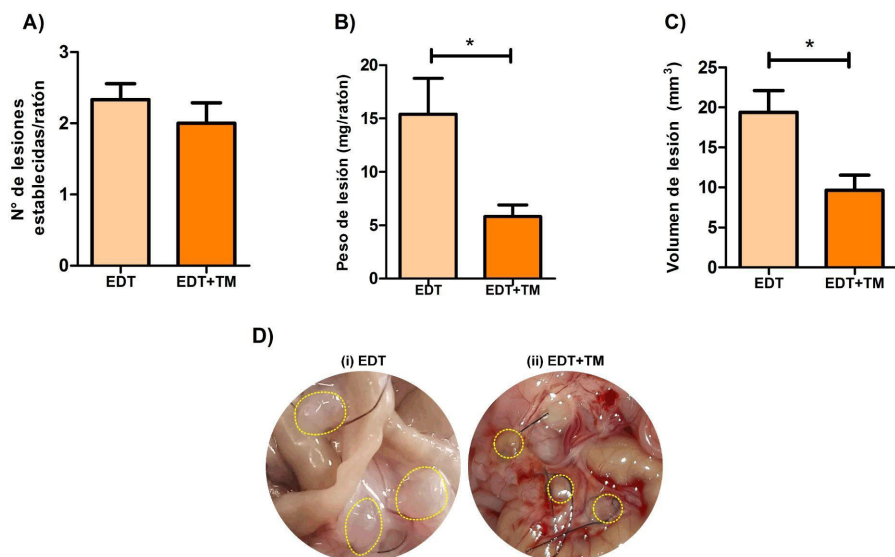
# 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1 EFECTO DEL TM EN EL DESARROLLO DE LESIONES TIPO ENDOMETRIÓICAS

Mediante el examen macroscópico del tejido uterino ectópico, se pudo observar que el tratamiento con TM no afectó el número de lesiones establecidas por ratón (Figura 2A). Sin embargo, la administración de este quelante de Cu disminuyó significativamente el volumen y el peso de las lesiones, en comparación con el grupo no tratado ( $p < 0,05$ ; Figura 2B, C).



Figura 2. Efecto del tratamiento con TM sobre el número de lesiones establecidas por ratón (A), el peso (B) y el volumen (C) de los implantes. En la parte inferior del panel se proporcionan fotografías de las lesiones tipo endometriósicas (delimitadas en amarillo) (D) representativas de los grupos EDT (i) y EDT+TM (ii). \* $p < 0,05$



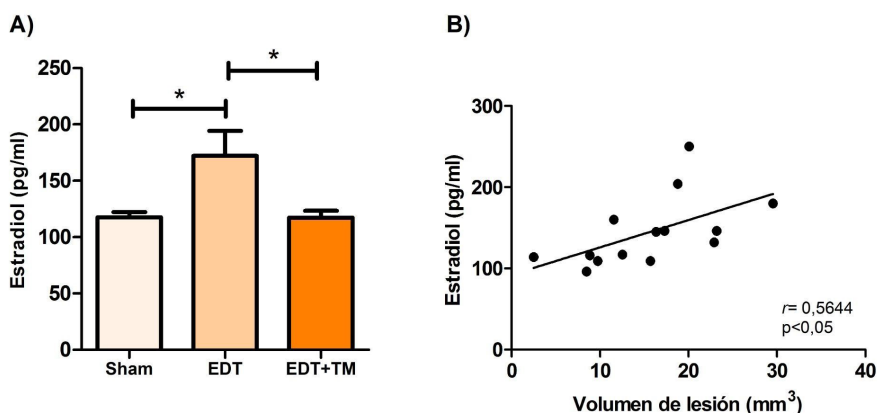
Similar a lo reportado en estudios sobre varios cánceres, TM exhibió efectos antitumorales. Esto puede deberse a que el agente quelante de Cu posee reconocidas propiedades antiangiogénicas y antiproliferativas, ya que Cu es necesario para la unión del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 $\alpha$  a los elementos de respuesta a la hipoxia, modulando así la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y las citocinas angiogénicas (Baldari y cols., 2020). La angiogénesis es fundamental para el crecimiento de los implantes en sitios ectópicos porque asegura los medios necesarios para el suministro adecuado de oxígeno y nutrientes, componentes inmunes, hormonas y la eliminación de productos de desecho. Por lo tanto, se sabe que su inhibición obstaculiza la progresión de la EDT. Además, Cu tiene la capacidad de mediar la activación de diferentes vías de señalización responsables de los procesos celulares básicos, incluida la proliferación, apoptosis, adhesión e invasión (Walter y cols., 2006; Turski y cols., 2012). Este metal también es considerado un metaloestrógeno capaz de potenciar la acción estrogénica (Darbre, 2006) y es esencial para la actividad de la enzima superóxido dismutasa 1 (Cu/Zn-SOD), cuya sobreexpresión se ha considerado importante para la formación de tumores, mientras que su inhibición provoca la apoptosis en las células cancerosas (Eleutherio y cols., 2021). Estos antecedentes dan sustento a nuestros resultados obtenidos por la quelación del metal.

### 3.2 EFECTO DE TM SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL EN FP DE RATONES CON EDT INDUCIDA

El establecimiento de la EDT incrementó la concentración de estradiol en FP, mientras que, luego de la administración del TM, se logró alcanzar valores similares a los del grupo Sham ( $p < 0,05$ ; Figura 3A). Además, se verificó la existencia de correlación positiva entre el volumen de las lesiones tipo endometriósicas y la concentración de estradiol, para todo el grupo de ratones con EDT inducida (coeficiente  $r$  de Pearson: 0,5644,  $p < 0,05$ ;  $n = 14$ ; Figura 3B).

La relación entre las variables no es un detalle menor considerando que la EDT es una enfermedad dependiente de estradiol y que, a su vez, las células epiteliales y estromales endometriósicas son las principales responsables de la secreción local de estradiol en la EDT peritoneal. Ambas células, que sobreexpresan enzimas esteroidogénicas que utilizan dehidroepiandrosterona (DHEA) y colesterol como sustrato (Rižner, 2009), posiblemente se vieron afectadas, considerando la reducción del peso y volumen de las lesiones.

Figura 3. Efecto del tratamiento con TM sobre los niveles de estradiol en FP de animales pertenecientes a los grupos Sham, EDT y EDT+TM (A). \* $p < 0,05$ . La relación entre volumen de lesión y estradiol (B) se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.



Cu también desempeña un papel en la esteroidogénesis. Se ha reportado que en niveles elevados puede estimular la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de estradiol (Soni y cols., 2018; Sun y cols., 2019), mientras que en niveles bajos puede disminuir la DHEA sérica (Klevay & Christopherson, 2000). Además, tanto Cu como estradiol se consideran pro-proliferativos en diversas patologías y se ha demostrado la existencia de correlación positiva entre Cu y el volumen de las lesiones tipo endometriósicas inducidas en ratones (Delsouc y cols., 2019). Por consiguiente, TM podría causar la regresión de

las lesiones tipo endometriósicas a través de los mecanismos descritos que, aunque diferentes, están relacionados entre sí.

## 4 CONCLUSIONES

La capacidad de TM de causar regresión de las lesiones tipo endometriósicas y su buen perfil de seguridad son características atractivas para continuar con el estudio de este agente quelante de Cu como posible tratamiento no hormonal para la EDT.

## 5 AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación continua de la Universidad Nacional de San Luis y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), San Luis, Argentina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldari, S., Di Rocco, G., & Toietta, G. (2020). Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 1069.

Brewer, G. J., Dick, R. D., Grover, D. K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M., Pienta, K., Redman, B. G., Jahan, T., Sondak, V. K., Strawderman, M., LeCarpentier, G., & Merajver, S. D. (2000). Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(1), 1-10.

Brewer, G. J., Ullenbruch, M. R., Dick, R., Olivarez, L., & Phan, S. H. (2003). Tetrathiomolybdate therapy protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 141(3), 210-216.

Bulun, S. E., Yilmaz, B. D., Sison, C., Miyazaki, K., Bernardi, L., Liu, S., Kohlmeier, A., Yin, P., Milad, M., & Wei, J. (2019). Endometriosis. *Endocrine reviews*, 40(4), 1048-1079.

Chan, N., Willis, A., Kornhauser, N., Ward, M. M., Lee, S. B., Nackos, E., Seo, B. R., Chuang, E., Cigler, T., Moore, A., Donovan, D., Vallee Cobham, M., Fitzpatrick, V., Schneider, S., Wiener, A., Guillaume-Abraham, J., Aljom, E., Zerkowitz, R., Warren, J. D., Lane, M. E., ... Vahdat, L. (2017). Influencing the Tumor Microenvironment: A Phase II Study of Copper Depletion Using Tetrathiomolybdate in Patients with Breast Cancer at High Risk for Recurrence and in Preclinical Models of Lung Metastases. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(3), 666-676.

Cox, C., Merajver, S. D., Yoo, S., Dick, R. D., Brewer, G. J., Lee, J. S., & Teknos, T. N. (2003). Inhibition of the growth of squamous cell carcinoma by tetrathiomolybdate-induced copper suppression in a murine model. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*, 129(7), 781-785.

Delsouc, M. B., Ghersa, F., Ramirez, D., Della Vedova, M. C., Gil, R. A., Vallcaneras, S. S., & Casais, M. (2019). Endometriosis progression in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice: Impact on oxidative/nitrosative stress and metalloic profile. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 52, 157-165.

Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S., & Cater, M. A. (2015). Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metalloics: integrated biometal science*, 7(11), 1459-1476.

Darbre P. D. (2006). Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *Journal of applied toxicology: JAT*, 26(3), 191–197.

Eleutherio, E., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of biochemistry and biophysics*, 697, 108701.

Klevay, L. M., & Christopherson, D. M. (2000). Copper deficiency halves serum dehydroepiandrosterone in rats. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 14(3), 143–145.

Lelièvre, P., Sancey, L., Coll, J. L., Deniaud, A., & Busser, B. (2020). The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy. *Cancers*, 12(12), 3594.

McKinnon, B. D., Kocbek, V., Nirgianakis, K., Bersinger, N. A., & Mueller, M. D. (2016). Kinase signalling pathways in endometriosis: potential targets for non-hormonal therapeutics. *Human reproduction update*, 22(3), 382–403.

Pan, Q., Kleer, C. G., van Golen, K. L., Irani, J., Bottema, K. M., Bias, C., De Carvalho, M., Mesri, E. A., Robins, D. M., Dick, R. D., Brewer, G. J., & Merajver, S. D. (2002). Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer research*, 62(17), 4854–4859.

Pollack, A. Z., Louis, G. M., Chen, Z., Peterson, C. M., Sundaram, R., Croughan, M. S., Sun, L., Hediger, M. L., Stanford, J. B., Varner, M. W., Palmer, C. D., Steuerwald, A. J., & Parsons, P. J. (2013). Trace elements and endometriosis: the ENDO study. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 42, 41–48.

Redman, B. G., Esper, P., Pan, Q., Dunn, R. L., Hussain, H. K., Chenevert, T., Brewer, G. J., & Merajver, S. D. (2003). Phase II trial of tetrathiomolybdate in patients with advanced kidney cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(5), 1666–1672.

Rižner, T. L. (2009). Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 307(1-2), 8-18.

Rogers, P. A., Adamson, G. D., Al-Jefout, M., Becker, C. M., D'Hooghe, T. M., Dunselman, G. A., Fazleabas, A., Giudice, L. C., Horne, A. W., Hull, M. L., Hummelshoj, L., Missmer, S. A., Montgomery, G. W., Stratton, P., Taylor, R. N., Rombauts, L., Saunders, P. T., Vincent, K., Zondervan, K. T., & WES/WERF Consortium for Research Priorities in Endometriosis (2017). *Research Priorities for Endometriosis. Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 24(2), 202–226.

Rzymiski, P., Tomczyk, K., Rzymiski, P., Poniedziałek, B., Opala, T., Wilczak, M. (2015). Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Ann Agric Environ Med.*, 22(2), 259–264.

Soni, R. K., Gupta, P. S. P., Nandi, S., Mondal, S., Ippala, J. R., Mor, A., ... & Tripathi, S. K. (2018). Effect of in vitro copper supplementation on granulosa cell estradiol synthesis and associated genes. *Indian Journal of Animal Research*, 52(5), 652–657.

Sun, Y., Wang, W., Guo, Y., Zheng, B., Li, H., Chen, J., & Zhang, W. (2019). High copper levels in follicular fluid affect follicle development in polycystic ovary syndrome patients: Population-based and in vitro studies. *Toxicology and applied pharmacology*, 365, 101–111.

Taylor, H. S., Kotlyar, A. M., & Flores, V. A. (2021). Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *Lancet (London, England)*, 397(10276), 839–852.

Turgut, A., Özler, A., Görük, N. Y., Tunc, S. Y., Evliyaoglu, O., & Gül, T. (2013). Copper, ceruloplasmin and oxidative stress in patients with advanced-stage endometriosis. *European review for medical and pharmacological sciences*, 17(11), 1472-1478.

Turski, M. L., Brady, D. C., Kim, H. J., Kim, B. E., Nose, Y., Counter, C. M., Winge, D. R., & Thiele, D. J. (2012). A novel role for copper in Ras/mitogen-activated protein kinase signaling. *Molecular and cellular biology*, 32(7), 1284-1295.

Walter, P. L., Kampkötter, A., Eckers, A., Barthel, A., Schmoll, D., Sies, H., & Klotz, L. O. (2006). Modulation of FoxO signaling in human hepatoma cells by exposure to copper or zinc ions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 454(2), 107-113.

Xu, M., Casio, M., Range, D. E., Sosa, J. A., & Counter, C. M. (2018). Copper Chelation as Targeted Therapy in a Mouse Model of Oncogenic BRAF-Driven Papillary Thyroid Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(17), 4271-4281.

# CAPÍTULO 6

## LAS CARDIOPATÍAS, EL EJERCICIO Y SU INTERRELACIÓN AMBIENTAL: REVISION DE LITERATURA

Data de submissão: 10/09/2021

Data de aceite: 29/09/2021

**Luana de Andrade Mazia**

Curso de Medicina  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0001-6045-0861>

**Pedro Jorge Cortes Morales, Ddo.**

Programa de Pós-Graduação em  
Saúde e Meio Ambiente  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0002-3290-8641>

**Gilmar Sidnei Erzinger, Dr.**

Programa de Pós-Graduação em  
Saúde e Meio Ambiente  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0001-6262-4677>

**Eduarda Eugenia Dias de Jesus**

Curso de Educação Física  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0002-9166-7825>

**Fabricio Faitarone Brasilino, MSc.**

Curso de Educação Física  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0002-2562-0527>

**Luís Fernando Rosa, MSc.**

Curso de Educação Física  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0002-7133-1347>

**Maria Caroline Marcomini Tezolin**

Curso de Medicina  
Universidade da Região de Joinville  
UNIVILLE

<https://orcid.org/0000-0003-1332-2108>

**RESUMEN:** El objetivo del estudio fue identificar si existen interrelaciones ambientales entre la enfermedad cardíaca y el ejercicio. Este estudio consistió en una revisión de la literatura estructurada en la búsqueda del patrón de sistematización de la información. Se utilizó la plataforma MedLine, Scielo, Lilacs, Ebsco, Capes, PubMed y Academic Google, donde se recopilaban artículos y libros de estudio. Para ello, los descriptores se utilizaron únicamente en inglés, español y portugués. Sin embargo, según algunos controles, se descartaron trabajos que no abordaran el tema específico o por presentar síntomas congénitos, factor que excluyó el estudio. Así, vemos que, en los últimos años, la educación física se ha vuelto más evidente como herramienta auxiliar en la medicina. Dado que el corazón es un órgano muy importante para el funcionamiento del cuerpo

humano en su conjunto, es necesario comprender que el ejercicio físico se convierte en una herramienta auxiliar para mantener los niveles de salud del cuerpo humano. También es necesario demostrar que el factor ambiental puede reaccionar favorable o negativamente ante posibles daños al sistema cardíaco y órganos relacionados.

**PALABRAS CLAVE:** Enfermedad cardiovascular. Medio ambiente. Ejercicio físico.

## CARDIOPATHIES, EXERCISE AND ITS ENVIRONMENTAL INTERRELATION: LITERATURE REVISION

**ABSTRACT:** The aim of the study was to identify whether there are environmental interrelationships between heart disease and exercise. This study consisted of a literature review structured in a search for the pattern of systematization of information. The MedLine, Scielo, Lilacs, Ebsco, Capes, PubMed and Academic Google platform were used, where articles and study books were collected. For this purpose, the descriptors were used only in English, Spanish and Portuguese. However, according to some controls, works that did not address the specific topic or because they presented congenital symptoms were discarded, a factor that excluded the study. Thus, we see that in recent years, physical education has become more evident as an auxiliary tool in medicine. Since the heart is a very important organ for the functioning of the human body, it is necessary to understand that physical exercise becomes an auxiliary tool in maintaining the health levels of the human body. It is also necessary to show that the environmental factor can react favorably or negatively to possible damage to the cardiac system and related organs.

**KEYWORDS:** Cardiovascular Disease. Environment. Physical exercise.

## AS CARDIOPATIAS, O EXERCÍCIO E SUA INTERRELAÇÃO AMBIENTAL: REVISÃO DA LITERATURA

**RESUMO:** O objetivo do estudo foi identificar se existem inter-relações ambientais entre as cardiopatias e o exercício. Este estudo foi composto de uma revisão de literatura estruturada em uma busca no padrão da sistematização de informações. Utilizou-se a plataforma MedLine, Scielo, Lilacs, Ebsco, Capes, PubMed e Google Acadêmico, onde foram captados os artigos e livros de estudo. Para tanto utilizou-se os descritores somente em inglês, espanhol e português. Contudo, conforme alguns controles, foram descartados os trabalhos que não abordarem o tema específico ou por apresentarem sintomatologia congênita, fator de descarte do estudo. Assim, vemos que nos últimos anos, a educação física se tornou mais evidente como uma ferramenta auxiliar da medicina. Visto que o coração é um órgão muito importante para o funcionamento do corpo humano como um todo, sendo necessário compreender que o exercício físico se torna uma ferramenta auxiliar na manutenção dos níveis de saúde do corpo humano. Também é necessário evidenciar que o fator ambiental pode reagir favorável ou negativamente aos possíveis danos que são acometidos ao sistema cardíaco e órgãos relacionados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doença Cardiovascular. Meio ambiente. Exercício físico.



## 1 INTRODUCCIÓN

El ambiente siempre está relacionado con las diferentes acciones de nuestra vida diaria, aunque a veces más y otras menos. En este sentido, los problemas cardíacos siempre se han asociado a diferentes factores ambientales.

La enfermedad cardiovascular es una patología insidiosa (Lunkes et al., 2018), considerada la principal causa de mortalidad en el mundo (Avelino et al., 2020). En Brasil, las enfermedades cardíacas representan el 28% de la población, constituyendo un problema de salud pública relevante (Sarraf et al. 2018).

Actualmente, es común en los cursos de pregrado que existan disciplinas que presenten el corazón, su anatomía, fisiología, posibles enfermedades y tratamientos a partir del ejercicio físico. Sin embargo, la prescripción y desarrollo de una formación más específica sigue siendo un cuidado que debe ser atendido bajo las guías de cardiología (Silva et al., 2021).

La comprensión de la aplicabilidad del ejercicio como herramienta de recuperación y estabilización del individuo afectado por la insuficiencia cardíaca es ya una realidad y puede ampliarse desde la perspectiva de la situación ambiental hasta la deficiencia.

La Sociedad Brasileña de Cardiología destaca que los pacientes con enfermedades cardíacas pueden obtener beneficios positivos del ejercicio físico regular, ayudando con hábitos de vida saludables y tratamiento (Précoma et al., 2019).

Bomfim y col. (2021), destaca en su estudio la necesidad de la actividad física para protegerse de las enfermedades cardiovasculares, siendo un mecanismo directamente relacionado con la prevención y el control. Para ello, los beneficios de esta práctica solo se conseguirán si los ejercicios se realizan de forma adecuada y regular (Trapé et al., 2018).

El estudio de Silva et al. (2021) se pudo observar la mejoría clínica de algunos pacientes cardíacos que se encontraban en un grupo de riesgo en relación con la Índice Cintura Cadera (ICC) e Índice de Masa Corporal (IMC), y luego de las actividades aeróbicas y anaeróbicas, migraron al rango normal previsto en el protocolo.

Sin embargo, se ha descubierto que muchas características del entorno tienen una influencia importante en el riesgo, la progresión y la gravedad de las enfermedades cardiovasculares (ECV). Los cambios en el medio ambiente debido a la migración a diferentes ubicaciones geográficas, los cambios en las elecciones de estilo de vida y los cambios en las políticas sociales y las prácticas culturales alteran el riesgo de ECV, incluso en ausencia de cambios genéticos (Bhatnagar, 2017).

En este contexto, este estudio tiene como objetivo identificar si existen interrelaciones ambientales entre la enfermedad cardíaca y el ejercicio.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio consistió en una revisión de la literatura estructurada en la búsqueda del patrón de sistematización de la información. Se utilizó la plataforma: MedLine, Scielo, Lilacs, Ebsco, Capes, PubMed y Academic Google.

Para ello se utilizaron los siguientes descriptores: Enfermedad cardíaca, ejercicio y rehabilitación cardíaca, medio ambiente y enfermedad cardíaca, formación profesional en educación física. Se utilizaron los descriptores correspondientes en inglés: “*Cardiac diseases*”, “*cardiac exercise and rehabilitation*”, “*environment and heart disease*” e “*vocational training physical education*” e español: “Enfermedades cardíacas”, “ejercicio y rehabilitación cardíacas”, “medio ambiente y enfermedades cardíacas” y “formación profesional en educación física”.

En este primer momento se utilizaron libros y artículos encontrados con la temática considerada material de apoyo académico para estudiantes de pregrado y aportan la relevancia del tema abordado. De los artículos encontrados, luego de ser leídos, se descartaron trabajos que no abordaran el tema específico o por presentar síntomas congénitos, lo que fue un factor para descartar el estudio.

El método de este estudio es revisar los artículos para reportar los demás resultados alcanzados en las investigaciones y que estos puedan asociarse con un equipo interprofesional como alternativa al tratamiento de la enfermedad, así como la asociación con el medio ambiente.

## 3 REVISIÓN Y DISCUSIÓN

### 3.1 EL CORAZÓN

El corazón es parte del sistema circulatorio y se considera el órgano principal. Se ubica en el centro mediano de la cavidad torácica, pesa menos de 500g y con dos tercios de su masa a la izquierda de la línea media del cuerpo (Tortora & Derrickson, 2016). Sus características básicas son la división en cuatro cámaras, también llamadas cámaras cardíacas.

“El corazón, la estructura principal del mediastino medio, está dividido en dos mitades, derecha e izquierda, por un tabique longitudinal. Cada mitad consta de dos cámaras, las aurículas que reciben sangre de las venas, y en otra, los ventrículos, que conducen la sangre a las arterias: la aorta y la pulmonar” (PORTO, 2017, p 430).

Estos tienen la función de almacenar y redistribuir el volumen de sangre en todo el sistema. El principio activo del corazón es el de una bomba de impulsión y aspiración que tira y empuja la sangre por todo el cuerpo (Spencer, 1991).

La constitución básica del corazón es de un músculo cardíaco, único en el sistema anatómico del ser humano, con características muy específicas y diferenciadas de los músculos lisos y estriados que componen el resto del cuerpo y órganos. Su formato puede ser relacionado con el de una mano totalmente cerrada (Tortora & Derrickson, 2016 y Spencer, 1991), dedos flexionados en secuencia, pero con un gran espacio ocupado por las cámaras denominadas de atrios y ventrículos.

En el corazón están las aurículas (parte superior) que recolectan sangre y los ventrículos (parte inferior) la expulsan al resto del cuerpo. La aurícula derecha es donde fluyen las principales venas sistémicas. La aurícula izquierda recibe las venas pulmonares que entran por separado o en grupos. El ventrículo derecho tiene características específicas, como una media luna en sección transversal. El ventrículo izquierdo forma el vértice del corazón y su pared es más gruesa que la derecha.

Este órgano está ubicado en la región central del tórax, protegido por la caja torácica, entre los dos pulmones y cubierto por una membrana fibrosa conocida como pericardio (Furtado et al., 2017).

### 3.2 ENFERMEDADES CARDÍACAS

Las cardiopatías se encuentran entre las principales causas de muerte en diferentes países en vías de desarrollo y desarrollados (Guimarães et al., 2015). Las enfermedades cardíacas pueden adquirirse o presentarse desde el nacimiento. Los adquiridos tienen diferentes nombres como: enfermedades del miocardio, infección cardíaca, enfermedad valvular, enfermedad cardíaca hipertensiva y enfermedad cardíaca isquémica (Nunes & Silva, 2020).

Las enfermedades cardíacas, incluidas las congénitas, se pueden diagnosticar mediante pruebas de capacidad funcional. En este caso, el evaluador somete al paciente a un cierto esfuerzo físico y los datos obtenidos pueden reportar las incapacidades del corazón. Además de la prueba física, es necesario realizar un seguimiento del médico, como una encuesta histórica de posible afectación cardíaca (Silva et al., 2021).

Además de la prueba de esfuerzo, está el electrocardiograma en reposo, el ecocardiograma en reposo o asociado al esfuerzo y uso de fármacos, radiografía de tórax, gammagrafía miocárdica y ventriculografía coronaria.

Desde el tratamiento inicial hasta los tratamientos más prolongados, depende del médico determinar los procedimientos en las fases de recuperación, incluido el uso de equipo reglamentario o cirugía.

En Godoy (1997) se presentan los actos y comportamientos profesionales, mostrando que el médico está siempre en primer plano en la atención seguida por el

fisioterapeuta, el terapeuta ocupacional y el nutricionista, y acaba con el profesional de Educación Física. Estos actos corresponden a las fases I, II y III del proceso de recuperación y rehabilitación de la afectación cardíaca. Esta presentación de la conducta evidencia la prestación del servicio del profesional de Educación Física en el proceso, sin embargo, es necesario enfatizar que el hecho de existir en la conducta no convierte al profesional, efectivamente, en un prestador (GUIMARÃES et al. 1999).

### 3.3 EDUCACIÓN FÍSICA

En los últimos años, la educación física se ha vuelto más evidente como herramienta auxiliar en la medicina. En 1997, el Consejo Nacional de Salud - Ministerio de Salud, mediante Resolución CNS No. 218 del 6 de marzo de 1997, comenzó a catalogar la Educación Física como un área de salud. El mismo consejo, incluso en 1997, comenzó a reconocer al profesional de Educación Física como miembro del área de salud (BRASIL, 1997), permitiendo que el profesional formado en cursos de educación superior se reuniera con médicos y otros profesionales y entornos relacionados con esta. gran superficie (Loch et al., 2020).

Aunque era el año 1997, pocos cursos de educación superior aprovecharon esta oportunidad y, al igual que los cursos, los profesionales graduados también hicieron poco. Durante los últimos 22 años, este problema se ha reorganizado. Los nuevos marcos curriculares se mostraban más abiertos a este cambio y no esperaban a que solo el profesional abriera este camino.

En 2004, el Consejo Nacional de Educación emitió directrices (07 del 31/04/04 - Brasil, 2004, y 04 del 06/04/2009 - Brasil, 2009) para cursos en el área de la salud que hacen más efectiva esta característica. Las disciplinas están estructuradas con el objetivo de la interdisciplinariedad y la atención de la salud en su conjunto. En este contexto inicial, aprovechando la realineación de los cursos de educación física dentro del área de la salud y apuntando a su relación con el medio ambiente, comenzamos a darnos cuenta de la importancia de identificar las interrelaciones ambientales entre la cardiopatía y el ejercicio físico.

El conocimiento sobre enfermedades y procesos de recuperación debe basarse en principios básicos de egreso en Educación Física como anatomía, fisiología, bioquímica, cineantropometría, entrenamiento deportivo, asistencia a grupos especiales, entre otras disciplinas. El mayor problema de la graduación es el tiempo asignado en el plan de estudios para que estas materias puedan satisfacer la demanda necesaria en la prestación de servicios especializados.

En torno a esto surge la necesidad de una formación complementaria que puede darse a través de cursos de formación complementaria o de especialización lato-sensu.

A diferencia del curso de medicina, la educación física no cuenta con un programa formativo complementario específico como la residencia médica. Esta formación adicional aparece según sea necesario. La educación física tiene una formación muy generalizada en su proceso formativo y hace que sea imposible impartir una formación específica. En este contexto, los egresados necesitan orientar su carrera hacia el trabajo y también hacia la formación continua, lo que les obliga a cruzar muchos caminos si no tienen uno ya elegido (Candido et al., 2018).

En 1998, la educación física fue reconocida como profesión, el egresado, a partir del 1 de septiembre de 1998 (Brasil, 1998), pasó a ser conocido como profesional de educación física, hasta entonces como docente de educación física. Si bien esto sucedió, aún se necesitaron otros seis años para que el Consejo Nacional de Educación (BRASIL, 2004) formalizara la separación de bachillerato y licenciatura, haciendo más evidente la formación para el área de la salud.

Este cambio en el estatus de egreso en educación física es lo que posibilitó los cambios más efectivos en los planes de estudio, aunque todavía, en un principio, no tan notorios. Los cursos comenzaron a mostrar disciplinas que ya tenían menos características deportivas y un cuidado más efectivo para el individuo en su conjunto (Rocha et al., 2019).

El proceso de formación en educación física, en su base más remota, aparece como un curso de formación para la licenciatura, es decir, la formación del profesorado para la educación formal, y así fue durante muchos años. En 1987 se crea el bachillerato en educación física, un intento de desvincular la enseñanza formal de la práctica deportiva y otras posibilidades que pudiera tener el egresado en educación física (Ramalho & Cardoso, 2021).

El bachillerato es la carrera que se relaciona directamente con el área de la salud, conteniendo disciplinas que sugieren su rol en la prevención y control de la salud en individuos considerados saludables, y su desempeño está garantizado en los casos que requieran la práctica de ejercicios durante la recuperación de afectados por diferentes problemas en su salud. Una de estas prácticas es la rehabilitación cardíaca.

La resolución surgió y nunca fue efectivamente llevada a cabo por el máximo órgano de educación (MEC), por lo que los grados, licenciatura y bachillerato, convivieron hasta 2004 cuando efectivamente se separaron.

El MEC autorizó, en base a resoluciones, la separación oficial de asignaturas, convirtiendo la educación física en dos titulaciones específicas. Actualmente, bajo pautas específicas, los cursos se desarrollan en cursos de educación superior en todo el país (Barboni & Dias-Junior, 2017).

### 3.4 EJERCICIO FÍSICO

A partir de la formación completa el profesional de educación física necesita estar regularmente inscrito en el consejo de clase para poder actuar. El Consejo Federal de Educación Física - CONFEF fue creado bajo la Ley n° 9696 de 1° de septiembre de 1998 (1998) iniciando la profesionalización de la formación en educación física (licenciados y bachilleres) a través del sistema de control de la actuación profesional CONFEF / CREFs (Consejo Regional de Educación Física).

Los CREFs se ubican en los estados, en Santa Catarina es el CREF03 que coordina los registros y fiscaliza la actuación profesional garantizando al usuario la calidad en la prestación del servicio que involucra el ejercicio, el deporte, la gestión y la educación física escolar.

La mención con respecto al CONFEF es sólo informar que el profesional debe estar habilitado para el ejercicio no sólo con el diploma, sino también con el registro en el consejo de clase.

En este contexto, podemos afirmar que la realización del programa de entrenamiento o ejercicio físico en el proceso de rehabilitación debe ser realizada por un profesional de educación física tan pronto como sea dado de alta por su médico (Pessoa et al., 2017).

El concepto de actividad física puede caracterizarse por cualquier movimiento que genere un gasto calórico superior al nivel en reposo (Caspersen, Powell & Christenson (1985). Los mismos autores también destacan que el ejercicio físico consiste en una actividad física sistemática, estructurada y con objetivos específicos.

El uso indiscriminado del término actividad física, principalmente por parte de los medios de comunicación, conlleva muchos retrocesos en la comprensión de ambos. Un ejemplo de esto se encuentra en el artículo de Nascimento et al. (2016) donde el título sugiere actividad física y el cuerpo del texto se refiere al ejercicio.

Los ejercicios físicos tienen la función básica de promover el desarrollo de habilidades físicas que, por tanto, promueven la mejora de la condición física. La aptitud física está relacionada con la capacidad del individuo para resolver problemas cotidianos o relacionados con el deporte.

La referencia a la mejora de la calidad de vida y la salud se relaciona con el uso del ejercicio físico como fuente de beneficios para el cuerpo, el razonamiento, la salud y el espíritu (Martin & Stockler, 1998; Lipp & Rocha, 1996). La práctica de ejercicios para este fin no busca registros, sino objetivos prácticos para mejorar el comportamiento físico y fisiológico, capacitando al individuo para vivir con calidad y autonomía el mayor tiempo posible en la vida, haciéndolo útil en el período más crítico, que es el final de tu vida.

Mandsager y col. (2018) presentan un estudio a largo plazo en el que se analizaron 122.007 participantes en una prueba en tapiz rodante para determinar la capacidad cardiorrespiratoria y la mortalidad asociada. En este estudio, fue posible encontrar que una aptitud extremadamente alta se asoció con una supervivencia más larga y se asoció con un beneficio en los participantes mayores e hipertensos.

En el caso específico de personas con enfermedad cardíaca, el médico será el responsable de brindar la información inicial para el programa a implementar, e incluso se le deberá preguntar sobre las diferentes posibilidades de capacitación con su paciente, de acuerdo con el Art. 4 de la Resolución No. 1236/87 (CFM, 1987).

Los programas deben ser individualizados para que se puedan observar los efectos y la continuidad sea un factor decisivo en la búsqueda de metas concretas, sin embargo, es necesario enfatizar que la práctica de ejercicios no puede verse como un factor único en el proceso de rehabilitación.

### 3.5 EL FACTOR AMBIENTAL

Los factores ambientales son complejos y sus dominios naturales, sociales y personales son muy variables debido a la diversidad, las historias evolutivas, las estructuras sociales y las elecciones individuales (Bhatnagar, 2017).

Kivimäki y col. (2017) en su estudio de cohorte muestra que las personas que están más comprometidas, en términos de horas de trabajo, son más propensas a la fibrilación auricular (40%) que aquellas que solo cumplen con las horas de trabajo estándar. Podemos decir que los ambientes estresantes o altamente responsables afectan al individuo y uno de los daños más evidentes está en el corazón.

El entorno residencial, que podría ser un consuelo o descanso, a veces puede convertirse en una molestia, lo que puede generar estrés adicional. De todos modos, eso sí, el entorno también puede estar por debajo de las condiciones ideales de vida y, en este caso, puede estar relacionado con factores más determinantes del aumento del estrés psicológico y fisiológico.

Andrade y Dolinski (2017) realizaron una revisión sobre la práctica de ejercicios y el medio ambiente y notaron que, en los estudios analizados, existía una correspondencia entre contaminantes y límites establecidos para la normalidad de la práctica. Sin embargo, en otro estudio de Andrade et al. (2018) realizado en colaboración con instituciones de Europa, ya es posible establecer que hay lugares de práctica de ejercicio que están trabajando con índices de concentración de CO<sub>2</sub> muy superiores a los recomendados para la salud.



En este sentido, es bueno recordar que el ejercicio puede verse comprometido por la ineficiencia de la ventilación en el espacio físico y convertirse en un elemento nocivo.

Para Mantovani et al. (2016) y Pope III (2004) retratan la existencia de estudios que presentan los contaminantes del aire con destaque para: las primarias, como el monóxido de carbono (CO), los óxidos de nitrógeno (NOx), PM (partículas de diámetro inferior a 10 micras) y fracciones como PM (partícula de diámetro inferior o igual a 2,5 µm) que componen entre el 60% y el 70% del material en partículas PM. Estos componentes van a interferir en el individuo y pueden producir daños a la salud. En este caso Sade et al. (2015) presentarán, en su estudio que la PM está asociada a enfermedades cardiovasculares y que puede incidir en el ACV a partir de la contaminación en ambiente de desplazamiento.

Si bien aún es necesario identificar con mayor claridad los mecanismos de acción y las características de los individuos, existe evidencia de que gran parte de los efectos adversos sobre la salud humana, relacionados con la contaminación atmosférica, en los grandes centros urbanos se pueden atribuir a las emisiones del tráfico vehicular. (Rodrigues et al., 2017).

Los estudios en Itabira-MG mostró que la minería a cielo abierto de mineral de hierro es la fuente aparentemente más relevante de emisión de material particulado inhalable, siendo que aumentos de 10 µg / m<sup>3</sup> en la concentración de este contaminante resultaron, para las enfermedades cardiovasculares, un efecto agudo con crecimiento de más del 4% (IC95%: 0,8-8,5) en las atenciones de emergencia el mismo día el mismo día de la exposición al contaminante. El efecto parece ser mayor para los pacientes con edad entre 45 y 64 años (Mantovani et al., 2016).

Así, el compromiso de trabajar de forma más agresiva genera un resultado muy estresante para el corazón. Aliado a la rutina laboral está el tráfico complicado que hace que el individuo gane un estrés adicional. La jornada laboral aumenta por el retraso y los contratiempos encontrados en los desplazamientos grandes y prolongados, a menudo aumentados por incidentes inusuales en el camino.

#### 4 CONSIDERACIONES FINALES

Es posible entender que el corazón es un órgano muy importante para el funcionamiento del cuerpo humano en su conjunto, también es necesario entender que con el tiempo pueden surgir posibles enfermedades por diferentes motivos y, sí, podemos tener enfermedades heredadas de nuestros antepasados para que puedan o no manifestarse en el curso de nuestras vidas.

El ejercicio físico se convierte en una herramienta auxiliar en el mantenimiento de los niveles de salud del cuerpo humano, evidenciando que su práctica, ejercitada de

maneira consistente y bien programada, puede incidir en aspectos relacionados con el mantenimiento y ganancia de la calidad de vida.

También es necesario demostrar que el factor ambiental, en diferentes circunstancias, puede reaccionar favorable o negativamente ante posibles daños al sistema cardíaco y órganos relacionados.

## REFERENCIAS

Andrade, A., & Dominski, F. H. (2018). Indoor air quality of environments used for physical exercise and sports practice: Systematic review. *Journal of environmental management*, 206:577–586.

Andrade, A., Dominski, F. H., Pereira, M. L., de Liz, C. M., & Buonanno, G. (2018). Infection risk in gyms during physical exercise. *Environmental science and pollution research international*, 25(20):19675–19686.

Avelino, E. B., Morais, B. S. A., Santos, A. C. B., Bovi, A. C. N., Paz, N. H., Santos, A. L. S., & Lima, J. H. M. (2020). Fatores de risco para doença cardiovascular em adultos jovens sedentários. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba. 6(8):58843-58854.

Barboni, V. G. A. V., & Dias Junior, E. M. (2017). FORMAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA: UMA REFLEXÃO COMPARATIVA ENTRE DUAS REALIDADES, *Movimento*, 23(1):379-392.

Bhatnagar A. (2017). Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 121(2):162–180.

Bomfim, V. V. B. da S., AleluiaE. dos S., de JesusH. F., de AlmeidaA. L. de S. M., CostaG. de S., BritoA. da S., SilvaT. R. C., OliveiraL. A., AlmeidaH. S., & BarretoN. C. da S. (2021). Fração prevenível na associação entre a atividade física e doença cardiovascular: uma revisão narrativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 13(2), e4120.

Brasil (1997). Resolução CNS nº 218 Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde de 06 de março de 1997.

Brasil (1997). Diário Oficial – n.º 83 Segunda-feira, 5 de maio. Seção I p. 8932-33.

Brasil (1997). Resolução CNS nº 287 de 08 de outubro de 1998. Conselho Nacional da Saúde. Ministério da Saúde, Brasília.

Brasil (1998). Lei nº 9696 de 1º de setembro de 1998. Casa Civil. Diário Oficial da União - Seção 1 - 2/9/1998, p 1.

Brasil (2004). Resolução CNE/CES nº08 de 31 de março de 2004. Diário Oficial da União. Ministério da Educação e Cultura. Publicada às fls. 18. Seção 1, de 05 de abril de 2004.

Brasil (2004). Resolução 04 de 31 de abril de 2004 DO CNE – Ministério da Educação, Brasília.

Brasil (2009). Resolução 07 de 06 de abril de 2009 DO CNE – Ministério da Educação, Brasília.

Candido, L. O., Rossit, R. A. S., & Oliveira, R. C. (2018) INSERÇÃO PROFISSIONAL DOS EGRESSOS DE UM CURSO DE EDUCAÇÃO FÍSICA COM ÊNFASE NA FORMAÇÃO EM SAÚDE. *Trab. Educ. Saúde*,16(1):305-318.

Caspersen, C. J., Powell, K. E., & Christenson, G. M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*, 100(2):126-131.

Chagas Ramalho, C., & de Souza Cardoso, F. (2021). A adequação à exploração do mercado de trabalho via segmentação da Licenciatura e Bacharelado em Educação Física. *Pensar a Prática*, 24.

Conselho Federal de Medicina (1997). Resolução 1236 de 14 de março de 1987. CFM.

Furtado, D. F. S., Vasconcelos, L. D. P., Branco, E. & Lima, A. R. (2017). Anatomia cardíaca e ramificações da aorta em macaco-prego (*Sapajus apella*). *Biotemas*, 30(4): 83-93.

Godoy, M. (1997). I consenso nacional de reabilitação cardiovascular. Departamento de Ergometria e Reabilitação Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Rio de Janeiro: *Arq Bras Cardiol*, 69(4).

Guimarães, G. V., Bacal, F. & Bocchi, E. A. (1999). Reabilitação e condicionamento físico após transplante cardíaco. *Rev Bras Med Esporte*, 5(4).

Guimarães, F., Gardenghi, G., & Silva, F. (2015). REABILITAÇÃO CARDÍACA, TRATAMENTO E PREVENÇÃO: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. *Movimenta (ISSN 1984-4298)*, 8(1).

Kivimäki, M., Nyberg, S. T., Batty, G. D., Kawachi, I., Jokela, M., Alfredsson, L., Bjorner, J. B., Borritz, M.,... IPD-Work consortium (2017). Long working hours as a risk factor for atrial fibrillation: a multi-cohort study. *European heart journal*, 38(34): 2621-2628.

Lipp, M., & Rocha, J. C. (1996). Stress, hipertensão arterial e qualidade de vida. 2ª ed. São Paulo; Papirus.

Loch, M. R.; Rech, C. R., & Costas, F. F. (2020) A urgência da Saúde Coletiva na formação em Educação Física: lições com o COVID-19. *Ciência & Saúde Coletiva*, 25(9):3511-3516.

Lunkes, L. C., Murgas, L. D. S., Dorneles, E. M. S., Rocha, C. B. M. da, & Machado, G. J. (2018). FATORES SOCIOECONÔMICOS RELACIONADOS ÀS DOENÇAS CARDIOVASCULARES: UMA REVISÃO. *Hygeia - Revista Brasileira De Geografia Médica E Da Saúde*, 14(28): 50 - 61.

Mandsager, K., Harb, S., Cremer, P., Phelan, D., Nissen, S. E., & Jaber, W. (2018). Association of Cardiorespiratory Fitness With Long-term Mortality Among Adults Undergoing Exercise Treadmill Testing. *JAMA network open*, 1(6), e183605.

Mantovani, K. C. C., Nascimento, L. F. C., Moreira, D. S., Vieira, L. C. P. F. da S. & Vargas, N. P. (2016). Poluentes do ar e internações devido a doenças cardiovasculares em São José do Rio Preto, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 21(2): 509-516.

Martin, A. J., & Stockler, M. (1998). Quality-of-life assessment in health care research and practice. *Evaluation & the health professions*, 21(2): 141-156.

Maier, G. S. O., & Martins, E. A. P. (2016). Health care for patients with acute coronary syndrome according to quality indicators. *Rev Bras Enferm [Internet]*. 69(3):710-7.

Pessoa, M. P. S., Pessoa, R. A. S., Alberto, O. J. L., & Olímpio, A. (2017) CAPACITAÇÃO DO PROFISSIONAL DE EDUCAÇÃO FÍSICA NA REABILITAÇÃO CARDIOVASCULAR. *Revista Carioca de Educação Física*, 12(1): 1-11.

Porto, C. C. (2017). *Semiologia Médica*. Co editor: Arnaldo Lemos Porto. 7. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Précoma, D. B. & Oliveira, G. M. M. O. (2019). Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2019. *Arq Bras Cardiol.*;113(4):787-891.

Rocha, B. B. da, Coelho, F. C. dos S., & Toledo, F. A. (2019). LICENCIATURA E BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA: IMPACTOS NA FORMAÇÃO PROFISSIONAL NO ESTADO DE MINAS GERAIS. *REVES - Revista Relações Sociais*, 2(1): 0103-0118.

Rodrigues, P. C. de O., Santos, E. S. dos, Hacon, S. de S. & Ignotti, E. (2017). Fatores de risco para mortalidade por doenças cardiovasculares associados à alta exposição ao tráfego veicular. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 20(3): 423–434.

Sade, M., Y., Novack, V., Ifergane, G., Horev, A., & Kloog, I. (2015). Air Pollution and Ischemic Stroke Among Young Adults. *Stroke*, 46(12): 3348–3353.

Sarraf, E. M., Barros, R. D. de, & Ribeiro, N. M. da S. (2018). Análise descritiva dos índices de morbidade e mortalidade de pacientes com cardiopatia reumática crônica em Salvador, Bahia, Brasil. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 17(3): 310–314.

Silva, V. A., Rosa, R. C., Jesus, E. E. D., Sierpinski, T. C., Delwing-de Lima, D., Joaquim, V. H. A., Fernandes, G. S. A., & Coelho, C. W. (2018) Efeitos da reabilitação cardiovascular sobre o índice de massa corporal e razão cintura/quadril de cardiopatas. *Brazilian Journal of Development*, 7(8):79934-79945.

Spencer, A. P. (1991). *Anatomia humana básica*. Tradução: Edson Aparecido Liberti. São Paulo: Manole.

Tortora, G. J.; & Derrickson, B. (2016). *Princípios de anatomia e fisiologia*. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Trapé, A. A., Lizzi, E. A. Da S., Jacomini, A. M., Bueno Júnior, C. R., Franco, L. J., & Zago, A. S. (2018). EXERCÍCIO FÍSICO SUPERVISIONADO, APTIDÃO FÍSICA E FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM ADULTOS E IDOSOS. *Revista Brasileira De Ciências Da Saúde*, 22(4): 291–298.

# CAPÍTULO 7

## MICROFAUNA EM CÓRREGOS DE CABECEIRA DO CERRADO CENTRAL DO BRASIL

Data de submissão: 20/10/2021

Data de aceite: 05/11/2021

**Claudia Padovesi-Fonseca**

Núcleo de Estudos Limnológicos (NEL)

Departamento de Ecologia

Instituto de Biologia

Universidade de Brasília – UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro

Brasília, DF CEP 70910-900, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-7915-3496>

**RESUMO:** A região nuclear do Domínio Cerrado está localizada no Planalto Central Brasileiro e representa um divisor das principais bacias do país e da América do Sul. O Cerrado é a mais extensa savana da América do Sul e compreende 21% do território brasileiro, e se espalha numa área de dois milhões de km<sup>2</sup>. Além de elevada riqueza biológica, uma boa parte de suas espécies são endêmicas, ou seja, seu habitat único é o Cerrado. A predominância de terras altas no Brasil central fornece condições para que as águas de superfície sejam drenadas para regiões mais baixas. A interface de divisor de águas pode representar um núcleo potencial para espécies aquáticas endêmicas, além de conferir áreas prioritárias para a conservação

aquática no Brasil. O conhecimento da microfauna aquática em riachos de cabeceira vem contribuir para aumentar o registro de novas espécies e endêmicas para o Domínio Cerrado. O presente capítulo apresenta resultados obtidos por estudos desenvolvidos no Cerrado do Brasil central em regiões de cabeceiras de riachos e interfaces entre biomas (Amazônia-Cerrado-Caatinga). Estes estudos registraram novas ocorrências de espécies, bem como a relação das espécies com as condições naturais e ainda protegidas de cabeceiras do Cerrado central do Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE:** Savana brasileira. Áreas preservadas. Biodiversidade aquática. Espécies endêmicas.

### MICROFAUNA OF THE HEADWATER STREAMS IN THE CENTRAL CERRADO OF BRAZIL

**ABSTRACT:** The nuclear region of Cerrado Domain located in the Brazilian Central Plateau and represents a divisor of the main basins' country as also of South America. The Cerrado is the most extensive savanna in South America and comprises 21% of the Brazilian territory, and spreads across an area of two million km<sup>2</sup>. In addition to high biological richness, high part of Cerrado' species are endemic, that is, their unique habitat is the Cerrado. The predominance of highlands in the central Brazil provides conditions for the surface water drainage to lower regions. The

watershed interface may represent a potential nucleus for endemic aquatic species, in addition to providing priority areas for aquatic conservation in Brazil. The knowledge of aquatic microfauna in headwater streams contributes to increase the records of new and endemic species for the Cerrado Domain. This chapter presents results obtained from studies carried out in the central Cerrado of Brazil on stream headwaters and interfaces between biomes (Amazon-Cerrado-Caatinga). These studies registered new occurrences of species, as well as the relationship of the species with the natural and still protected conditions of headwaters in the central Cerrado of Brazil.

**KEYWORDS:** Brazilian savanna. Preserved areas. Aquatic biodiversity. Endemic species.

## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é a mais extensa savana da América do Sul e compreende 21% do território brasileiro, com uma área de dois milhões de km<sup>2</sup>. A região nuclear dessa savana neotropical está localizada no Planalto Central Brasileiro e representa um divisor das principais bacias do país e da América do Sul (Fonseca et al., 2014). É biologicamente o mais rico do mundo, com um grau significativo de endemismo (PADOVESI-FONSECA et al., 2015).

O relevo do Planalto Central do Brasil apresenta extensas superfícies planas a suaves onduladas, as chapadas, situadas em cotas acima de 1000m de altitude. Riachos de cabeceiras da região nuclear do Cerrado emergem dessas terras altas e fornece condições para que as suas águas superficiais sejam drenadas para bacias hidrográficas contíguas. Com isso, essa região representa o principal divisor das águas no país. Nascentes e uma infinita rede de ecossistemas lóticos de pequeno porte, como riachos e córregos, fluem em profusão (PADOVESI-FONSECA, 2005).

A interface de divisor de águas pode representar um núcleo potencial para espécies aquáticas endêmicas, além de conferir áreas prioritárias para a conservação aquática no Brasil (PADOVESI-FONSECA et al., 2015). Além de abrigar espécies endêmicas e uma elevada biodiversidade (PADOVESI-FONSECA et al., 2021), estas áreas de interface podem estar ainda sob condição pristina. Portanto, amostragem da microfauna em riachos do Cerrado configura uma importante estratégia para conservação de cabeceiras de sistemas aquáticos no Brasil (PADOVESI-FONSECA et al., 2016).

Zooplâncton compõe um conjunto de microrganismos aquáticos que vivem em suspensão na água, sem conseguir transpor a correnteza. Os microinvertebrados planctônicos de água doce são compostos por crustáceos (Cladocera e Copepoda) e rotíferos (PADOVESI-FONSECA et al., 2015). Suas espécies são comumente referenciadas como elementos de qualidade para a conservação ambiental em sistemas aquáticos (ROCHA, 2020).

Águas de superfície naturais do Cerrado tendem a exibir uma notável heterogeneidade ambiental (REZENDE *et al.*, 2014) e com uma elevada diversidade zooplanctônica (GOMES *et al.*, 2020). Com base nesta heterogeneidade, e em especial, de locais mais altos e protegidos, sua preservação permanente tem sido um desafio para abrigar espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, revelando um elevado patrimônio de diversidade biológica (REZENDE *et al.*, 2019).

O conhecimento da microfauna aquática em riachos de cabeceira vem contribuir para alavancar o registro de novas espécies e endêmicas para o Domínio Cerrado. A amostragem da biota aquática nestas áreas de conexão também confere uma importante estratégia para reduzir lapsos relacionados à distribuição geográfica das espécies, e em especial em áreas protegidas e ainda pristinas. É uma fonte notável de registros novos e de espécies novas pois suas cabeceiras fluem para bacias mais baixas, formando corredores ecológicos naturais para muitas espécies aquáticas.

Este capítulo apresenta estudos realizados no Cerrado do Brasil central em regiões de cabeceiras de riachos e interfaces entre biomas (Amazônia-Cerrado-Caatinga). Apresenta resultados da microbiota aquática a partir das publicações: PADOVESI-FONSECA *et al.* (2016), PADOVESI-FONSECA & REZENDE (2017), TORRES *et al.* (2019), PADOVESI-FONSECA (2021) e PADOVESI-FONSECA *et al.* (2021).

## 2 A RIQUEZA BIOLÓGICA NAS NASCENTES DO CERRADO

A microbiota aquática registrada em águas naturais no Domínio Cerrado do Brasil central apresenta tendências de diversidade biológica diferente mais locais que regionais. Esta tendência foi observada por PADOVESI-FONSECA *et al.* (2021) e a diversidade de zooplâncton esteve direcionada por escalas espaciais menores, como as microbacias de riachos de cabeceira localizados no Distrito Federal.

Os córregos de cabeceira no Cerrado (Figura 1) tendem a ter águas mais frias (em torno de 17°C), transparentes, com baixo teor de nutrientes e levemente ácidas (FONSECA *et al.*, 2014). Neste sentido, investigar as características abióticas dessas águas é relevante como direção na diversidade do zooplâncton em sistemas tropicais.



Figura 1. Corredeiras na frente; ao fundo uma piscina. Rio dos Couros, Chapada dos Veadeiros-GO.



Foto: Claudia Padovesi Fonseca.

O zooplâncton deve ser considerado uma ferramenta de qualidade essencial para a conservação ambiental em ambientes aquáticos (CHIBA *et al.*, 2018; ROCHA, 2020). Tal aspecto é possível pela ubiquidade do zooplâncton em ambientes dulcícolas, especialmente em sistemas lênticos e lóticos de grande porte (KUMAR *et al.*, 2011).

Muitos recentes estudos sobre o zooplâncton de águas doces vêm sendo conduzidos no Brasil (PICAPEDRA *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2020). Entretanto, poucos estudos foram realizados em sistemas lóticos de pequeno porte (BRITO, 2020; XIONG *et al.*, 2020), e principalmente, em águas de cabeceira de regiões tropicais (PICAPEDRA *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2020), comparado com os sistemas lênticos dessa região (LOPES *et al.*, 2019; PINESE *et al.*, 2015). A comunidade zooplanctônica de lagoas naturais do Cerrado, formadas por afloramento do lençol freático, foi bem investigada (LOPES *et al.*, 2019; PADOVESI-FONSECA & REZENDE, 2017). Portanto, amostragem de microfauna em córregos de nascente no Domínio Cerrado configura uma importante estratégia para a conservação de mananciais e de sua biota (PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2016).

A região nuclear dessa savana tropical, localizada no Planalto do Brasil central, exhibe águas com uma forte heterogeneidade ambiental (FEIO *et al.*, 2018; REZENDE *et al.*, 2014), e comportam uma elevada diversidade zooplanctônica (GOMES *et al.*, 2020;

LOPES *et al.*, 2019). As cabeceiras de córregos de planalto se originam em áreas mais elevadas, que naturalmente fluem para partes ou bacias mais baixas, e podem formar corredores naturais para muitas espécies aquáticas (REZENDE *et al.*, 2017).

Baseado no potencial de elevada heterogeneidade ambiental dos sistemas aquáticos localizados em áreas altas e protegidas (Figura 2), sua preservação permanente tem sido um desafio para abrigar espécies endêmicas e em perigo de extinção, revelando um elevado patrimônio de biodiversidade (REZENDE *et al.*, 2019). Neste sentido, estudos sobre a composição taxonômica do zooplâncton (principalmente em termos locais e regionais) e as condições de qualidade da água são relevantes para a conservação das áreas de cabeceira no Domínio Cerrado.

Figura 2. Heterogeneidade ambiental em córregos de planalto. Piscina com água parada em trecho do rio dos Couros, Chapada dos Veadeiros-GO.



Foto: Claudia Padovesi Fonseca.

A potencialidade de obter novos registros de espécies em áreas de nascentes do Domínio Cerrado foi obtida no estudo realizado por PADOVESI-FONSECA *et al.* (2016) na região de transição entre Cerrado e Amazônia. Com este estudo, nove espécies de Cladocera (microcrustáceos aquáticos) foram registradas pela primeira vez. Regiões de nascentes localizadas em áreas de confluências entre biomas fornecem condições de ter uma diversidade nova e endêmica, e especialmente referente a áreas protegidas em condições prístinas.

### 3 ZOOPLÂNCTON COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE QUALIDADE DAS ÁGUAS DO CERRADO

O termo bioindicador representa qualquer forma de vida capaz de quantificar e monitorar as propriedades dos ecossistemas. São espécies ou grupos biológicos que indicam condições ambientais e suas alterações, que podem ser usados na avaliação dessas condições ambientais, e com possibilidade de intervenção humana precoce. As comunidades aquáticas respondem de maneira previsível às variações ambientais, como visto para os bentos em córrego periurbano do Distrito Federal (MOREYRA & PADOVESI-FONSECA, 2007). Os impactos de origem humana, por representarem elementos externos ao sistema, afetam este equilíbrio dinâmico, resultando em alterações nos padrões esperados (PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2010).

Em águas de nascentes do Cerrado as características locais tendem a ser preponderantes na condução da diversidade zooplanctônica (PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2021). Os resultados desse estudo apontam que a importância de escalas espaciais menores pode ser explicada pela soma de dois principais fatores. Um deles é a dispersão passiva dos organismos do zooplâncton, direcionada pela conexão entre os pontos de amostragem. O segundo fator corresponde às características do nicho, bem como a heterogeneidade ambiental e a sua estabilidade pela ação protetora da vegetação ripária (PADOVESI-FONSECA *et al.*, *op.cit.* e referências). Vimos, com isso, destacar o papel do zooplâncton como indicador útil e ferramenta auxiliar no monitoramento da qualidade das águas (Figura 3).

Figura 3. Coleta de zooplâncton em córregos de planalto. Rio Tocantzinho, Chapada dos Veadeiros-GO.



Foto: Claudia Padovesi Fonseca.

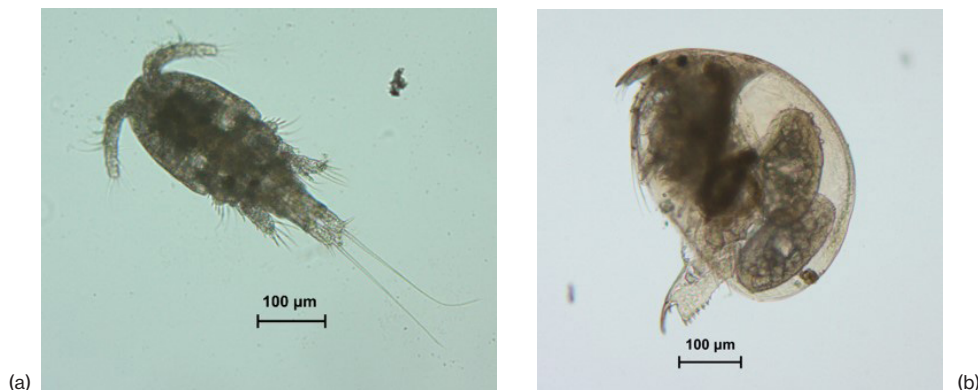
Em córregos de cabeceira, além de ter baixas densidades numéricas, o zooplâncton é dominado por microcrustáceos de pequeno porte e de estágios larvais (PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2016). A baixa riqueza de espécies em córregos de cabeceira pode ser explicada pela associação do zooplâncton com águas mais paradas (PADOVESI-FONSECA & REZENDE, 2017), como remansos. Os remansos são mais raros em córregos de cabeceira, se comparados com os rios maiores.

Além disso, o zooplâncton apresenta alta dependência de nutrientes dissolvidos na água (PADOVESI-FONSECA & REZENDE, 2017). Os nutrientes foram essenciais para registros maiores de riqueza de espécies em córregos de cabeceira do Distrito Federal (PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2021). Apesar disso, estas cabeceiras do Domínio Cerrado apresentam baixas concentrações de nutrientes (FONSECA *et al.*, 2014), o que explica as baixas densidade, diversidade e riqueza do zooplâncton (MUYLAERT *et al.*, 2010).

A heterogeneidade ambiental permite a diversificação de nichos e adaptação diferenciada em ambientes de correnteza, como os córregos. Ambientes de correnteza exerce ação sobre o modo de vida planctônico. Os efeitos da correnteza do rio e arraste dos organismos representam dois fatores que limitam o plâncton no canal dos cursos d'água. Grupos associados ao fundo dos rios, os chamados bentos, são adaptados a este tipo de ambiente e predominam, como os quidórídeos (PERBICHE-NEVES *et al.*, 2012). Assim, grupos não planctônicos são típicos representantes de cabeceiras do Cerrado. PADOVESI-FONSECA *et al.* (2016) registraram 80% de cladóceros não-planctônicos em córregos de interface Amazônia-Cerrado.

Adaptações morfológicas também são observadas no zooplâncton de rios. As espécies adaptadas à correnteza apresentam corpos cobertos por carapaças rígidas e com frequência são achatados dorso-ventralmente (Figura 4).

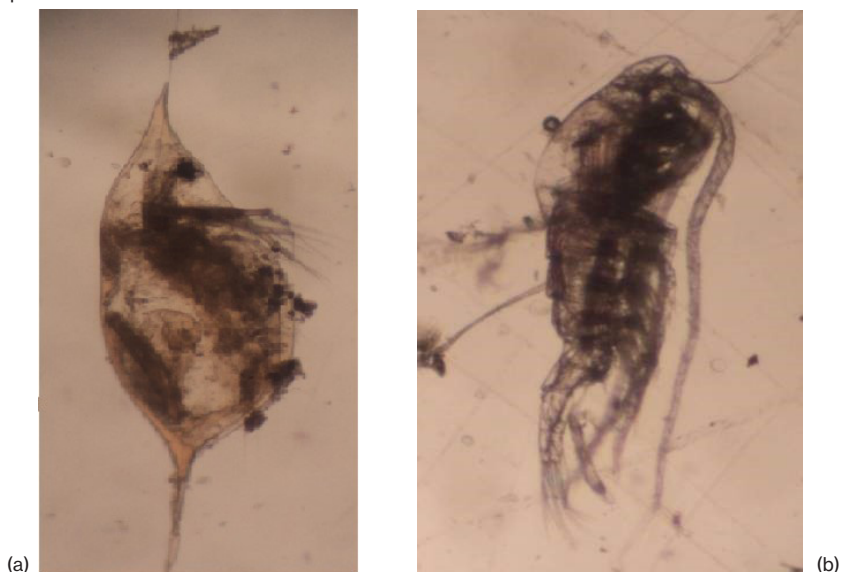
Figura 4. Espécies adaptadas à correnteza; vivem associados ao substrato ou vegetação. (a) Copepoda Cyclopoida; (b) Cladocera, *Alona guttata*. Estação Ecológica de Águas Emendadas-DF.



Fotos: Damião Ferreira da Costa.

As espécies planctônicas são adaptadas a ambientes parados, e nos rios são arrastadas para áreas laterais de remanso, ou piscinas ao longo do rio. Neste caso, quando são arrastados pela correnteza, morrem e quando capturados, estão com os corpos desidratados e quebrados (Figura 5). Este detalhe é importante salientar pois dificulta a identificação taxonômica dos espécimes coletados.

Figura 5. Espécies adaptadas a águas paradas; são arrastadas de remansos e piscinas dos córregos. Efeito: corpos desidratados e partes quebradas. (a) Cladocera, *Daphnia gessneri*; (b) Copepoda Calanoida. Rio dos Couros, Chapada dos Veadeiros-GO.



Fotos: Claudia Padovesi Fonseca.

A riqueza do zooplâncton em córregos de cabeceira normalmente é baixa e, por conseguinte, resulta em diferenças sutis entre os pontos de amostragem, e em escalas maiores as dissimilaridades não são detectadas (vide resultados de PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2021). Além do ambiente de correnteza não favorecer o desenvolvimento do zooplâncton, como dito anteriormente, a não variação da diversidade do zooplâncton nestas áreas podem também ser explicada por:

- (1) Similaridade entre os pontos de amostragem pelo estado de conservação dos córregos, que preserva um número similar de habitats (VAN ONSEM *et al.*, 2010);
- (2) Baixa concentração de nutrientes (FONSECA *et al.*, 2014; REZENDE, *et al.*, 2019) que pode limitar o número de espécies zooplânctônicas (MUYLAERT *et al.*, 2010).



Estes córregos são situados em áreas de proteção, em que suas cabeceiras são originalmente protegidas por uma densa vegetação ripária (FEIO *et al.*, 2018; REZENDE, *et al.*, 2019). Sob condições naturais, suas águas são oligotróficas, transparentes, ligeiramente ácidas e com baixo teor de nutrientes e de íons (FEIO *et al.*, 2018; FONSECA *et al.*, 2014; REZENDE, *et al.*, 2014).

Assim, padrões de diversidade de espécies são essenciais para o entendimento da ecologia de comunidades, bem como para prover informações em estratégias de conservação em córregos do Cerrado. Finalmente, baseado nas características peculiares desses córregos localizados em áreas protegidas e de planalto, sua preservação permanente deve ser considerada essencial na preservação de espécies endêmicas, revelando um vasto patrimônio, como substanciado pelos estudos apresentados aqui para os córregos do Cerrado do Brasil central.

#### 4 AGRADECIMENTOS

Este capítulo é produto de pesquisas desenvolvidas pelo Núcleo de Estudos Limnológicos (NEL), da Universidade de Brasília. O Grupo de Pesquisa é cadastrado no Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### REFERÊNCIAS

CHIBA, S.; BATTEN, S.; MARTIN, C.S.; *et al.* **Zooplankton monitoring to contribute towards addressing global biodiversity conservation challenges.** *Journal of Plankton Research*, 40, 509–518, 2018. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby030>

da BRITO, M.T.S.; HEINO, J.; POZZOBOM, U.M.; LANDEIRO, V.L. **Ecological uniqueness and species richness of zooplankton in subtropical floodplain lakes.** *Aquatic Sciences*, 82, 43, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00027-020-0715-3>

da ROCHA, B.S.; de SOUZA, C.A.; MACHADO, K.B.; *et al.* **The relative influence of the environment, land use, and space on the functional and taxonomic structures of phytoplankton and zooplankton metacommunities in tropical reservoirs.** *Freshwater Science*, 2020. <https://doi.org/10.1086/708949>

FEIO, M.J.; LEITE, G.F.M.; REZENDE, R.S.; *et al.* **Macro-scale (biomes) differences in neotropical stream processes and community structure.** *Global Ecology and Conservation*, 16, e00498, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00498>

FONSECA, B.M.; MENDONÇA-GALVÃO, L.; PADOVESI-FONSECA, C.; *et al.* **Nutrient baselines of Cerrado low-order streams: Comparing natural and impacted sites in Central Brazil.** *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 19–33, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3351-8>

GOMES, L.F.; BARBOSA, J.C.; de OLIVEIRA, B.H.; *et al.* **Environmental and spatial influences on stream zooplankton communities of the Brazilian Cerrado.** *Community Ecology*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42974-020-00008-5>

KUMAR, N.J.L.; DAS, M.; MUKHERJI, R.; KUMAR, R.N. **Assessment of zooplankton diversity of a tropical wetland system.** International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences, 2, 983–990, 2011.

LOPES, V.G.; BRANCO, C.W.C.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; BINI, L.M. **Zooplankton temporal beta diversity along the longitudinal axis of a tropical reservoir.** Limnology, 20, 121–130, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10201-018-0558-y>

MUYLAERT, K.; PÉREZ-MARTINEZ, C.; SÁNCHEZ-CASTILLO, P.; *et al.* Influence of nutrients, submerged macrophytes and zooplankton grazing on phytoplankton biomass and diversity along a latitudinal gradient in Europe. *Hydrobiologia*, 653, 79–90, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0345-1>

PADOVESI-FONSECA, C. **Caracterização dos ecossistemas aquáticos do Cerrado.** In: Aldicir Sacriot *et al.* (Org.). Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado. Brasília: p. 415–429, 2005.

PADOVESI-FONSECA, C. **First occurrence of *Filinia longiseta* (Ehrenberg, 1834) from low-order streams in a protected area at Cerrado-Amazon boundary, central Brazil.** Brazilian Journal of Biology (online), 81: 1118–1119, 2021.

PADOVESI-FONSECA, C.; REZENDE, R.S. **Factors that drive zooplankton diversity in Neo-Tropical Savannah shallow lakes.** Acta Limnologica Brasiliensia (online), 29: e15, 2017.

PADOVESI-FONSECA, C.; MARTINS-SILVA, M.J.; PUPPIN-GONÇALVES, C.T. **Cerrado's areas as a reference analysis for aquatic conservation in Brazil.** Biodiversity Journal, 6: 805–816, 2015.

PADOVESI-FONSECA, C.; SARAIVA, M.F.; FERNANDES, C.L.S. **First record of cladocerans from the headwaters of the Cerrado-Amazon boundary, central Brazil.** Biodiversity (Nepean), 1–3, 2016.

PADOVESI-FONSECA, C.; REZENDE, R.S.; FERREIRA, D.C.; MARTINS-SILVA, M.J. **Spatial scales drive zooplankton diversity in savanna Cerrado streams.** Community Ecology, 22: 249–259, 2021.

PADOVESI-FONSECA, C.; CORRÊA, A.; LEITE, G.; JOVELI, J.C.; COSTA, L.; PEREIRA, S. **Diagnostic of ribeirão Mestre d'Armas sub-basin using two methods of rapid environmental assessment, Federal District, Central Brazil.** Revista Ambiente & Água, 5: 43–56, 2010.

PERBICHE-NEVES, G.; SERAFIM-JÚNIOR, M.; PORTINHO, J.L.; *et al.* Effect of atypical rainfall on lotic zooplankton: Comparing downstream of a reservoir and tributaries with free stretches. Journal of Tropical Ecology, 52, 149–162, 2012.

PICAPEDRA, P.H.S.; FERNANDES, C.; LANSAC-TÔHA, F.A. **Zooplankton community in the Upper Parnaíba River (Northeastern, Brazil).** Brazilian Journal of Biology, 77, 402–412, 2016. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.20215>

PINESE, O.P.; PINESE, J.F.; DEL CLARO, K. **Structure and biodiversity of zooplankton communities in freshwater habitats of a Vereda Wetland Region, Minas Gerais, Brazil.** Acta Limnologica Brasiliensia, 27, 275–288, 2015. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X0415>

REZENDE, R.S.; PETRUCIO, M.M.; GONÇALVES, J.F. **The effects of spatial scale on breakdown of leaves in a tropical watershed.** PLoS ONE, 9, e97072, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.00970>

REZENDE, R.S.; BIASI, C.; PRETUCIO, M.M.; GONÇALVES, J.F. **Effects of leaf litter traits on alpha and beta diversities of invertebrate assemblages in a tropical watershed.** Ecología Austral, 29, 365–379, 2019. <https://doi.org/10.25260/EA.19.29.3.0.750>



REZENDE, R.S.; SALES, M.A.; HURBATH, F.; ROQUE, N.; GONÇALVES, J.F.; MEDEIROS, A.O. **Effect of plant richness on the dynamics of coarse particulate organic matter in a Brazilian Savannah stream.** *Limnologica*, 63, 57–64, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.02.002>

TORRES, C.R.; PAIVA, L.O.; DURÃO, M.S.; TRINDADE, V.L.; PADOVESI-FONSECA, C. **Novas ocorrências de cladóceros em ambientes aquáticos do Brasil Central: compreendendo a biodiversidade.** *Heringeriana*, 13: 21-28, 2019.

VAN ONSEM, S.; DE BACKER, S.; TRIEST, L. **Microhabitat zooplankton relationship in extensive macrophyte vegetations of eutrophic clear-water ponds.** *Hydrobiologia*, 656, 67–81, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0442-1>

XIONG, W.; HUANG, X.; CHEN, Y.; *et al.* **Zooplankton biodiversity monitoring in polluted freshwater ecosystems: A technical review.** *Environ Sci Ecotech*, 1, 2020. 100008. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2019.100008>

## CAPÍTULO 8

### ESTUDO SOBRE A GERAÇÃO, O PROCESSO SELETIVO E O DESTINO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DO CAMPUS DE PORTO NACIONAL, UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Data de submissão: 19/10/2021

Data de aceite: 05/11/2021

**Brenda Thais Kalife de Assunção**

Bacharel em Ciência Biológicas pela  
Universidade Federal do Tocantins  
Belém - Pará

<http://lattes.cnpq.br/1140424834259610>

**RESUMO:** Conceitua-se como resíduo sólido todo e qualquer tipo de resíduo, no estado sólido e semissólido, produzido e descartado pela atividade humana de origem doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, industrial, de serviços e de varrição. A importância em se estudar os resíduos sólidos se faz pelos fatos de sua produção excessiva, acúmulo e má gestão constituírem-se em fatores que podem causar grandes impactos no ambiente natural, como a poluição dos rios e mares, comprometendo a vida dos organismos nestes ecossistemas. Neste trabalho propôs-se estudar a produção de resíduos sólidos, os processos seletivos e o destino destes, da Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Porto Nacional. Portanto, observou-se que os resíduos sólidos não são corretamente destinados visto que não há no município de Porto Nacional uma empresa (pública ou privada) que realize coleta de resíduos sólidos

recicláveis de forma ampla. São gerados em média 86,25kg de resíduos sólidos a cada quinze dias no *Campus*, a geração de resíduos per capita foi de 0,147kg por semana e 0,30 kg por dia. O processo seletivo se dava por meio das lixeiras seletoras, que demonstraram ser insuficientes em sua eficácia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Falta de gestão. Resíduo Sólido. Destinação. Per capita.

STUDY ON GENERATION, SELECTION PROCESS, AND FINAL DESTINATION OF SOLID RESIDUES FROM FEDERAL UNIVERSITY OF TOCANTINS, PORTO NACIONAL CAMPUS

**ABSTRACT:** Solid residue is defined as any kind of solid or semi-solid waste, produced and scrapped out by the human activity of domestic, hospital, commercial, agricultural, industrial, service, and sweeping origin. The importance of studying solid residues is due to the fact that their excessive production, accumulation, and mismanagement constitute factors that can cause vast impacts on the natural environment, such as the pollution of rivers and seas, compromising the organisms' life in these ecosystems. In this paper, it was proposed to study the production of solid residues, as well as their selective processes, and destination, at the Federal University of Tocantins, Porto Nacional campus. Therefore, it was observed that solid residues are not properly disposed of, since there is no company (public or private)

in Porto Nacional municipality, which collects recyclable solid residues in a broad manner. An average of 86,25 kg (189.75 pounds) of solid residues are generated every fifteen days on the campus, the per capita waste generation was 0,147 kg (0.3234 pounds) per week, and 0,30 kg (0.66 pounds) per day. The selection process happened through the selective trash cans, which demonstrated to be insufficient in their effectiveness.

**KEYWORDS:** Mismanagement. Solid residue. Destination. Per capita.

## 1 INTRODUÇÃO

A ampliação do consumo do “descartável” teve como consequência a geração em larga escala de resíduos sólidos e o surgimento de algumas questões ambientais e ecológicas. Essa excessiva produção de resíduos sólidos, vem causando problemas recentes, com impactos intensos aos ecossistemas, ocasionando a baixa qualidade da saúde dos ambientes e das pessoas, tanto no meio rural como no urbano.

Segundo a Norma NBR 10.004:2004 criada pela ABNT:

“Resíduos Sólidos diz-se de todo e qualquer tipo de resíduo, no estado sólido e semissólido, produzido e descartado pela atividade humana de origem doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, industrial, de serviços e de varrição. Na definição de resíduos sólidos, estão incluídos os lodos de estações de tratamento de água e de efluentes e os líquidos cujas características tornam inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou nos corpos de água. Os resíduos sólidos são classificados de acordo com a sua origem e composição, o que permite uma escolha mais adequada para o seu tratamento e/ou disposição final”. (ABNT, 2004, p.1)

No Brasil, o Ministério do Meio Ambiente, através do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) criaram legislações específicas sobre o tema, como por exemplo, a Resolução CONAMA n° 005, de 05 de agosto de 1993, relativa à definição de normas para tratamento de resíduos sólidos oriundos de serviço de saúde, portos e aeroportos e terminais ferroviários e rodoviários.

O principal registro da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano, a Conferência de Estocolmo na Suécia, foi a Agenda 21, que consigna o compromisso assumido pelos 179 países participantes da conferência, contendo mais de 2,5 mil recomendações de ordem prática. O documento ampliou o conceito de desenvolvimento sustentável, buscando conciliar justiça social, eficiência econômica e equilíbrio ambiental (Kohler & Philippi Jr; 2003).

Na Constituição brasileira o gerenciamento dos resíduos sólidos gerados nas cidades é de responsabilidade do poder público municipal. A Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB/2008) aponta que 61,2% das prestadoras dos serviços de manejo dos resíduos sólidos são vinculadas à administração direta do poder público.

Este serviço exerce um impacto no orçamento que pode atingir até 20% nos gastos das administrações municipais.

No ano de 2010 foi instituída a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) que, segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), contém importantes instrumentos que permitem o avanço necessário em relação ao enfrentamento de problemas ambientais e socioeconômicos decorrentes do inadequado manejo dos resíduos sólidos no Brasil (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014). Para isso, o PNRS prevê a destinação adequada de resíduos, o que inclui a reutilização, a reciclagem, a compostagem, a recuperação e o aproveitamento energético, e ainda a distribuição ordenada de rejeitos em aterros, observando normas operacionais específicas de modo a evitar danos ou riscos à saúde pública e à segurança e a minimizar os impactos ambientais diversos (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2014).

Com efeito, essa problemática de má gestão de resíduos sólidos se dá também em instâncias específicas, como os *Campi* universitários. Com a expansão desses centros de estudos em número de vagas e cursos, a geração dos resíduos sólidos tende a aumentar, dessa forma, existe uma demanda por entender os processos que ocorrem quanto a esta problemática. Pois, sendo as instituições de ensino superior exemplo de desenvolvimento do saber e da pesquisa, elas servem de influência e norteamento das ações na sociedade (RIVETTI, et al; 2012).

A problemática observada quanto aos resíduos sólidos no *campus* universitário, permitiu criar as seguintes hipóteses: i) os resíduos sólidos não são corretamente coletados na Universidade Federal do Tocantins, *campus* de Porto Nacional, pela falta de prática de coleta seletiva na comunidade acadêmica; ii) os resíduos sólidos não são corretamente destinados.

Este trabalho justifica-se pela necessidade de estudos para a real aplicação da Lei nº 12.305/10 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Estudos que possam oferecer dados a respeito da produção, seletividade e destino dos resíduos sólidos para subsidiar a aplicação da Lei em instituições públicas e privadas do município de Porto Nacional, no estado do Tocantins.

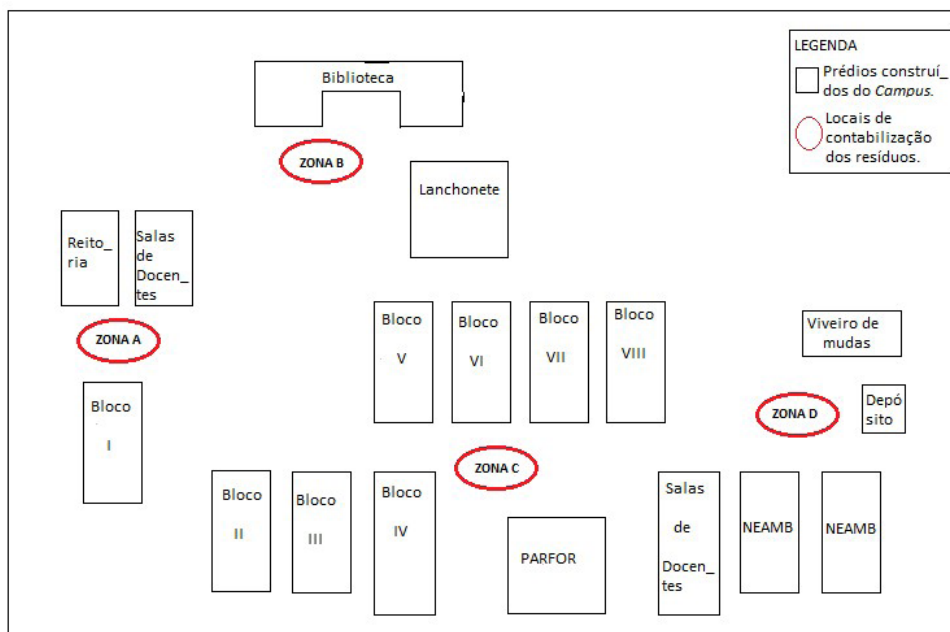
## 2 METODOLOGIA

- Área de estudo

O local escolhido para o estudo foi o *Campus* de Porto Nacional da Universidade Federal do Tocantins, que corresponde à área de 72.756m<sup>2</sup>, localizada a 60 km de Palmas, capital do estado do Tocantins. A comunidade acadêmica é composta por 4 segmentos,

a saber com seus respectivos quantitativos: Discentes mestrando e graduandos do PARFOR (Plano Nacional de Formação de Professores da Educação Básica), EAD (Educação a Distância) e presencial (1.428); docentes (87); técnicos- administrativos (43); terceirizados (55), totalizando 1.613 pessoas.

Figura 1: Representação esquemática da planta baixa da Universidade Federal do Tocantins *campus* Porto Nacional.



Primeiramente foi realizada a observação dos pontos de geração de lixo no perímetro interno, e após, o *campus* foi dividido em zonas como demonstra o esquema da figura 01, com: Zona A – Bloco I, Administrativo e Sala dos Professores; Zona B – Biblioteca; Zona C – Bloco II ao VIII, incluindo o prédio do PARFOR; Zona D – NEAMB (Núcleo de Estudos Ambientais).

- Tipo de pesquisa

Quanto ao modo de abordagem do problema, a presente pesquisa se deu de forma exploratória (de acordo com Gil, 2008) por possuir amostras com grande número de casos. Em se tratando do objetivo geral, a pesquisa é descritiva, conforme Chemin (2012), visto que esse tipo de pesquisa estuda características de grupo, tratando-se da análise do resíduo sólido gerado na UFT-Porto Nacional. Quanto aos procedimentos técnicos, de acordo com Gil (2008), esta pesquisa caracteriza-se como um estudo de campo, pois procura o aprofundamento de uma realidade específica, sendo realizada por meio da observação direta das atividades do grupo estudado.

De acordo com os procedimentos técnicos utilizados a pesquisa é do tipo *ex-post facto*. O estudo é realizado depois da ocorrência dos fatos, quando a pesquisadora observa um fenômeno já produzido numa situação e em seguida tenta encontrar as possíveis causas ou fatores que originaram esse fenômeno (LEOPARDI, 2002). A pesquisa é Longitudinal, coleta dos dados em dois ou mais momentos, havendo um acompanhamento do desenrolar do fenômeno considerado (CHEMIN, 2012).

- Amostra

O resíduo sólido foi coletado em todos os blocos do *campus*, exceto o gerado na lanchonete que não foi contabilizado, dadas às dificuldades inerentes ao processo de lida com o material em questão e por uma limitação no setor de recursos humanos. Nos cinco dias iniciais não houve amostras dos resíduos gerados nos banheiros por não terem sido coletados, estes resíduos só foram quantificados nos dez dias que seguiram de coleta.

- Coleta de dados

Como metodologia de coleta, optou-se pela caracterização quali- quantitativa, onde os resíduos sólidos foram coletados por um período de 15 dias úteis, durante o mês de dezembro do ano de 2014. A cada dia os resíduos eram acumulados em um local coberto para a seleção e então eram identificados, segregados, pesados e categorizados segundo o recomendado por Mandelli (2013) – com adaptações para os resíduos encontrados na caracterização. Após a coleta de dados os resíduos eram entregues para a destinação por parte do pessoal responsável.

Para a pesagem dos resíduos coletados foram utilizados os seguintes materiais: uma balança eletrônica de mão com capacidade de 50 kg e graduação de 10g; corda; caderno e caneta; sacos plásticos para acondicionamento dos resíduos; materiais de higienização (álcool e panos de limpeza) e Equipamentos de Proteção Individual (EPI's).

- Análise de dados

A geração de resíduos per capita foi calculada dividindo-se a média do resíduo produzido por dia, pelo número de pessoas que compõem a comunidade acadêmica. Os resíduos sólidos foram categorizados conforme Tabela 1, baseada na classificação proposta por Curc (2011) *apud* Rosales *et al.*, (2013).

Tabela 1: Categoria de classificação dos resíduos sólidos.

Resíduos Orgânicos	
Resíduos Alimentícios	Qualquer tipo de resíduo de alimento
Papel e Cartão	Papel, periódicos e revistas
Outros orgânicos	Folhas, árvore e ramas

Resíduos Inorgânicos	
Plástico	PET, sacolas, restos de plásticos
Vidro	Garrafas
Metal	Latas de alumínio e metais diversos
Não recicláveis	
Construção e Demolição	Areia, madeira e outros
Perigosos	Reativos, baterias, inseticidas, outros
Outros	Resíduos sanitário e outros

Fonte: Collage and University Recycling Council (CURC, 2011) apud Rosales, et al. (2013).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resíduos são coletados diariamente, nos turnos da manhã e tarde, realizados pelo grupo da empresa terceirizada responsável pelos serviços de limpeza do *Campus*. Após a coleta os funcionários levam os resíduos para uma lixeira localizada no lado externo do *Campus* universitário, de onde são recolhidos pelos funcionários da prefeitura através de caminhões basculantes numa periodicidade de dois em dois dias, e daí são encaminhados para a área de “lixão” da cidade.

Na PNSB, a Região Norte apresenta um contingente maior de municípios com este serviço gerenciado pelo poder público, já a Região Sul destaca-se pelo número de entidades privadas atuando no setor. A Região Sul do Brasil registra a menor proporção de destinação dos resíduos sólidos aos lixões, destacando o Estado de Santa Catarina, onde 87% dos resíduos gerados são destinados a aterros sanitários e controlados. As Regiões Norte e Nordeste registraram as maiores proporções de destinação de resíduos em lixões com 85% e 89% respectivamente. Na região Norte o Estado do Pará se destaca com 94% dos resíduos destinados a lixões (PNSB, 2008).

Segundo Rufo e Picanço (2005) o município de Porto Nacional – TO produz aproximadamente 30 toneladas de resíduos sólidos por dia, que são recolhidos em caminhões basculantes ou compactadores, sem nenhum tipo de separação. O resíduo hospitalar não recebe a devida destinação sendo disposto juntamente com o resíduo de origem doméstica, comercial e industrial desde o seu recolhimento até o destino final. Portanto, se faz necessária a produção de trabalhos na área para dispor de dados que colaborem com o processo de implantação adequada de aterro sanitário, bem como o processo de seleção, reutilização, reciclagem e disposição final dos resíduos.

Das quatro zonas delineadas pela presente pesquisa observou-se que há distribuição de lixeiras seletoras em três delas, exceto na Zona D. No entanto, a eficiência destas lixeiras em selecionar os resíduos conforme categoria não foi constatada durante

a coleta, ou seja, as lixeiras seletoras não são o suficiente para adotar medidas de segregação do resíduo gerado no *Campus*, elas devem vir acompanhadas de ações que provoquem e estimulem a consciência ambiental.

Considerando-se as três semanas utilizadas para amostragem, verifica-se que no *Campus* foram produzidos cerca de 238 kg de resíduos sólidos, como demonstra a Tabela 2. A média do que é gerado por dia é de 47,5 kg o que, de acordo com o total da comunidade acadêmica de 1.613 pessoas, teremos uma geração de 0,30 kg *per capita*.

Tabela 2: Quantitativo de resíduo sólido coletado por dia, semana e quinzena.

SEMANA/DIA	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	TOTAL
1° (S/WC)	5,81	12,72	19,30	16,23	11,10	65,15
2° (C/WC)	14,96	14,40	21,26	23,88	10,00	84,55
3° (C/WC)	21,19	17,54	13,62	23,94	11,68	87,96
TOTAL	41,95	44,63	54,23	64,07	32,78	237,66

Analisando a Tabela 2, observa-se que na primeira semana de coleta, onde não houve amostras dos resíduos dos banheiros (S/WC), foi quantificado um total de 65 kg, correspondendo a 27% do recolhido nas três semanas. A segunda e a terceira semanas com amostras dos resíduos dos banheiros (C/WC) apresentaram um percentual de 36% e 37% respectivamente, do valor total coletado nos quinze dias, e a média de geração de resíduos sólidos apresentado nestas duas semanas foi de 86 kg e a média nas três semanas foi de 79 kg. Os resíduos dos banheiros representam cerca de 20% do volume total gerado nas duas semanas.

A partir dos dados apresentados na Tabela 2, é possível inferir que o dia de maior coleta de resíduos sólidos no *Campus* universitário de Porto Nacional foi quinta-feira, seguida da quarta-feira e terça-feira, sendo estes os dias com maior concentração de estudantes no local. A média diária dos resíduos sólidos gerados, que inclui dos banheiros, é de 32,44 kg. Levando em consideração que o calendário acadêmico é composto por 190 dias letivos, referente à um ano, pode-se supor que o *Campus* da UFT- Porto Nacional gera um quantitativo de 6.163,9 kg anualmente.

As principais categorias de resíduos sólidos encontrados nas amostras, conforme apresenta a Tabela 3, foi o resíduo orgânico, seguido do Inorgânico e, o Não Reciclável foi o que obteve a menor representatividade. Estes resultados estão em consonância com os encontrados em estudo realizado no Instituto Tecnológico de Tepic, México (Rosales, et al; 2013) o qual foi realizado em um ambiente acadêmico com uma metodologia similar ao do presente estudo, dividindo-se o instituto em duas zonas: Zona A: 54% (Orgânico); 39% (Inorgânico); 7% (Não recicláveis) e a Zona B: 56% (Orgânico); 25% (Inorgânico);



19% (Não recicláveis). Ainda de acordo com a Tabela 3, a zona que obteve o maior volume total de resíduo foi a Zona C, seguida das Zonas A e D; a Zona B foi a que apresentou o menor volume do total recolhido.

Tabela 3: Total de resíduos sólidos recolhido por zona e categoria.

Categoria/ Zona	A	B	C	D	TOTAL
Orgânico	61,51	4,74	54,74	16,97	137,96
Inorgânico	23,92	2,64	27,45	3,75	57,76
Não reciclável	12,56	3,11	22,94	3,33	14,94
TOTAL	97,99	10,49	105,13	24,05	237,66

A divisão do *Campus* universitário em zonas teve como objetivo obter resultados da geração de resíduos sólidos nesses espaços isolados. De maneira a provocar reflexões quanto ao que se pode fazer em termos de educação ambiental para minimizar a geração e evitar desperdícios a partir das características de cada área, bem como o reaproveitamento de recursos, como o resíduo orgânico útil no processo de compostagem.

Os resíduos sólidos gerados no *Campus* de Porto Nacional, da Universidade Federal do Tocantins não são corretamente coletados, inferindo-se como causa a falta de prática de coleta seletiva na comunidade acadêmica. Os resíduos também não são corretamente destinados visto que não há no município de Porto Nacional uma empresa (pública ou privada) que realize coleta de resíduos sólidos recicláveis de forma ampla.

A Zona C (Bloco II ao VIII e Prédio PARFOR) apresentou a maior geração de resíduos sólidos e a Zona B (Biblioteca) apresentou a menor, este resultado era esperado já que a Zona C possuía a maior área e a Zona B, a menor. As lixeiras seletoras demonstraram não ser o suficiente para a separação do lixo no ato do descarte, tendo visto, durante a coleta, a frequente mistura de resíduos nas mesmas.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo da pesquisa aqui apresentada foi a realização de um estudo sobre a geração de resíduos sólidos, dos processos seletivos e do destino destes, da Universidade Federal do Tocantins, de forma que os resultados podem contribuir potencialmente para a implantação de ações de educação ambiental no *Campus* de Porto Nacional.

Sugerimos como possíveis objetivos futuros, o estabelecimento de uma cultura de coleta seletiva eficaz e capaz de possibilitar a compreensão acerca da importância do seu desenvolvimento, do seu processo e do seu reflexo na saúde ambiental, assim como na limpeza visual do *Campus* proporcionando um ambiente saudável e esteticamente

agradável, o que provoca a harmonização sócio espacial e a diminuição dos focos de dengue, leishmaniose e de nichos de animais peçonhentos.

Se por um lado existem preocupações mundiais acerca do meio ambiente, ocorrem grandes falhas e descaso no que diz respeito à gestão dos resíduos sólidos no Brasil. Como postula Blumenschein (2004), faz-se necessária a busca de soluções para o problema da disposição, como o fortalecimento do processo de reciclagem e a reutilização dos produtos. O mau gerenciamento desses produtos contribui para o esgotamento das áreas de disposição final do lixo urbano, custos adicionais do governo e desperdício dos recursos naturais não renováveis.

## REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Classificação de resíduos sólidos**: NBR 10.004. Rio de Janeiro, 2ª Ed. 2004.

BLUMENSCHN, R.N. **A sustentabilidade na cadeia produtiva da indústria da construção**. 2004 249f. Tese (Doutorado). Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF.

CÂMARA DOS DEPUTADOS. **Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento: Agenda 21**. Brasília: Coordenação de Publicações, Disponível em: (<http://bd.camara.gov.br/bd/handle/bdcamara/7706>). Acesso em: 25 Jan. 2014.

CHEMIN, B.F. **Manual da Univates para trabalhos acadêmicos**: planejamento, elaboração e apresentação, 2. ed. Lajeado: Univate, 2012.

GIL, A.C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. Ed. São Paulo: Atlas, 2008.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB/2008)**. Rio de Janeiro, 2010.

KOHLER, M.C.M.; PHILIPPI JR., A. Agenda 21 como instrumento para a Gestão Ambiental. **Educação Ambiental e Sustentabilidade**. 2003.

LEOPARDI, M.T.; BECK, C.L.C.; NIETSCH, E.A. **Metodologia de pesquisa na saúde**. Florianópolis: UFSC, 2002.

MANDELLI, S.M.C. **Variáveis que interferem no comportamento da população urbana no manejo de resíduos sólidos domésticos no âmbito das residências**. 267f. Tese (Doutorado em Educação) – Área de Metodologia do Ensino, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Política Nacional de resíduos Sólidos**. Disponível em: (<http://www.mma.gov.br/politica-de-residuos-solidos>). Acesso em: 20 Jan. 2014.

RIVETTI, L. V.; SIMONATO, D. C.; COSTA, S.O.; FIGUEIREDO, R. A. Análise documental e de percepção acerca da gestão de resíduos em um campus universitário (SP, Brasil). Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, Aquidabã, v.3, n.1, p.98-111, 2012.

ROSALES-FLORESM, SALDAÑA-DURÁN C, TOLEDO-RAMÍREZ V, MALDONADO L. **Caracterización y potencial del reciclado de los residuos sólidos urbanos generados en el Instituto Tecnológico de Tepic, una institución de educación superior**. Revista Biociências 2013; 2(3): 216-223.

RUFO, R.C.; PICANÇO, A.P. Avaliação de impactos ambientais e proposta de remediação do lixão do município de Porto Nacional- To. **In:** XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Campo Grande, 18-23 Set. 2005.

# CAPÍTULO 9

## TRATAMIENTO BIOLÓGICO EM EFLUENTES DE ÁGUA PARA USINAGEM DE OLIVEIRA

Data de submissão: 30/09/2021

Data de aceite: 14/10/2021

### **Mariela Beatriz Maldonado**

CONICET  
Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
Departamento de Ingeniería Química  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0002-4188-8005

### **Emiliano Gabriel Fornasin**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
Departamento de Ingeniería Química  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0001-9197-1977

### **Leonel Lisanti**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
Departamento de Ingeniería Química  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0002-8623-4953

### **Ariel Marquez**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
Departamento de Ingeniería Química  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0003-2330-7905

### **Walter Pirán**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
Departamento de Ingeniería Química  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0002-6172-2475

### **Noemi Graciela Maldonado**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
CeReDeTeC  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0001-6997-8080

### **Pablo Enrique Martín**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
CeReDeTeC  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0001-9264-6228

### **Daniela Adriana Barrera**

Universidad Tecnológica Nacional  
Facultad Regional Mendoza  
CeReDeTeC  
Mendoza – Argentina  
ORCID 0000-0003-4907-4281

**RESUMEN:** Objetivos: Los efluentes de la industria aceitunera son altamente contaminantes. Estos tienen altos valores de carga orgánica, así como demanda biológica y química de oxígeno, salinidad, y otras, que superan las normativas vigentes. El objetivo

de este trabajo fue el de lograr, a través de biorremediación con microorganismos nativos, la reducción de la contaminación del efluente para su posible uso en mezcla y curado de morteros y hormigones especiales. Métodos: La biorremediación se logró complementando el efluente con una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo en una proporción aproximada de 100: 5: 1, en condiciones aeróbicas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante un período de 7 a 14 días. Resultados: Los microorganismos nativos lograron por bioestimulación una reducción aproximada del 25-80% de los parámetros específicos e indicadores de contaminación como  $\text{DBO}_5$ , DQO y conductividad, transformando el efluente en un líquido menos contaminado. Durante el ensayo se verificó la existencia de microorganismos viables que consumieron rápidamente la fuente de carbono y luego posiblemente otra materia orgánica más compleja, siendo los mismos responsables de la reducción de contaminantes. Conclusión: La flora nativa logró la reducción de la contaminación original del efluente de “aceitunas mecanizadas” por bioestimulación, transformándolo en un líquido menos contaminado que podría ser utilizado para otros usos como la elaboración de hormigón, mezclas y curado de morteros.

**PALABRAS CLAVES:** Aguas de maquinado de aceitunas. Biorremediación. Microorganismos Nativos. Incorporación de efluentes.

## BIOLOGICAL TREATMENT OF OLIVE MACHINING WATER EFFLUENTS

**ABSTRACT:** Purpose Effluents from machined olive waters are highly polluting. These have high organic load values such as the biological demand of oxygen and the chemical demand of oxygen, salinity, and others, which far exceed current regulations. The objective of this work was to achieve, through bioremediation by native microorganisms, the reduction of effluent contamination in order to possible use in mixing and curing of mortars and special concretes. Methods: Bioremediation was achieved by supplementing the effluent with a source of carbon, nitrogen, and phosphorus in the approximate ratio 100: 5: 1, under aerobic conditions at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for a period of 7 to 14 days. Results: The native microorganisms achieved by biostimulation an approximate reduction of 25-80% of the specific parameters and pollution indicators such as  $\text{BOD}_5$ , COD and Conductivity, transforming the effluent into a less contaminated liquid that can be used for other reuses or destinations. During the test, the existence of viable microorganisms was verified that quickly consumed the carbon source and then possibly other more complex organic matter, being the same ones responsible for the reduction of pollutants. Conclusion: The native flora achieved the reduction of the original contamination of the effluent from “mechanized olives” by biostimulation, transforming it into a less contaminated liquid that could be used for other uses such as the preparation of concrete, mixtures and curing of mortars.

**KEYWORDS:** Machined Olive Waters. Bio-remediation. Native Microorganisms. Effluent Insertion.

## 1 INTRODUCCIÓN

El Consejo Oleícola Internacional (2019) en su campaña de aceitunas de mesa, de septiembre de 2017 a agosto de 2018, señaló que la producción mundial fue de 3.284

mil toneladas, donde la Unión Europea se colocó a la cabeza con una producción de 912 mil toneladas, seguida de Egipto, Turquía y Argelia con 750, 450 y 303,5 mil toneladas respectivamente. Argentina ocupó el sexto lugar con una producción de 106 mil toneladas. Los datos provisionales para la campaña 2018/2019 no fueron alentadores, se estimó una caída del 22% en la producción mundial de aceituna de mesa y una del 25% para Argentina. Sin embargo, para la campaña 2019/2020 se proyectó un incremento en la producción mundial del 14% respecto a la campaña anterior y del 25% para Argentina.

No obstante, el rubro de aceitunas maquinadas tales como: picadas, rebanadas y/o descarozadas para aceitunas rellenas y pasta; representa aproximadamente el 60% de las aceitunas de mesa. Estas, al tener una textura delicada requiere aún para su transporte agua potable o salmuera en todas las etapas del proceso. Por esto, para este proceso de mecanización, se invierte de un litro a un litro y medio de agua por kg de aceituna. Por tanto, estaríamos ante una media de 64.000 L de efluente, cuyo volumen depende de la producción y la eficacia de la fábrica. Este, es un efluente con características de emulsión debido a la cantidad de grasa y sólidos en suspensión que transporta el agua.

Del análisis general se puede decir que es ácido (pH 4.8 a 5.49) con alta conductividad eléctrica (25.000 uS / cm), DBO<sub>5</sub> superior a 10.000 mg O<sub>2</sub> / L, DQO de aproximadamente 20.000 O<sub>2</sub> / L.

El crecimiento de la industria aceitunera no solo influye en el medio ambiente a través de su producción, sino que también lo modifica a través de la gran generación de efluentes que, si no se tratan correctamente, lo contaminan. Este es un gran problema junto con el cambio climático que afecta la disponibilidad de agua potable. Aproximadamente entre 10 y 30 millones de litros de efluentes se generan cada año a partir de la producción de aceite de oliva (McNamara et al. 2008) y volúmenes semejantes se producen en la industria de conservas de aceitunas de mesa (Borgo, 2013).

Como resultado de la contaminación y el cambio climático, hoy, dos tercios de la población mundial vive en regiones donde el agua es escasa durante al menos un mes al año. Unos 500 millones de personas viven en áreas donde el consumo de agua excede los recursos hídricos renovables localmente en una proporción de dos a uno. Las áreas altamente vulnerables, aquellas donde los recursos no renovables (como las aguas subterráneas fósiles) continúan agotándose, se han vuelto muy dependientes de las transferencias de áreas con abundantes recursos hídricos y buscan constantemente fuentes económicas alternativas (UNESCO, 2017).

La política medioambiental actual favorece los protocolos que incluyen la recuperación de residuos. Esto hace que los tratamientos biológicos sean de especial importancia. Por tanto, la investigación sobre diferentes tipos de biodegradación

de las fuentes de la industria olivícola y de los residuos de las almazaras, son todos requeridos actualmente junto con el desarrollo de nuevas tecnologías y / o estrategias de biorremediación, así como la valorización de la biotecnología microbiana (Morillo et al., 2009).

Por otro lado, la economía circular es un paradigma que busca modificar la forma en que producimos y consumimos. Frente a una economía lineal de extracción, producción, consumo y desperdicio, la economía circular fomenta un flujo constante, tal solución virtuosa, en la que los desperdicios pueden ser utilizados como recursos para reingresar al sistema productivo. De esta forma, se reducen nuestros residuos y se extraen menos recursos naturales del planeta. Para Arroyo Morocho (2018) la economía circular es un modelo de negocio que se basa en el reciclaje, reutilización y reducción de los recursos naturales, contrario a lo que ocurrió desde la revolución industrial, donde las empresas han creado multitud de productos, que promueven el consumo y generan residuos destinados a la contaminación ambiental sin tratamiento.

En este contexto, la biorremediación es un proceso que utiliza las capacidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes en ecosistemas terrestres y acuáticos con un gran potencial para mitigar la contaminación ambiental. La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y la versatilidad metabólica que caracterizan a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos, o en su defecto, menos tóxicos, que luego pueden integrarse en ciclos biogeoquímicos naturales (Garbisu et al., 2002). La biorremediación ha demostrado ser una alternativa para establecer nuevos sistemas de tratamiento de aguas residuales y optimizar los sistemas convencionales (Chen et al. 2015).

Por lo tanto, se busca la bioconversión de efluentes y residuos de la industria aceitunera en productos de alto valor añadido. Tal es el caso, que han surgido la producción de enzimas, biopolímeros, biocombustibles (biocombustible y biogás), compost, biomasa de diferentes fuentes como subproductos del tratamiento de efluentes de la industria olivícola. (Morillo et al., 2009).

Considerando la situación actual y los desafíos que enfrenta el cambio climático, es necesario pensar y actuar de manera colaborativa, con creatividad y ambición, para lograr un hormigón más sostenible en la industria de la construcción, dado que su elaboración requiere el uso de agua. La cadena de valor de la industria alimentaria es un área desafiante para el tema, difundiendo las mejores prácticas disponibles y los últimos avances en tecnología e innovación, que sirven de inspiración y promueven nuevos desafíos para los actores locales (TC 291-AMC, 2018; Guzmán et al, 2019). La industria aceitunera puede convertirse en un ejemplo de reciclaje para lograr la sostenibilidad en una economía circular.



Es muy importante acercarse a los profesionales y funcionarios a una visión actual y futura para mejorar el desempeño de ambas industrias (Abaza, 2007; Morillo et al., 2009, Barreca & Fichera, 2013), donde la información técnica del potencial de los materiales reciclables debe ser validada mediante investigación para usar en la construcción y sus aplicaciones. En este caso, como primer paso, se ha buscado estudiar cómo impacta la bioestimulación de microorganismos nativos del efluente de aguas de maquinado aceitunero.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Para la caracterización del efluente utilizado en el ensayo se tomó una muestra de tres litros después de agitar para realizar los siguientes análisis según APHA (1992): pH, temperatura, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, DQO, DBO<sub>5</sub>, nitratos amoniacales, nitrógeno, fosfatos, sedimentos sólidos a los 10 min y 2 horas, sólidos solubles totales, sólidos suspendidos fijos, sólidos solubles volátiles, cloruros, sulfatos, sodio, potasio, alcalinidad total, carbonatos totales y polifenoles totales.

### 2.2 ENSAYO DE BIOESTIMULACIÓN

Se vertió medio litro de efluente de aguas de maquinado de aceitunas en cinco erlenmeyers de un litro de capacidad. A los mismos se los bioestimuló con una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo en una proporción de aproximadamente 100: 5: 1. A cada erlenmeyer se le añadieron los siguientes compuestos: 10 g / L de glucosa y 2 g / L en forma de las siguientes sales: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, TRIPLE 15®. El efluente también se complementó con Mg agregando 1 g / L de Mg CL<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub>. Luego, cada erlenmeyer se colocó en un agitador Dragon Lab a 220 rpm para la incorporación de aire durante el experimento generando condiciones de aerobiosis a temperatura ambiente (25 ± 1 ° C) por un período de 7 a 14 días.

Se monitoreó la evolución de diferentes indicadores de contaminación a lo largo del tiempo: DBO<sub>5</sub> y DQO según el método normalizado (APHA 1992); conductividad eléctrica (APHA 1992), pH por electrodo (APHA 1992), azúcares reductores totales por el método DNS (Miller 1959) y polifenoles totales según la técnica de Folin-Ciocalteu por espectrofotometría (APHA 1992).

### 2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

El número total de bacterias se determinó por recuento en placa de agar Plate Count Marca Britania, el número total de hongos y levaduras en agar papa glucosado

marca Britania mediante recuento total y los bacilos gramnegativos entéricos en agar eosina azul de metileno (Britania). Todos los medios fueron diluidos con agua destilada y efluente en una proporción de 35 %, 50% y 100%. Luego, se aislaron los microorganismos más representativos, hasta lograr los cultivos axénicos mediante la técnica de estrías en superficie de agar, preparando el medio de cultivo con agua destilada y efluente al 35, 50 y 100% para seleccionar los microorganismos viables y resistentes al efluente.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contaminación del agua y los temas relacionados a ella se encuentran regulados por la Resolución N° 778/96 de la Provincia de Mendoza (23/12/1996) y sus modificaciones (Resolución N° 627/00), que establecen los parámetros que deben tener vertidos industriales y de aguas residuales para reutilización agrícola. La resolución se basa en el principio regulado que pregona “El que contamina paga” (del art. 59). En consecuencia, todos los establecimientos que viertan efluentes al dominio público hidráulico deben obtener la correspondiente autorización administrativa y deben contar con un sistema de tratamiento de efluentes adecuado para cumplir con los requisitos técnicos previstos en la legislación vigente. La autorización mencionada es el “Permiso de Vertido” y es otorgada por la Superintendencia de la Dirección General de Irrigación (DGI). Si los establecimientos no cumplen con los requisitos necesarios para obtener dicho permiso, deberán suscribir un “Contrato de Gestión de Permisos de Descarga”, mediante el cual se les otorga un plazo para ajustar la calidad de sus efluentes y mejorar sus sistemas de tratamiento.

En la Tabla 1 se presentan los resultados característicos de los parámetros del efluente más importantes contemplados por la legislación local de aguas y su clasificación en tolerados, permitidos, prohibidos y no cumplidos, según la cuantificación del parámetro para posibilitar su vertido al canal público.

Tabla 1. Composición inicial de los efluentes.

Variable	Promedio	Unidad	Resolución N° 778
pH	6,2	-	Tolerado
Temperatura	25	°C	Permitido
Conductividad eléctrica	0,37	dS/cm	Prohibido
Oxígeno disuelto	0,29	mg/l	No cumple
DQO	13.575	mg/l	Prohibido
DBO <sub>5</sub>	15.500	mg/l	Prohibido
Nitratos	0,38	mg/l	Permitido

Variable	Promedio	Unidad	Resolución N° 778
Nitrógeno amoniacal	6,19	mg/l	Prohibido
Fosfatos	7,74	mg/l	Prohibido
Sólidos sedimentables 10 min	2,875	mg/l	Prohibido
Sólidos sedimentables 2 horas	4,75	mg/l	Prohibido
Sólidos solubles totales	9.878,86	mg/l	Prohibido
Sólidos suspendidos fijos	162,14	mg/l	Prohibido
Sólidos solubles	9.716,72	mg/l	Prohibido
Cloruros	5.575	mg/l	Prohibido
Sulfatos	137	mg/l	Permitido
Sodio	3.098,2	mg/l	Prohibido
Potasio	1.271,8	mg/l	No cumple
Alcalinidad total	510,6	mg/l	No cumple
Carbonatos totales	22.34	meq/l CaCO <sub>3</sub>	No cumple
Polifenoles totales	1.55	mg ácido gálico/l	Prohibido

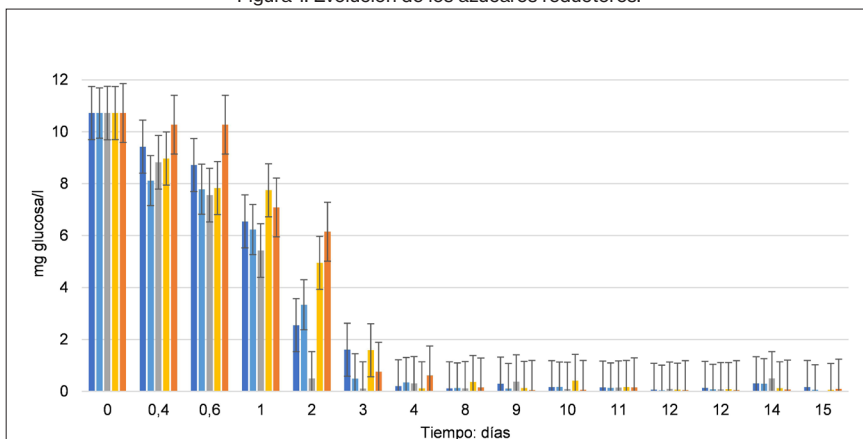
En la Tabla 2 se observa que la DQO presentó inicialmente un valor elevado de 13.575 mgO<sub>2</sub>/L y luego del tratamiento se redujo a 1.240 mgO<sub>2</sub>/L a los catorce días. La efectividad de los microorganismos se demuestra en la disminución prácticamente exponencial de la curva DQO hasta el séptimo día y luego la misma, siguió variando muy levemente para finalmente volverse casi asintótica con el eje x, con lo que la tasa de disminución de contaminante fue de 100 a 0,1 % el día. 14. Este parámetro disminuyó la contaminación en casi dos órdenes de magnitud. Por la Resolución 778, para permitir el uso público, el valor de la DQO, debe ser inferior a 250 mg O<sub>2</sub>/L. Por otro lado, la disminución de la DQO fue consistente con una reducción del 90% en la DBO<sub>5</sub> registrada por las muestras, que disminuyó de un promedio de 15.500 mg O<sub>2</sub>/L a 1.500 O<sub>2</sub>/L. Este valor es mayor al indicado en la legislación: Resolución 778, para permitir el uso público, debe ser de 120 mg O /L. No obstante, la normativa de hormigones no establece restricciones al respecto por lo que se estima podría usarse para la elaboración de los mismos.

Tabla 2: Evolución de la demanda química de oxígeno.

Muestra	DQO Inicial	DQO Final	% de disminución
1	13575	1240	91%
2	13575	960	93%
3	13575	1570	89%
4	13575	1680	88%
5	13575	172	99%

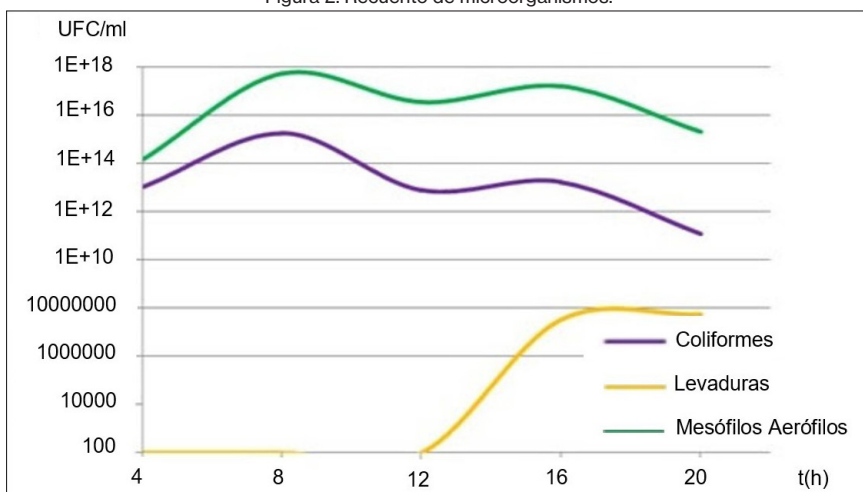
Por su parte otros autores han logrado resultados muy promisorios complementando la biodegradación con la reacción de Fenton para lograr una mayor eficiencia Lucas y Pérez (2009). También, la biorremediación ha sido más eficaz que la biodegradación aeróbica y la desintoxicación de aguas residuales utilizadas por Fadil et al. (2003). Los autores lograron remociones de DQO del 55.0%, 52.5% y 62.8% en aguas residuales fermentadas con hongos y levaduras respectivamente. La eficiencia en términos de biodegradación también es multicausal si se toman otros ejemplos. Por ello, a pesar de que en los últimos años se ha reconocido el tratamiento biológico de estos efluentes, numerosos investigadores han propuesto métodos mixtos mediante el uso de tratamientos químicos y biológicos con el fin de evitar la muerte de microorganismos degradantes (Kyriacou et al., 2005). Para comparar Fadil et al. (2003) estudiaron un efluente con 124 g O<sub>2</sub>/L de DQO, pH 5.2, sólidos totales (g = l) 92.4, sólidos volátiles (g = l) 86.2, sólidos minerales (g = l) 6, 2 amoníaco (g = l) 0,15 azúcares reductores (g = l) y 12,8 y compuestos fenólicos totales (g ácido tánico = l) 8,2 pero estos son Olives Mills Waters (OMW) su composición diferente a la del efluente estudiado. Por un lado, el efluente en estudio es similar sólo en sólidos totales de este último estudio nombrado, pero la mayoría de los demás parámetros son diferentes. En el presente trabajo se utilizó la bioestimulación de microorganismos nativos viables. En general, estas últimas condiciones son más efectivas que los microorganismos aclimatados. Pero otros estudios también han reportado muy buenas tasas de degradación como García García et al. (2000). Estos autores lograron una reducción de DQO del 73% y una reducción de fenol del 76% utilizando *Aspergillus Niger*, una reducción de DQO del 75% y una reducción de fenol del 92% en Olives Mill Waste Waters (OMWW), utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. En resumen, la efectividad de usar microorganismos nativos es que generalmente tienen la fuerza enzimática necesaria para degradar el ambiente en el que viven. Esta es una solución gratuita que ofrece la naturaleza. Este resultado es importante porque utiliza solo los microorganismos nativos, en comparación con Kyriacou et al. (2005) que estudiaron la biorremediación combinada, oxidación avanzada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y electrocoagulación de las aguas residuales del procesamiento de aceitunas verdes. Los mismos, obtuvieron resultados prometedores con *Aspergillus niger* logrando una reducción de DQO de aproximadamente 66-86%. Además, con la coagulación eléctrica finalmente se logró un 98% de reducción. También fue consistente con la reducción de azúcares reductores que se utilizó como indicador indirecto de la actividad microbiana que se muestra en la Figura 1, ya que es la primera fuente de carbono aparentemente consumida por los microorganismos en su fase de crecimiento exponencial.

Figura 1. Evolución de los azúcares reductores.



La Figura 1 muestra la disminución de azúcares reductores. La disminución en el tiempo fue muy rápida hasta que se volvieron prácticamente indetectables en cantidad. Al cuarto día no quedaron más azúcares reductores dado a que los microorganismos nativos los usaron como fuente de carbono simple y rápida. Esto es consistente con la disminución de la DQO (ver Tabla 2), que en el día cuatro está en declive exponencial completo para volverse prácticamente asintótica en el día siete. Este comportamiento probablemente podría deberse a que los microorganismos, que crecieron entre las primeras 24 horas y las 72 horas, lo habrían hecho a expensas del consumo de azúcares reductores, que son los más fáciles de degradar y luego continúan creciendo a expensas de otras fuentes de carbono complejo. También fue encontrado un comportamiento similar por Laconi et al. (2007) en aguas residuales de almazara también en condiciones aeróbicas.

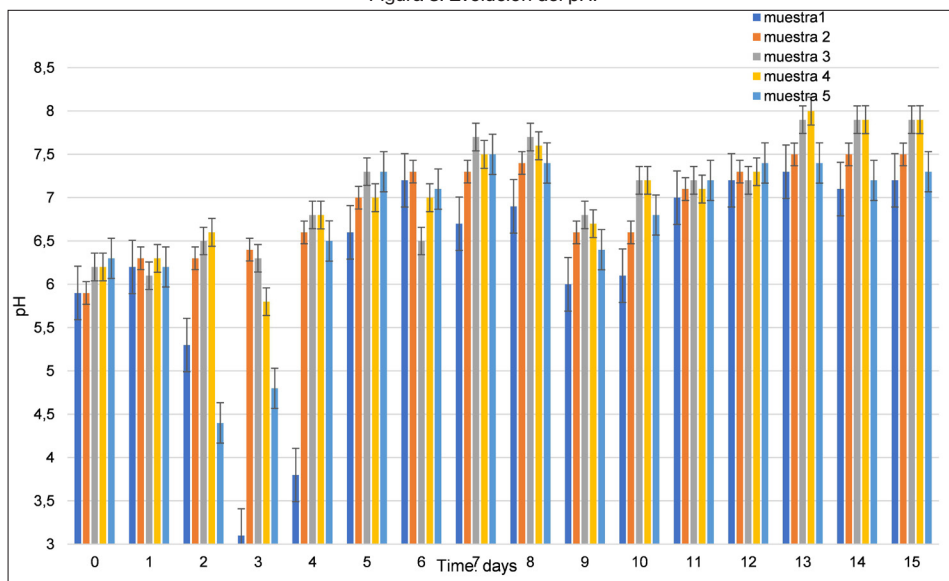
Figura 2. Recuento de microorganismos.



La Figura 2 muestra el crecimiento de microorganismos viables. En esta se puede verificar el crecimiento de tres importantes grupos poblacionales: aerobios mesófilos, coliformes y levaduras. Se evidenció el comienzo de la actividad metabólica a las 4 horas de transcurrido el ensayo para los aerobios mesófilos. Es probable que hasta ese momento los microorganismos permanecieran en fase de latencia. El patrón de la curva para los coliformes se asemejó al de aerobios mesofílicos, donde a las 8 horas se observó un máximo en el crecimiento microbiano, luego comenzó una fase de muerte celular, a las 12 horas comenzó un nuevo crecimiento, aunque a un ritmo menor, para luego entrar en una nueva fase de muerte a partir de  $t=16$ . Las levaduras estuvieron presentes en la última fase del proceso de fermentación. Estas aparecieron a partir de las 12 horas, aparentemente habiendo estado en latencia hasta ese momento.

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento de microorganismos en general fue mayor mientras existía una mayor cantidad de materia orgánica en el sistema (DQO) y específicamente acompañado de la presencia de azúcares reductores. Sin embargo, siempre hubo crecimiento de microorganismos nativos viables. Esto indica que estuvieron presentes durante todo el proceso, pero posiblemente su tasa metabólica se redujo por falta de fuente de carbono, por lo que llegó al final del proceso mostrando un comportamiento asintótico en los diferentes parámetros seguidos para visualizar su comportamiento.

Figura 3. Evolución del pH.



La evolución del pH se puede observar en la Figura 3. La evolución del pH fue diferente para cada erlenmeyer con efluente, aunque se utilizó el mismo efluente en

todos ellos. Cada uno se comportó como un biorreactor individual, aunque hubo algunas similitudes a considerar. Al principio, el primer día, parece haber un ligero cambio en el pH de las repeticiones. Al segundo día, el pH muestra un pequeño aumento en tres de los matraces erlenmeyer (2, 3 y 4). Este comportamiento ocurrió principalmente durante las primeras 24 horas. Este cambio posiblemente podría interpretarse debido al crecimiento microbiano que transformó el medio. Probablemente, el nitrógeno inorgánico existente en la muestra lo utilizan para generar proteínas básicas y proteínas de constitución de la membrana celular (Nelson; Cox, 2005). En técnicas de bioestimulación y bioaumentación estudiadas por otros autores se utilizaron también fertilizantes comerciales con contenido de N y P para garantizar el óptimo nutricional del proceso metabólico bacteriano (Duke et al. 2000; García et al. 2007; Sanscartier et al. 2009). En este trabajo, la cantidad de glucosa, nitrógeno y fósforo se agregó mediante la adición de fertilizantes para alcanzar la proporción de 100: 5: 1 como sugieren (Nannipieri et al., 2017) para promover el crecimiento microbiano.

Por otro lado, las muestras 1 y 5 presentaron una disminución del pH entre el día 2 y 3, posiblemente debido a la producción de ácidos liberados por la respiración aeróbica de azúcares por el ciclo de los ácidos cítrico (Nelson et al. 2005). Los azúcares reductores se respiraron casi por completo a las 100 horas como se muestra en la Figura 2. De hecho, si se observa la Figura 3 entre los días 2 y 4 hay crecimiento de microorganismos (coliformes y aerobios mesófilos). Por otro lado, las levaduras crecieron a partir del día 6 donde el pH estuvo cerca del valor 6. La disminución del pH también ha sido reportada por otros autores en respiración aeróbica similar (Flamarique et al., 2016). Esto también es consistente con lo encontrado por Barrera y Mejías (2018), quienes mostraron que los procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales, mantuvieron el pH entre 4 y 9,1, con una mediana de 7,1 como el pH óptimo para el desarrollo de microorganismos.

Esta disminución del pH es consistente, también, con los cambios organolépticos que se registraron. Los cambios de color observados en el efluente opalescente mostraron cómo se desarrollaron y multiplicaron los microorganismos. La actividad microbiana fue consistente con las variaciones de pH que se observaron en cada muestra, comprobando que el aumento de masa microbiana y productos del tratamiento aeróbico elevó casi dos puntos de pH hacia el décimo día. La actividad microbiana y su respiración fueron consistentes con la disminución de la demanda química de oxígeno. Probablemente podría indicar el consumo de otros productos orgánicos más complejos que la glucosa añadida en las muestras tratadas.



La Tabla 3 muestra la evolución de la conductividad eléctrica. La conductividad inicial de las muestras 1, 2 y 3 fue inicialmente mayor que la de las muestras 4 y 5, posiblemente debido a la matriz compleja tratada. Sin embargo, durante el tratamiento, se observó una disminución de la conductividad promedio del 35%. Las causas de las cuales se estudiarán en detalle en un trabajo futuro. Es interesante analizar esto, ya que no se conoce ni se comprende el mecanismo por el cual se produjo la disminución de la conductividad eléctrica. Esto podría ser causado por cualquiera de los microorganismos seleccionados o por su trabajo sinérgico.

Tabla 3: Evolución de la conductividad eléctrica (EC).

Muestra	Conductividad inicial	Conductividad final	% de disminución
1	41.735,4	25581,6	39%
2	35.136,8	26638,8	24%
3	42.500,8	25469,4	40%
4	42.234,4	25132,8	40%
5	33.792,0	23632,0	30%

## 4 CONCLUSIONES

Se ha logrado reducir los parámetros fundamentales de los indicadores de contaminación de un efluente debido a la acción de microorganismos biorremediadores obtenidos de efluentes nativos viables. Estos parámetros como DQO y DBO<sub>5</sub> disminuyeron aproximadamente un 90% y la conductividad un 35% en promedio. Se verificó la presencia de microorganismos nativos viables que consumieron los azúcares reductores hasta dejar trazas de azúcares. Es posible que posteriormente el crecimiento de los mismos se deba al consumo de compuestos más complejos. Esto fue consistente con la disminución de la DQO. Se deben realizar más estudios para comprender y relacionar las causas de la disminución de la conductividad eléctrica. Los resultados de laboratorio son prometedores como un primer acercamiento a la biorremediación de este efluente complejo y contaminante para la industria local, ya que el agua resultante podría ser aplicada para el mezclado y curado de morteros y hormigones especiales.

## REFERENCIAS

ABAZA, O. A. Sustainable Construction Materials and Technologies: **Utilization of olive oil liquid waste as an additive to roadway construction**. CHUN, Yoon-moon; CLAISSE, Peter; NAIK, Tarun; GANJIAN, Eshmaiel (ed.). COVENTRY, UK: Taylor and Francis Group, 2007. 675-683 p. ISBN 978-0-415-44689-1.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. 9221. **Standard methods: for the examination of water and wastewater.** Washington, DC: American Public Health Association, ano 1992, 2005. Disponible en: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/apha.method.9221.1992.pdf>. Acceso en: 27 set. 2021.

ARROYO MOROCHO, F. R. **La economía circular como factor de desarrollo sustentable del sector productivo.** INNOVA Research Journal, v. 3, n. 12, p. 78-98, 4 dic. 2018. DOI <https://doi.org/10.33890/innova.v3.n12.2018.786>. Disponible en: <https://revistas.uide.edu.ec/index.php/innova/article/view/786>. Acceso en: 26 sep. 2021.

BARRECA, Francesco; FICHERA, C. R. **Use of olive stone as an additive in cement lime mortar to improve thermal insulation.** Energy and Buildings, [S. l.], año 2013, v. 62, p. 507-513, 1 jul. 2013. DOI <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2013.03.040>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378778813002089?via%3Dihub>. Acceso en: 26 set. 2021.

BARRERA, Óscar; MEJÍA, Carlos. **Factores clave en procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales.** Una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 573-585, 2018. DOI 10.31910/rudca.v21.n2.2018.1037. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1037>. Acceso en: 26 sep. 2021.

BORGO, Estefanía. **Diagnóstico sobre los efluentes generados y vertidos en la Industria Olivícola en empresas del Gran Mendoza- Sector aceitunas verdes en conserva.** Orientador: Mariela Beatriz Maldonado. 2013. 86 p. Tese (INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES) - Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, [S. l.], 2013. Disponible en: [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/5317/borgo-final.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/5317/borgo-final.pdf). Acceso en: 26 set. 2021.

CHEN, Q; NI, J; MA, T; LIU, T; ZHENG, M. **Bioaugmentation treatment of municipal wastewater with heterotrophic-aerobic nitrogen removal bacteria in a pilot-scale SBR.** *Bioresource Technology*, [S. l.], año 2015, v. 183, p. 25-32. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.022> <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.022>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852415001911?via%3Dihub>. Acceso en: 26 set. 2021

DEPARTAMENTO GENERAL DE IRRIGACIÓN (Mendoza). TRIBUNAL ADMINISTRATIVO. Secretaría de asuntos institucionales s/ Reglamento General para el Control de Contaminación Hídrica. **Resolución Nº 778 (T.S.221.1996).** [S. l.], 23 dez. 1996. Disponible en: [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/producciones\\_sostenibles/legislacion/provincial/\\_archivos/000005-Legislaci%C3%B3n%20Ambiental%20General/000013-Mendoza/077896-Resoluci%C3%B3n%20N%C2%BA%20778-96%20efluentes%20liquidos.doc](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/producciones_sostenibles/legislacion/provincial/_archivos/000005-Legislaci%C3%B3n%20Ambiental%20General/000013-Mendoza/077896-Resoluci%C3%B3n%20N%C2%BA%20778-96%20efluentes%20liquidos.doc). Acceso en: 27 set. 2021.

DUKE, N. C; BURNS, K. A.; SWANNELL, R. P. J; DALLHAUS, Otto; RUPP, R. J. **Dispersant Use and a Bioremediation Strategy as Alternate Means of Reducing Impacts of Large Oil Spills on Mangroves: The Gladstone Field Trials.** *Marine Pollution Bulletin*, [s. l.], v. 41, ed. 7-12, p. 403-412, 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00133-8). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X00001338?via%3Dihub>. Acceso en: 26 set. 2021.

FADIL, K; CHAHLAOUI, A; OUAHBI, A; ZAID, A; BORJA, R. **Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, [s. l.], v. 51, ed. 1, p. 37-41, 2003. DOI [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00073-2). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830502000732?via%3Dihub>. Acceso en: 26 set. 2021.

Flamarique, J; Maldonado, M; Lafi J. CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA XIV. XIV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA, 2016, Rosario. Santa Fe. Argentina. **Biorremediación de un efluente de la industria aceitunera a través de microorganismos nativos [...].** [S. l.: s. n.], 2016.

GARBISU, C; AMÉZAGA, I; ALKORTA, I. **Biorremediación y Ecología**. Revista Ecosistema, [s. l.], v. 11, ed. 3, p. 1-2, 2003. Disponible en: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/591>. Acceso en: 26 set. 2021.

GARCÍA BLANCO, S; VENOSA, A. D; SUIDAN, M. T. **Biostimulation for the treatment of an oil contaminated coastal salt marsh**. Biodegradation, [s. l.], v. 18, p. 1-15, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9029-3>. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10532-005-9029-3#citeas>. Acceso en: 26 set. 2021.

GARCÍA GARCÍA, I; JIMÉNEZ PEÑA, P. R; BONILLA VENCESLADA, J. L; MARTÍN MARTÍN, A; MARTÍN SANTOS, M. A; RAMOS GÓMEZ, E. **Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum***. Process Biochemistry, [s. l.], v. 35, ed. 8, p. 751-758, 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00135-1). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0032959299001351>. Acceso en: 26 set. 2021.

GUY, R.; PROGRAMA MUNDIAL DE LA UNESCO DE EVALUACIÓN DE LOS RECURSOS HÍDRICOS. **Aguas residuales: El recurso no explotado. Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos**, Paris, p. 1-202, 2017. Disponible en: <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/>. Acceso en: 27 set. 2021.

GUZMÁN M.; MALDONADO N.; AFFRANCHINO G. **Comprehensive evaluation for mortars and concretes incorporating wastes**. In: KOÇ,G.; CHRISTIANSEN B. (ed.) **Reusable and Sustainable Building Materials in Modern Architecture**. Hershey, Pennsylvania, USA: IGI Global book series Advances in Civil and Industrial Engineering, 2019, p.108-136. DOI <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-6995-4.ch006>. Acceso en: 27 set. 2021

INTERNATIONAL COUNCIL OLIVES. Figures: **World olive oil and table olive figures**. [S. l.], 2019. Disponible en: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>. Acceso en: 13 abr. 2020

KYRIACOU, A; LASARIDI, K. E; KOTSOU, M; BALIS, C; PILIDIS, G. **Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater**. Process Biochemistry, [s. l.], v. 40, ed. 3-4, p. 1401-1408, 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.001>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0032959204002134?via%3Dihub>. Acceso en: 26 set. 2021.

LACONI, S; MOLLE, G; CABIDDU, A; POMPEI, R. **Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass**. Biodegradation, [s. l.], v. 18, p. 559-556, 2007. DOI <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9087-1>. Disponible em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10532-006-9087-1#citeas>. Acceso en: 26 set. 2021.

LUCAS, M. S; PERES, J. A. **Removal of COD from olive mill wastewater by Fenton's reagent: Kinetic study**. Journal of Hazardous Materials, [s. l.], v. 168, ed. 2-3, p. 1253-1259, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.002>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389409003847?via%3Dihub>. Acceso en: 26 set. 2021.

MCNAMARA, C. J; ANASTASIOU, C. C; O'FLAHERTY, V; MITCHELL, R. **Bioremediation of olive mill wastewater**. International Biodeterioration & Biodegradation, [s. l.], v. 61, ed. 2, p. 127-134, 2008. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.11.003>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830507001631>. Acceso en: 27 set. 2021.

MILLER, G. L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. Analytical Chemistry, [S. l.], v. 31, p. 426-428, 31 mar. 1959. DOI <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030>. Acceso en: 27 set. 2021.

MORILLO, J. A; ANTIZAR LADISLAO, B; MONTEOLIVA SÁNCHEZ, M; RAMOS CORMENZANA, A; RUSSEL, N. J. **Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes**. Applied Microbiology and Biotechnology volume, [s. l.], v. 82, p. 25-39, 2009. DOI <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1801-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-008-1801-y>. Acesso em: 27 set. 2021.

NANNIPIERI, P; CECCHERINI, M. T; LANDI, L; PIETRAMELLARA, G; RENELLA, G. **Microbial diversity and soil functions**. European Journal of Soil Science, [s. l.], v. 68, ed. 1, p. 12-26, 19 jan. 2017. DOI [https://doi.org/10.1111/ejss.4\\_12398](https://doi.org/10.1111/ejss.4_12398). Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejss.4\\_12398](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejss.4_12398). Acesso em: 26 set. 2021.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. [S. l.]: OMEGA, 2005. 1264 p. ISBN 9788428214100.

SANSCARTIER, D; LAING, T; REIMER, K; ZEEB, B. **Bioremediation of weathered petroleum hydrocarbon soil contamination in the Canadian High Arctic: Laboratory and field studies**. Chemosphere, [s. l.], v. 77, ed. 3, p. 1121-1126, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653509010558?via%3Dihub>. Acesso em: 27 set. 2021.

TECHNICAL COMMITTEE 291-AMC. **Use of Agro-Based Materials as Cementitious Additions in Concrete and Cement-Based Materials**. [S. l.]: International Union of Laboratories and Experts in Construction Materials, Systems and Structures, 2018. Disponível em: <https://www.rilem.net/groupe/291-amc-use-of-agro-based-materials-as-cementitious-additions-in-concrete-and-cement-based-materials-379/page/presentation>. Acesso em: 27 set. 2021.

# CAPÍTULO 10

## PRODUCCIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS Y SU USO EN SUELOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

Data de submissão: 25/10/2021

Data de aceite: 05/11/2021

### Jairo Vanegas Gordillo

Universidad de La Salle  
Departamento de Ciencias Básicas  
Carrera 2 No. 10 -70. Bloque A, Piso 5  
CV

### Daniela Forero Gutiérrez

Universidad de La Salle  
Facultad de Ingeniería Ambiental  
Carrera 2 No. 10 -70. Bloque A, Piso  
dforero48@unisalle.edu.co

### Paola Navarro Munoz

Universidad de La Salle  
Facultad de Ingeniería Ambiental  
Carrera 2 No. 10 -70. Bloque A, Piso  
jnavarro82@unisalle.edu.co

**RESUMEN:** El aprovechamiento de los residuos resultado de las actividades agrícolas, es una de las alternativas para generar productos con valor agregado que pueden ser utilizados como enmienda orgánica en los suelos, mejorando la calidad de estos y así mismo la productividad y sustentabilidad en los cultivos. Esta alternativa logra reducir el impacto ambiental que dichos residuos generan y puedan ser reinsertados

en el proceso productivo. Teniendo en cuenta esto es posible implementar tecnologías apropiadas para la generación de estas enmiendas, es este proyecto se desarrolló una alternativa de aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos como: Mazorca cascara de Naranja, Papa, Plátano, arveja, y Otros como cascara de huevos, lechuga, cilantro, cebolla y Malezas, generados en el corregimiento de la Pradera, mediante la aplicación de pirolisis lenta, técnica que permite la producción de enmiendas orgánicas que aumenta la sostenibilidad de los suelos aportando beneficios como el aumento de absorción de nutrientes, capacidad de intercambio catiónico, capacidad de retención de agua y aumento de la materia orgánica esto debido al mecanismo de secuestro de carbono. El biochar generado se caracterizó mediante un análisis elemental donde se comprobó que cumplía con la NTC 5167 siendo una enmienda orgánica no húmica sólida, posteriormente se evaluó el efecto del biochar aplicado al suelo en las propiedades físicoquímicas del suelo obteniéndose una variación en el PH, en la textura y en el carbono orgánico del suelo (COS), que aumentó a medida que el cultivo iba avanzando, demostrando así que el Biochar permite la captura de CO<sub>2</sub> o el aumento del secuestro de carbono, también se evaluó la productividad del cultivo de hortalizas en dos parcelas; a una de estas se le agregó biochar y a la otra no; la parcela que fue cultivada con biochar obtuvo mayor rendimiento aproximadamente en un 25%.

**PALABRAS CLAVE:** Biochar. Enmienda Orgánica. Residuos Orgánicos. Carbono Orgánico. Productividad. Pirolisis.

## PRODUCTION OF ORGANIC AMENDMENTS FROM ORGANIC WASTE AND ITS USE IN SOILS FOR THE IMPROVEMENT OF THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE SOIL

**ABSTRACT:** The use of residues resulting from agricultural activities is one of the alternatives to generate products with added value that can be used as an organic amendment in soils, improving their quality and also the productivity and sustainability of crops. This alternative manages to reduce the environmental impact that said waste generates and can be reinserted into the production process. Taking this into account, it is possible to implement appropriate technologies for the generation of these amendments, in this project an alternative was developed for the use of organic solid waste such as: Cob, Orange, Potato, Banana, pea, and others such as egg shells, lettuce, coriander, onion and Weeds, generated in the Pradera district, through the application of slow pyrolysis, a technique that allows the production of organic amendments that increases the sustainability of soils, providing benefits such as increased absorption of nutrients, cationic exchange, water retention capacity and increase in organic matter this due to the carbon sequestration mechanism. The biochar generated was characterized by an elemental analysis where it was found that it complied with NTC 5167, being a solid non-humic organic amendment, later the effect of biochar applied to the soil on the physicochemical properties of the soil was evaluated, obtaining a variation in the PH, in the texture and soil organic carbon (SOC), which increased as the crop progressed, thus demonstrating that Biochar allows the capture of CO<sub>2</sub> or the increase in carbon sequestration, the productivity of the vegetable crop was also evaluated in two plots; Biochar was added to one of these and not to the other; the plot that was cultivated with biochar obtained a higher yield by approximately 25%.

**KEYWORDS:** Biochar. Organic Amendment. Organic Waste. Organic Carbon. Productivity. Pyrolysis.

### 1 INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos han ocasionado impactos ambientales negativos por su disposición inadecuada y porque cada vez son más, asunto asociado al incremento de la población humana, a los procesos de transformación industrial (globalización), y a los hábitos de consumo de los individuos. En el Municipio de Subachoque Cundinamarca en el área rural se producen 133,33 Ton/mes de residuos sólidos que están siendo entregados a la empresa de servicios públicos directamente para su disposición final, la gran mayoría tiene un alto potencial de aprovechamiento; el 47,72% que son los residuos orgánicos producto de las actividades agrícolas son un claro ejemplo. Estos residuos tras su aprovechamiento pueden ser utilizados en la fabricación de abonos orgánicos, de enmiendas orgánicas y para formular sustratos (IGRACO LTDA, 2015).

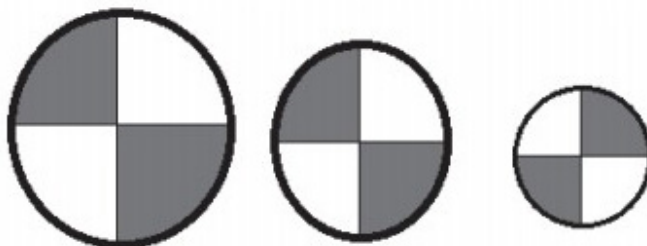
Actualmente la problemática radica en que no han sido implementadas técnicas de aprovechamiento para los residuos agroindustriales ni se ha prestado atención a realizar estudios para la obtención de materiales carbonosos o sólidos porosos que permitan obtener un aumento de la capacidad de adsorción de  $\text{CO}_2$ . Una gestión ambiental adecuada sobre los residuos agroindustriales contribuye a mitigar el Cambio Climático, pudiéndose lograr en muchos casos Proyectos de Desarrollo Limpio, con derecho a Créditos de Carbono, en el marco del Protocolo de Kioto. En este sentido lo que se busca es implementar una alternativa de aprovechamiento que al mismo tiempo permita generar un producto con las características apropiadas para ser utilizado como enmienda en los suelos, con el fin de mejorar la productividad agrícola. De igual forma se pretende evaluar la captura de carbono en el suelo siendo relacionado con la disminución de gases de efecto invernadero, en específico el  $\text{CO}_2$ , a la atmosfera.

**MATERIALES Y MÉTODOS.** Para este proyecto se plantea una metodología cuantitativa (descriptiva, correlacional y experimental) para dar cumplimiento a los objetivos planteados; el desarrollo del proyecto se realizará en tres fases que se describen a continuación:

## 2 PRIMERA FASE. RECOLECCIÓN, PRETRATAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS

Para la selección y recolección de los residuos se utilizó el método de cuarteo según el documento “Caracterización de residuos sólidos” (Rendón, 2012); La Ilustración 1 representa este método del cuarteo, donde se muestra la circunferencia y la división en cuartos, dos de los cuales se toman en cuenta para la siguiente circunferencia, en donde se extrae el material que se encuentra en la zona de color gris y se descarta la zona de color blanco. Con lo seleccionado se realiza nuevamente otra circunferencia y el mismo procedimiento de división por cuartos, hasta lograr una disminución del tamaño de la muestra.

Ilustración 1. Caracterización de residuos sólidos. Método Cuarteo.



Fuente: (Rendón, 2012).



Posteriormente, cada uno de estos residuos se pesa, y la suma total de los residuos dará la totalidad de la muestra, y el peso de cada fracción de residuos dará como resultado el porcentaje de residuos orgánicos presentes. Se realizarán 4 cuarteos para tener un promedio de residuos y posteriormente componer una muestra para ser llevada al proceso de pirólisis.

Pretratamiento de los residuos. Los residuos se sometieron a un proceso de secado en una plancha solar (Ilustración 2) para disminuir su humedad hasta un 10% una vez se alcance esta humedad se trituraron manualmente y se tamizaron por malla 100, la humedad se determinó siguiendo el método gravimétrico, dicho método consiste en tomar una muestra de residuos, pesarla antes y después de su desecado y calcular su contenido de humedad. Para empezar, se deja el recipiente vacío en un horno secador a una temperatura de 110°C por dos horas, transcurrido el tiempo se deja enfriar y se pesa, posteriormente se agregan cinco (5) gramos de residuos y se llevan al horno secador a una temperatura de 110°C por exactamente dos horas, se saca el recipiente con los residuos, se deja enfriar y se pesa nuevamente.

Ilustración 2. Plancha solar.



Fuente: Autores.

Al obtener los datos de la diferencia de peso se aplica la siguiente ecuación:

$$\%Humedad = \frac{Peso\ Inicial - Peso\ Final}{Peso\ Inicial} * 100$$

### 3 SEGUNDA FASE: PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOCHAR

**Producción de biochar por pirólisis lenta.** Soportados en la revisión bibliográfica y en atención a las condiciones de la zona en que se realizó la investigación, las variables

determinantes para este proceso fueron la temperatura de operación en un rango de 350 - 450°C, la presión de vacío de 25 mm de Hg, tiempo de residencia de 3 horas. Para la producción del biochar se utiliza un pirolizador que se encuentra en la zona de estudio (Ilustración 3), está elaborado en acero Cold Rolled, esta unidad contiene tres válvulas, la primera de ellas es la válvula de escape de gases la cual se ubica en la parte superior del pirolizador, la segunda de ellas es una válvula de seguridad la cual sirve como prevención en los casos en que la presión alcanzada sea muy elevada y la tercera que permite conectar la bomba de vacío. De igual forma hay un manovacuumetro el cual permite no solo medir la presión si no también la presión de vacío y un termómetro que mide la temperatura que alcanzan los gases que se generan en la unidad.

Para iniciar el procedimiento se conectan las válvulas nombradas anteriormente y se colocan los residuos dentro del equipo para posteriormente cerrarlo con ayuda de silicona en caliente, se debe verificar que las válvulas estén completamente cerradas a excepción de la válvula 3 (Ilustración 3) que es la que permite la generación de vacío; a esta válvula se conecta una bomba por aproximadamente 2 minutos generando un vacío de -10 inHg, al llegar a este vacío se cierra la válvula, se retira y apaga la bomba. Posteriormente se enciende la estufa y comienza el proceso de calentamiento, donde se controla la temperatura y la presión. Si la presión que mide el manovacuumetro sube de 0 inHg se debe abrir la válvula de escape hasta que llegue de nuevo a 0 inHg. Después de 3 horas que es el tiempo de residencia para la obtención de biochar, se apaga la estufa y se abren las válvulas para que escapen los gases contenidos dentro del pirolizador y por último, se retira la tapa y se recolecta el biochar.

Ilustración 3. Pirolizador utilizado en el proceso para generación de Biochar.



Fuente Autores.

**Caracterización del biochar.** El Biochar obtenido se caracterizará en el laboratorio “Doctor Calderón” certificado por el ICA, los análisis serán: Conductividad eléctrica, Densidad aparente, pH, Humedad, Capacidad de Intercambio Catiónico, Na y Carbono Orgánico, con los métodos y unidades de medida mostrados en la Tabla 1

Tabla1. Parámetros a medir del Biochar obtenido.

PARÁMETRO	METODOS ANALITICOS	UNIDAD DE MEDIDA
Densidad Aparente	LBC 43 Gravimetría	g/cm <sup>3</sup>
pH en Pasta Saturada	LBC 44 Potenciometría	-----
C.E en Extracto Saturación	LBC 41 Potenciometría	dS/m
Humedad	NTC 35 Gravimetría	% P/P
C.I.C	NTC 5167 Volumetría	meq/100g
Sodio Soluble H <sub>2</sub> O	NTC 1146 Emisión	% P/P
C.Orgánico Oxidable Total	NTC 5167 Walkey Black	% P/P

Fuente: Laboratorio “Doctor Calderón”.

## 4 FASE 3. PREPARACIÓN DEL SUELO E IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO

### 4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO ANTES DE LA IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO

Para caracterizar el suelo antes de la implementación del cultivo Se tomó una muestra de suelo siguiendo la “Guía para la determinación de Carbono en pequeñas propiedades rurales”, donde se establece que la muestra debe estar a mínimo 15 cm de profundidad y debe completar 1 Kilogramo de suelo para que sea suficiente al realizar los análisis fisicoquímicos en el laboratorio. Los análisis a realizar serán; Textura por Bouyoucos, NNO<sub>3</sub>, Cu, Mn, Fe, Zn, K, Ca, Mg, Na, S, B, P, pH, Conductividad eléctrica, Al, Saturación de humedad, Densidad aparente, Carbono Orgánico, Materia Orgánica; estos análisis serán realizados en el laboratorio “Doctor Calderón”, que se encuentra certificado por el ICA. La muestra de suelo no se dejará secar debido a los requerimientos del laboratorio.

### 4.2 IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO

Se usaron dos parcelas de iguales dimensiones; ambas se cultivaron con espinaca, en la primera se realizó la aplicación del biochar mientras que en la segunda se realizó el cultivo en condiciones normales. El 5% de la masa del suelo será la cantidad de biochar aplicado al cultivo, la masa de suelo se hallará con el volumen del mismo (multiplicando sus dimensiones) por la densidad aparente (tomada de los resultados de la muestra de suelo

realizada en la primera fase). El proceso de siembra será realizado según las prácticas que llevan a cabo los agricultores de la zona, es decir, se sembrarán 20 plántulas de espinaca abriendo huecos de aproximadamente 10 cm de diámetro y 5 cm de profundidad, a 10 de los 20 huecos realizados se les agregará biochar mientras que a los otros 10 no se les agregó; inmediatamente después se colocaron las plántulas en cada hueco y se cubrió con tierra para darle mayor estabilidad. Y se realizó el cuidado necesario establecido por el agricultor encargado de la zona de estudio.

#### 4.3 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO ANTES Y DESPUÉS DE LA IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO

En esta fase se tomaron muestras de suelo al mes de la siembra y al terminar el proceso de cosecha, enfocándose en la medición de Carbono Orgánico, ya que así se puede relacionar los resultados directamente con la adsorción de CO<sub>2</sub> o lo que es lo mismo, el aumento de la captura de carbono en el suelo; según la guía para la determinación de carbono en pequeñas propiedades rurales (Tito, León & Porro, 2009) y se realizaron los análisis fisicoquímicos en el laboratorio “Doctor Calderón” certificado por el ICA, obteniendo; Textura por Bouyoucos, NNO<sub>3</sub>, Cu, Mn, Fe, Zn, K, Ca, Mg, Na, S, B, P, pH, Conductividad eléctrica, Al, Saturación de humedad, Densidad aparente, Carbono Orgánico, Materia Orgánica.

#### 4.4 EVALUACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO, MATERIA ORGÁNICA Y RENDIMIENTO DEL CULTIVO

Según la guía para la determinación de Carbono en pequeñas propiedades rurales (Tito, León & Porro, 2009), el carbono almacenado en el suelo será calculo por medio de la siguiente ecuación

$$COS = [COS] * densidad aparente * profundidad * d * (1 - frag) * 10$$

Donde:

**COS**= contenido de carbono orgánico del suelo, representativo del tipo de uso del suelo (tC/ ha).

**[COS]**= concentración de carbono orgánico del suelo para una determinada masa de suelo obtenida del análisis de laboratorio (g C /kg de suelo).

**Densidad aparente**= masa de suelo por volumen de muestra (t de suelo m<sup>3</sup>).

**Profundidad**= profundidad del horizonte o espesor de la capa de suelo, en metros (m).

**frag**= volumen porcentual de fragmentos gruesos/100, sin dimensiones.

**Observación:** se utiliza el multiplicador final 10 para convertir las unidades en tC/ ha.

## 4.5 RENDIMIENTO DEL CULTIVO

Al efectuar la siembra la cual tiene una duración de aproximadamente dos meses, se determinó la productividad del cultivo por medio del cálculo del rendimiento utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento del cultivo} \\ = \text{Peso de la espinacas} * \text{Area del Terreno Sembrado}$$

Esta se desarrolló una vez recolectadas todas las plántulas que fueron sembradas, pesándolas en pequeñas cantidades en una balanza análoga; esto se desarrollara para las dos diferentes áreas evaluadas con el fin de comparar los resultados obtenidos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS

Siguiendo la metodología explicada en el documento “Caracterización de residuos sólidos” (Rendón, 2012), se realizaron cuatro (4) cuarteos en la zona de estudio (corregimiento La Pradera), donde se incluyeron únicamente los residuos sólidos orgánicos generados en la finca, los cuarteos fueron realizados los domingos debido a que en este día hay mayor acumulación de los residuos. A continuación, se presenta la torta de residuos de cada cuarteo.

Los residuos se dividieron en siete tipos; Mazorca (cascara de la mazorca y restos sin el grano), Naranja (cascara), Papa (cascara), Plátano (cascara), Cascarillas (cascaras de arveja), Malezas (restos de las siembras) y Otros (cascaras de huevos, lechuga, cilantro, cebolla). Esta última categoría se escogió porque el peso de sus componentes por aparte era muy bajo para ser tenido en cuenta.

**Primer cuarteo de residuos.** Se dividieron los residuos por tipo y cada uno fue pesado (gramos), la suma de los residuos dará la totalidad de la muestra, y el peso de cada fracción de residuos dará como resultado el porcentaje de residuos orgánicos presentes se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Primer cuarteo.

RESIDUOS	PESO (g)	PORCENTAJE (%)
<b>Mazorca</b>	679	16
<b>Naranja</b>	129	3
<b>Papa</b>	1253	30
<b>Plátano</b>	252	6
<b>Cascarillas</b>	127	3

RESIDUOS	PESO (g)	PORCENTAJE (%)
<b>Malezas</b>	352	8
<b>Otros</b>	1439	34
TOTAL	4231	100

Fuente: autores.

**Segundo cuarteo de residuos.** Se tomaron los tipos de residuos ya caracterizados en el primer cuarteo, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Segundo Cuarteo.

RESIDUOS	PESO (g)	PORCENTAJE
<b>Mazorca</b>	645	16
<b>Naranja</b>	114	3
<b>Papa</b>	1534	38
<b>Plátano</b>	278	7
<b>Cascarillas</b>	134	3
<b>Malezas</b>	227	6
<b>Otros</b>	1134	27
TOTAL	4066	100

Fuente: autores.

**Tercer cuarteo de residuos.**, los diferentes pesos en cada uno de los cuarteos muestra la variación en cantidad residuos orgánicos que se generan en la finca del Corregimiento La Pradera, nuevamente se tomaron los mismos tipos de residuos.

Tabla 4. Tercer cuarteo.

RESIDUOS	PESO (g)	PORCENTAJE
<b>Mazorca</b>	625	15
<b>Naranja</b>	132	3
<b>Papa</b>	1439	34
<b>Plátano</b>	237	5
<b>Cascarillas</b>	178	4
<b>Malezas</b>	308	7
<b>Otros</b>	1352	32
TOTAL	4271	100

Fuente: autores.

**Cuarto cuarteo de residuos.** Siguiendo el mismo procedimiento de los tres cuarteos anteriores se realizó el último cuarteo, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 5.

Tabla 5. Cuarto cuarteo.

RESIDUOS	PESO (g)	PORCENTAJE
<b>Mazorca</b>	649	16
<b>Naranja</b>	140	3
<b>Papa</b>	1325	32
<b>Plátano</b>	240	6
<b>Cascarillas</b>	227	6
<b>Malezas</b>	289	7
<b>Otros</b>	1248	30
TOTAL	4118	100

Fuente: autores.

Los residuos fueron llevados a la plancha solar (Ilustración 8) para su secado y posterior proceso de pirolisis lenta.

Ilustración 8. Secado de residuos.



Fuente: autores.

Se determinó el porcentaje de humedad de los residuos antes de llevarse a cabo el proceso de pirolisis, utilizando el método gravimétrico;

Tabla 6 Determinacion de Humedad de residuos.

Muestras	Peso capsula (g)	Peso Inicial C + R (g)	Peso Final C + R (g)	Humedad
Muestra #1	87,1834	92,1815	91,6614	10,41
Muestra #2	70,8401	75,8418	75,2775	11,28

Fuente: autores.



**Producción y caracterización de biochar.** Se siguió paso a paso la metodología planteada en este documento, temperatura de la pirólisis 350- 450 ° C, presión 25 mm de H g y tiempo de reacción 3 horas, una vez obtenido el biochar por pirólisis se caracterizó obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de análisis fisicoquímico Biochar.

PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDAD DE MEDIDA
Densidad Aparente	0,370	g/cm <sup>3</sup>
pH en Pasta Saturada	8,83	-----
C.E en Extracto Saturación	11,40	dS/m
Humedad	0,40	% P/P
C.I.C	34,48	meq/100g
Sodio Soluble H <sub>2</sub> O	0,04	% P/P
C.Orgánico Oxidable Total	18,73	% P/P

Fuente: autores.

**Adecuación de suelo e implementación del cultivo.** Se escogieron dos parcelas de igual dimensión, para conocer cuánto biochar era necesario se tuvo en cuenta que el 5% de la masa del suelo sería la cantidad de biochar aplicado al cultivo (la masa de suelo se hallará con el volumen del mismo por la densidad aparente, esta última fue tomada del análisis de suelo realizado en la primera fase).

$$Masa\ Suelo = Densidad\ aparente * Volumen$$

$$Masa\ Suelo = 0,92\ g/cm^3 * (25cm * 70cm * 15cm)$$

$$Msuelo = 24150\ g$$

$$Masa\ Biochar = \frac{24150g * 5\%}{100\%}$$

$$Masa\ Biochar = 1208\ g$$

En una parcela se agregó un Kilogramo (1 Kg) de Biochar y en la otra se sembró en condiciones normales (Ilustración 9). Las condiciones de siembra y riego fueron dadas por el agricultor encargado de la zona de estudio. (Ilustración 10 y 11)



Ilustración 9. Aplicación del Biochar en el cultivo de espinaca.



Fuente Autores.

Ilustración 10. Siembra de espinaca.



Fuente: Autores.

Ilustración 11. Siembra realizada.



Fuente: Autores.

**Caracterización del suelo antes, durante y después de la implementación del cultivo.** La tabla 8 muestra los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al suelo antes, durante y después de la implementación del cultivo. Los resultados muestran niveles excesivos de Zinc; niveles altos de potasio y nitrógeno; niveles medios de Calcio, Magnesio, Fosforo y Hierro; niveles bajos de Cobre; niveles deficientes de Azufre, Manganeso y Boro, una textura Franca con pH de tendencia Acida y un porcentaje medio de Carbono Orgánico.

Tabla 8. Caracterización del suelo antes, durante y después de la implementación del cultivo.

PARÁMETRO	RESULTADOS ANTES DE LA SIEMBRA	RESULTADOS DURANTE LA SIEMBRA	RESULTADOS DESPUÉS DE LA SIEMBRA	UNIDADES
Potasio	1.22	0.74	0.73	meq/100cc
Calcio	12.2	16.48	14.14	meq/100cc
Magnesio	2.2	3.64	3.18	meq/100cc
Sodio	1.04	1	1.37	meq/L
Aluminio	0.1	Muy bajo	Muy bajo	meq/100cc
C.I.C calculada	15.91	21.08	18.36	meq/100cc
Fosforo	119	180	151	ppm
N-NO <sub>3</sub>	200	40	20	ppm
Azufre	14	1	4	ppm
Hierro	419	383	385	ppm
Manganeso	13	24	22	ppm
Cobre	0.3	0.4	0.8	ppm
Zinc	25.1	12.8	17.7	ppm
Boro	0.18	0.35	0.33	ppm
p.H	5.41	6.26	6.6	—
C.E	1.29	0.75	0.46	mS/cm
Arena	33	5	—	%
Limo	45	88	—	%
Arcilla	22	7	—	%
Textura	Franca	Limosa	Limosa	—
M. Orgánica	17.22	21.48	21.70	%
C. Orgánico	9.99	12.46	12.93	%
Sat. Humedad	55	62	65	%
Densidad	0.92	0.64	0.69	g/cc

Fuente: Laboratorio "Doctor Calderón".

**Evaluación del Contenido de Carbono Orgánico.** Se calculó el carbono almacenado en el suelo para las tres etapas del cultivo; antes, durante y después de la siembra, según la guía para la determinación de Carbono en pequeñas propiedades

rurales (Tito, León & Porro, 2009). No se tendrán en cuenta los fragmentos gruesos debido a que no se presentaron en la toma de muestras. Los resultados de carbono orgánico fueron dados por el laboratorio “Doctor Calderón” en unidades de porcentaje (%), para la ecuación se deben utilizar unidades de gC/Kg de suelo, para esto se tomó como base de cálculo 1 Kg de suelo (que es la cantidad de suelo entregada al laboratorio para realizar los análisis) y el porcentaje dado por el laboratorio se dividió en 100 para obtener los gramos de Carbono.

$$COS = [COS] * densidad\ aparente * profundidad * (1 - frag) * 10$$

- **Antes de la siembra**

$$COS = \frac{0,0999}{1Kg\ de\ suelo} * 0,92 \frac{t}{m^3} * 0,15m * 10 = 0,14\ tC/ha$$

- **Durante la siembra**

$$COS = \frac{0,1246}{1Kg\ de\ suelo} * 0,92 \frac{t}{m^3} * 0,15m * 10 = 0,17\ tC/ha$$

- **Después de la siembra**

$$COS = \frac{0,1293}{1Kg\ de\ suelo} * 0,92 \frac{t}{m^3} * 0,15m * 10 = 0,18\ tC/ha$$

Una vez determinado el contenido de carbono en el suelo, se calculó el carbono orgánico sobre el área trabajada, por lo que aplica la siguiente ecuación:

$$COA = COS * A$$

- **Antes de la siembra**

$$COA = 0,14 \frac{tC}{ha} * 0,175x10^{-5}ha = 2,450x10^{-7}tC$$

- **Durante la siembra**

$$COA = 0,17 \frac{tC}{ha} * 0,175x10^{-5}ha = 2,975x10^{-7}tC$$

- **Después de la siembra**

$$COA = 0,18 \frac{tC}{ha} * 0,175x10^{-5}ha = 3,150x10^{-7}tC$$

Considerando para cada una de las etapas las cantidades de carbono presentes, se procedió a determinar el incremento de carbono durante el desarrollo del proyecto, esto es resultado de diferencia entre la cantidad de carbono en determinado momento y la medida anterior.

$$\text{Incremento de carbono} = COA_2 - COA_1$$

$$\text{Incremento de carbono}_1 = 2,975 \times 10^{-7} tC - 2,450 \times 10^{-7} tC = 0,525 \times 10^{-7} tC$$

$$\text{Incremento de carbono}_2 = 3,150 \times 10^{-7} tC - 2,975 \times 10^{-7} tC = 0,175 \times 10^{-7} tC$$

$$\text{Incremento total} = 0,525 \times 10^{-7} tC + 0,175 \times 10^{-7} tC = 0,7 \times 10^{-7} tC$$

**Rendimiento del cultivo.** La recolección de las plántulas cultivadas se realizó pasados 60 días exactamente desde que se realizó la siembra. La relación en peso de las hortalizas sembradas con Biochar y sin Biochar se presenta a continuación:

Tabla 9. Rendimientos del cultivo.

Producto	Peso 1 lb	Peso 2 lb	Peso 3 lb	Total lb
Peso hortalizas sin biochar	1,4375	1,1875	0,75	3,375
Peso hortalizas con biochar	1,75	1,8125	0,6	4,1875

Fuente: Autores.

Una vez calculado el peso de las hortalizas obtenidas tras la siembra, se determina el rendimiento del cultivo:

$$\text{Área del Terreno} = \text{Ancho} * \text{Largo}$$

$$\text{Área del Terreno} = 0,25 \text{ m} * 0,70 \text{ m} = 0,175 \text{ m}^2$$

$$\text{Rendimiento del cultivo sin Biochar} = 3,375 \text{ Lb} * 0,175 \text{ m}^2$$

$$\text{Rendimiento del cultivo sin Biochar} = 0,59 \text{ Lb/m}^2$$

$$\text{Rendimiento del cultivo con Biochar} = 4,1875 \text{ Lb} * 0,175 \text{ m}^2$$

$$\text{Rendimiento del cultivo con Biochar} = 0,73 \text{ Lb/m}^2$$

## 5.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Caracterización de residuos. Al obtener los resultados de los cuatro cuarteos realizados se determinaron los porcentajes de cada uno de los residuos para ser llevados al proceso de pirolisis haciendo un promedio (Tabla 10). Los residuos que se separaron son los más utilizados en la cocina de la finca la Pradera, con estos porcentajes se demuestra que se hará un aprovechamiento de todos los residuos.

Tabla10. Porcentaje final de residuos para el proceso de pirolisis.

RESIDUOS	PORCENTAJE
<b>Mazorca</b>	16
<b>Naranja</b>	3
<b>Papa</b>	33
<b>Plátano</b>	6
<b>Cascarillas</b>	4
<b>Malezas</b>	7
<b>Otros</b>	31
TOTAL	100

Fuente: Autores.

### 5.3 SECADO DE RESIDUOS

Según estudios previos a cerca del desarrollo del proceso de pirolisis, es importante que los residuos orgánicos que sean utilizados tengan aproximadamente un 10% de humedad en peso, ya que esto permite un óptimo rendimiento del proceso. Es por esto que es utilizada la plancha solar como parte esencial para el desarrollo de un secado previo, según los porcentajes de humedad obtenidos en el laboratorio este proceso permite reducir la humedad a un 10 y 12% en peso. Determinado estos, es posible asegurar que con esta humedad se favorece la carbonización del producto, aumento la composición sólida y reduciendo la formación de fase gaseosa y líquida.

### 5.4 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL BIOCHAR

El biochar que se obtuvo en el proceso de pirolisis bajo las condiciones establecidas, cumple con la NTC 5167, siendo el biochar una enmienda orgánica no húmica solida; la norma establece lo presentado en la Tabla13. Es decir, que el biochar obtenido tuvo las características necesarias para ser aplicado en el cultivo de espinacas.

Tabla 11. Requisitos específicos para Enmienda Orgánica no húmica. NTC 5167.

Enmienda Orgánica no húmica			
Clasificación del producto	Indicaciones relacionadas con la obtención y los componentes principales	Parámetros a caracterizar y otros requisitos	Parámetros a garantizar
1	2	3	4



Enmienda Orgánica no húmica			
Enmienda Orgánica no húmica	Producto orgánico sólido obtenido a partir de la deshidratación y estabilización de los residuos provenientes de las plantas industriales y de tratamiento de a) aguas residuales industriales y urbanas y b) residuos sólidos urbanos separados en la fuente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Si el producto se disuelve en agua, su disolución no debe desarrollar pH alcalino.</li> <li>* Contenido de carbono orgánico oxidable total, mínimo 15%</li> <li>* Capacidad de intercambio catiónico, mínimo 30 cmol(+) kg-1 (meq/100g)</li> <li>* Conductividad eléctrica, declararla</li> <li>* Contenido de sodio soluble (declararlo, restricciones de uso)</li> </ul>	Contenido de carbono orgánico oxidable total %C Capacidad de intercambio catiónico Cmol (+) kg-1 (meq/100g) Contenido de metales pesados mg/kg

Fuente: (NTC 5167, 2004).

## 5.5 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO ANTES DURANTE Y DESPUÉS DE LA IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO

De acuerdo a la tabla 8 donde se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados antes, durante y después de la siembra para poder comparar la evolución del cultivo.

De acuerdo a estos resultados se puede ver el pH que se hizo alcalino a medida que transcurrió la aplicación del biochar favoreciendo el pH ideal para el cultivo (5,6 – 7,1). también se ven niveles altos de Zinc y déficit en Azufre y Nitrógeno. El Zinc se encuentra más disponible en los suelos ácidos que en los alcalinos es por esto que al aumentar el pH del suelo los niveles de Zn van bajando poco a poco, aunque aún siga siendo alto. Al haber una disminución de la fijación de nitrógeno atmosférico que realizan las bacterias se presenta una deficiencia de azufre y por esto tanto el N como el S se encuentran en deficiencia. es así como se percibe una disminución en la concentración de nitratos a través del desarrollo de la plantación, por lo que esto puede justificarse por la necesidad de absorción de la planta para su desarrollo esencialmente durante el primer mes de la siembra, donde se evidencian las etapas de germinación, de igual manera se debe tener en cuenta que las actividades de riego y la presencia de lluvias permite el lavado de los suelos, generando una acumulación de nutrientes a profundidades mayores y una disminución de la concentración de nutrientes en la superficie de los suelos. Este mismo comportamiento se evidencia en compuestos como el potasio, los cuales pueden no solo ser consumidos por la planta y lavados del suelo, sino que también actúan como sustancias intercambiables de forma que se unen electrostáticamente a la fracción coloidal mineral y orgánica del suelo.

El fósforo es el segundo de los nutrientes con mayor consumo por parte de las plantas, es importante resaltar que este tiene mayor consumo en las etapas medias y

avanzadas del crecimiento de los cultivos, por lo que esto puede explicar el aumento de su concentración en la fase inicial del cultivo tras la aplicación de la enmienda y su posterior reducción. De igual forma la solubilidad del fósforo en el suelo depende generalmente del pH del suelo, es por ello que durante el primer mes al mantenerse el pH menor a 6,5 el fósforo aún se encuentra presente en suelo combinado con compuestos como el hierro o el aluminio, mientras que en el momento en que el pH sobrepasa de este valor se evidencia la transformación de fósforo por su insolubilidad.

La capacidad de intercambio catiónico refleja la cantidad de cationes que pueden ser retenidos por los suelos, a medida que la CIC es más elevada la fertilidad del suelo aumenta. En este caso la CIC fue mayor durante el cultivo (al mes de la siembra) esto se debe a que la espinaca consumió mayor cantidad de cationes en el periodo inicial para su crecimiento, el Calcio (Ca) y el Magnesio (Mg) lo demuestran. La relación óptima Ca/Mg debe estar alrededor de 5, en este caso la relación promedio es de 4,5, muy cercana a la relación óptima, igualmente sucede con la relación óptima K/Mg que debe estar entre 0,2 y 0,3 y en este caso es de 0,2. Determinándose que el cultivo se dio en condiciones óptimas en cuanto a los cationes necesarios para el desarrollo de la espinaca.

La Saturación de humedad corresponde al contenido de agua de un suelo en el momento en que todos sus poros están saturados. Se evidencia el aumento de esta a medida que iba avanzando el cultivo debido a que el biochar por sus propiedades orgánicas permite que los poros del suelo tengan una modificación estructural de tal forma que permita la retención sustancial del agua y que esta se filtre con mayor dificultad por los horizontes del suelo. Dentro de ello se relaciona igualmente la densidad del suelo debido a que los aportes de materia orgánica hacen que la densidad se reduzca y que los poros del suelo se distribuyan de tal manera que los espacios vacíos sean mínimos.

Uno de los parámetros de mayor interés para esta investigación es el Carbono Orgánico del Suelo (COS), que se vincula con la cantidad y disponibilidad de nutrientes del suelo. El COS aumenta a medida que pasa el tiempo en la siembra debido a la retención de Carbono Orgánico, proceso causado por la aplicación del Biochar. El aumento de la materia orgánica del suelo (MOS) también es causado por la aplicación del biochar, al aumentarse la MOS se aumentan los porcentajes de limo en el suelo por esto la textura cambia de Franca a Limosa. Los suelos limosos tienen gránulos de tamaño intermedio son fértiles y fáciles de trabajar. Forman terrones fáciles de desagregar cuando están secos. Los datos encontrados en estudios realizados anteriormente, confirman que los efectos del biochar se observan después de por lo menos un año y medio de aplicado y dependiendo del cultivo.

## 5.6 CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO

El carbono orgánico presente en el suelo representa un balance dinámico entre la absorción de material vegetal muerto y la pérdida por descomposición (mineralización). Las concentraciones de carbono orgánico del suelo son más altas en su capa superior y disminuyen exponencialmente conforme aumenta la profundidad, es por esto que las muestras de suelo se tomaron a 15 cm. El carbono orgánico del suelo es la transformación del carbono atmosférico ( $\text{CO}_2$ ) en carbono orgánico al atravesar por procesos energéticos y de crecimientos de las plantas alojándose en la biomasa vegetal y el suelo. El contenido de carbono orgánico en el suelo de estudio aumento después de la aplicación del biochar (de 0,14 Tc/ha a 0,18 Tc/ha) debido a que la aplicación de Biochar permite la aceleración en el proceso de mineralización de carbono orgánico y se incrementa la colonización microbiana, provocando la descomposición acelerada de compuestos orgánicos; lo que permite el mejoramiento de suelos, aumento de productividad agrícola y gran sostenibilidad entre los recursos a utilizar, demostrando que el biochar aumenta el secuestro de Carbono.

## 5.7 RENDIMIENTO DEL CULTIVO

Según los resultados obtenidos referente al desarrollo del cultivo, se presentó un aumento entre la plantación con Biochar y sin Biochar respecto a su rendimiento tras su crecimiento pasados los 2 meses de estudio. El rendimiento del cultivo sin biochar es de  $0,59 \text{ Lb}/\text{m}^2$ , mientras que el rendimiento obtenido del área cultivada con bichar es  $0,73 \text{ Lb}/\text{m}^2$ ; esto indica aproximadamente un 20% en el aumento de producción en peso del cultivo. De igual forma al comparar la fisionomía de la hortaliza se observa que la planta sembrada con Biochar tiene mayor cantidad de hojas, con tallos más cortos, por lo que la fracción aprovechada de esta es mayor, y lo que se dispone como residuo es menor. Así mismo la calidad del producto se ve mejorada, por el color de la hoja, el grosor de la hoja y la reducción del volumen de producto que se desecha por no ser apto para su comercialización.

Es así como no solo se ve mejorada la calidad del cultivo, si no también se obtienen beneficios económicos y ambientales; dentro de los aspectos económicos se considera que será mayor la proporción del producto a vender, por lo que se verán aumentados los ingresos por su producción. Mientras que, dentro de los aspectos ambientales, se registrara una disminución en la cantidad de residuos sólidos generados, contribuyendo con el adecuado aprovechamiento de estos; así mismo el uso de suelo se verá beneficiado, ya que se necesitaran áreas menores para producir las cantidades requeridas del producto y así este ser aprovechado en otro tipo de actividades.



## 6 CONCLUSIONES

La implementación del biochar en el suelo del corregimiento La Pradera en el municipio de Subachoque, permitió generar una alternativa de aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos generados.

Las condiciones de operación bajo las cuales se realizó el proceso de pirolisis lenta fueron las establecidas según la revisión bibliográfica. El biochar generado cumplió con la NTC 5167, siendo una enmienda orgánica no húmica sólida.

Las condiciones de presión y el tiempo de desarrollo del proceso de pirolisis incidirán la calidad y la capacidad de evolución de los nuevos suelos intervenidos, ya que aunque los procesos metodológicamente son similares, las alteraciones de estas condiciones cambian en absoluto los requerimientos de la enmienda según lo evaluado en la norma NTC 5167.

Se obtuvo mayor rendimiento del cultivo en la parcela donde se agregó el biochar, demostrando que esta enmienda permite el mejoramiento de suelos y el aumento de la productividad agrícola.

El carbono orgánico del suelo es la transformación del carbono atmosférico ( $\text{CO}_2$ ) en carbono orgánico al atravesar por procesos energéticos y de crecimientos de las plantas, alojándose en el suelo, lo cual permite el secuestro de carbono, o lo mismo la captura de  $\text{CO}_2$  en el suelo.

En los análisis fisicoquímicos realizados se logró observar que el porcentaje de carbono orgánico aumentó a medida que avanzaba el cultivo, indicando que el biochar ayuda a incrementar la captura de  $\text{CO}_2$  en el suelo.

## BIBLIOGRAFÍA

Abenza, D. P. (06 de 2012). *Universidad Autonoma de Barcelona*. Obtenido de [https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2012/hdl\\_2072\\_202695/PFC\\_DanielPacoAbenza.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2012/hdl_2072_202695/PFC_DanielPacoAbenza.pdf)

AGRO WASTE. (2014). *CTC Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación*. Obtenido de Pirólisis.

Arysta. (2002). *Red Agrícola*. Obtenido de CONDUCTIVIDAD ELECTRICA Y SALINIDAD: <http://www.redagricola.com/reportajes/empresas/conductividad-electrica-y-salinidad>

Braddy. (1994). *Materia Orgánica*. Obtenido de [http://www.ujaen.es/huesped/pidoceps/telav/fundespec/materia\\_organica.htm](http://www.ujaen.es/huesped/pidoceps/telav/fundespec/materia_organica.htm)

Carvajal, M. (15 de 01 de 2015). *INVESTIGACIÓN SOBRE LA ABSORCIÓN DE  $\text{CO}_2$  POR LOS CULTIVOS MÁS REPRESENTATIVOS*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/228395534\\_INVESTIGACION\\_SOBRE\\_LA\\_ABSORCION\\_DE\\_CO2\\_POR\\_LOS\\_CULTIVOS\\_MAS\\_REPRESENTATIVOS](https://www.researchgate.net/publication/228395534_INVESTIGACION_SOBRE_LA_ABSORCION_DE_CO2_POR_LOS_CULTIVOS_MAS_REPRESENTATIVOS)

Cortes, A. G. (1993). *Estudio termoquímico y cinético de la pirólisis de residuos sólidos urbanos*. Obtenido de Alicante, España: Universidad de Alicante.

Ecoplexity. (2010). *Teaching ecological complexity*. Obtenido de Densidad aparente del suelo: <http://ecoplexity.org/?q=node/596>

Eduardo Martínez, J. P. (2008). *CARBONO ORGÁNICO Y PROPIEDADES DEL SUELO*. Obtenido de Universidad de Chile: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-27912008000100006](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912008000100006)

Escarlante, M. (12 de 2013). *Biocarbones (Biochars)*. Obtenido de Caracterización y efecto en la biomas y nutrición de N, P, K, en una granja: [https://www.google.com/search?client=opera&q=Biocarbones+\(Biochars\)+caracterizaci%C3%B3n+y+efecto+en+la+biomasa+y](https://www.google.com/search?client=opera&q=Biocarbones+(Biochars)+caracterizaci%C3%B3n+y+efecto+en+la+biomasa+y)

Glosario de Riego. (s.f). *Rendimiento de los cultivos*. Obtenido de <http://www.riego.org/glosario/rendimiento-de-los-cultivos-fao/>

Gómez & Rincón. (2008). *Pirólisis de Biomasa de Cuesco de palma de aceite*. Obtenido de [https://www.google.com/search?client=opera&q=Biocarbones+\(Biochars\)+caracterizaci%C3%B3n+y+efecto+en+la+biomasa+y+nutrici%C3%B3n+de+N%2C+P%2C+K+en+una+gram%](https://www.google.com/search?client=opera&q=Biocarbones+(Biochars)+caracterizaci%C3%B3n+y+efecto+en+la+biomasa+y+nutrici%C3%B3n+de+N%2C+P%2C+K+en+una+gram%)

Health Care Without Harm. (2010). *Pirólisis, una técnica de tratamiento térmico no tradicional*. Obtenido de Washington, DC.

IGRACO LTDA. (2015). *ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS-PGIRS - MUNICIPIO DE SUBACHOQUE, SEGÚN LA RESOLUCIÓN 0754 DEL 25 DE NOVIEMBRE DEL 2014. Subachoque, Cund.*

INFOJARDIN. (s.f). *Nitrato - Nitrato - Definición*. Obtenido de <http://www.infojardin.net/glosario/nicotina/nitrato-nitratos.htm>

Jaramillo, G. (2008). *Universidad de Antioquia*. Obtenido de APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS EN COLOMBIA: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Apressolorgco.pdf>

López, C. E., Castellanos, M. S., & Abril, M. S. (2009). ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MATERIA SECA DE CUATRO VARIEDADES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) EN ZIPAQUIRÁ, CUNDINAMARCA (COLOMBIA). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*.

MADS. (1997). *Política para la gestión integral de residuos*. Obtenido de [http://www.metropol.gov.co/institucional/Documents1/Ambiental/Residuos%20Sólidos/PGIRS\\_Politica\\_para\\_la\\_Gestion\\_Integra\\_de\\_Residuos.pdf](http://www.metropol.gov.co/institucional/Documents1/Ambiental/Residuos%20Sólidos/PGIRS_Politica_para_la_Gestion_Integra_de_Residuos.pdf)

Ministerio de Educación. (16 de Febrero de 2011). *CVNE Centro Virtual de Noticias de Educación*. Obtenido de <http://www.mineducacion.gov.co/cvn/1665/w3-article-264928.html>

NTC 5167. (15 de 06 de 2004). *Norma Técnica Colombiana 5167*. Obtenido de PRODUCTOS PARA LA INDUSTRIA AGRÍCOLA. PRODUCTOS ORGÁNICOS USADOS COMO ABONOS O FERTILIZANTES Y ENMIENDAS DE SUELO.: <https://es.scribd.com/doc/138627365/NTC-5167-Apartes1-1-Norma-Para-Abonos-Organicos-y-Fertilizantes>

Pastor Y., M. d. (2001). *Construcción de una planta de producción de biochar a partir de purines*. Obtenido de <https://www.google.com/search?client=opera&q=Construcci%C3%B3n+de+una+planta+de+producci%C3%B3n+de+biochar+a+partir+de+purines&sourceid=opera&ie=UTF8&oe=UTF-8>

Pasturas de America. (02 de Feberero de 2017). *Pasturas de America*. Obtenido de <http://www.pasturasdeamerica.com/utilizacion-forrajes/residuos-agricolas/maiz/>

Pinedo, A. U. (2013). *Obtención de Biocarbones y Bicomcombustibles Mediante Pirólisis de Biomasa Residual*. Obtenido de Madrid, España.: Universidad Nacional de Educación a Distancia.

R. Ibarrola, B. E. (07 de 2013). *Comercialización de biocarbón (biochar) en México*. Obtenido de Definición del contexto para un programa de investigación multidisciplinario: [https://www.google.com/search?client=opera&q=Biocarbones+\(Biochars\)+caracterizaci%C3%B3n+y+efecto+en+la+biomasa+y+nutrici%C3%B3n+de+N%2C+P%2C+K+en+una+gram%C3%ADnea&sourceid=opera&ie=UTF-8&oe=UTF-8#q=Comercializaci%C3%B3n+de+biocarb%C3%B3n+\(biochar\)+en+M%](https://www.google.com/search?client=opera&q=Biocarbones+(Biochars)+caracterizaci%C3%B3n+y+efecto+en+la+biomasa+y+nutrici%C3%B3n+de+N%2C+P%2C+K+en+una+gram%C3%ADnea&sourceid=opera&ie=UTF-8&oe=UTF-8#q=Comercializaci%C3%B3n+de+biocarb%C3%B3n+(biochar)+en+M%20)

Rendón, A. F. (13 de 10 de 2012). *Caracterización de residuos sólidos*. Obtenido de <http://ojs.tdea.edu.co/index.php/cuadernoactiva/article/download/34/31>

Reyna, M. A. (2014). *Efectos de la aplicación de biochar y cenizas en las propiedades del suelo*. Palencia: Universidad de Valladolid.

SAGARPA. (s.f). *Sistema de Agronegocios Agrícolas*. Obtenido de Ciudad de México: Subsecretaria de desarrollo rural.

Solorzano, I. (2000). *Manual Buenas Prácticas Cultivo de Pitahaya*. Nicaragua.

SRNL. (2010). *Subdirección Red Nacional de Laboratorios*. Obtenido de Manual de Gestión Integral de Residuos. Instituto Nacional de Salud.

Tchobanoglous, G. T. (1994). *Gestión Integral de Residuos Sólidos*. Obtenido de M Madrid: McGRAW-HILL.

Tito, León & Porro. (2009). *Guía para la determinación de carbono en pequeñas propiedades rurales*. Obtenido de <https://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiUxfDkYjOAhVRgx4KHYYKgBMsQFggcM>

# CAPÍTULO 11

## USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS PRODUCIDAS POR TRATAMIENTO HIDROTERMAL Y RADIACIÓN POR MICROONDAS DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN LA CAPTURA DE CARBONO Y AUMENTO DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS

*Data de submissão: 25/10/2021*

*Data de aceite: 05/11/2021*

**Jairo Vanegas Gordillo**

Universidad de La Salle  
Departamento de Ciencias Básicas  
Carrera 2 No. 10 -70. Bloque A, Piso 5  
CV

**Laura Milena Bejarano**

Universidad de La Salle  
Facultad de Ingeniería Ambiental  
Carrera 2 No. 10 -70. Bloque A, Piso 6  
Lbejarano07@unisalle.edu.co

**Paola Alexandra Aguilar Diaz**

Universidad de La Salle  
Facultad de Ingeniería Ambiental  
Carrera 2 No. 10 -70. Bloque A, Piso 6  
Paguilar76@unisalle.edu.co

**RESUMEN:** El objetivo es mostrar el aprovechamiento y transformación de los residuos orgánicos, en biocarbones por pirólisis asistida por microondas y carbonización hidrotermal como nuevas alternativas para la generación de enmiendas orgánicas a partir de residuos orgánicos. Con rendimientos superiores al 90% para los procesos de calentamiento hidrotermal

y de pirólisis asistida por microondas en la producción de biocarbones. Estas tecnologías les dan un valor agregado a los residuos utilizados al transformarlos en biochar e hidrochar, que además de tener propiedades de mejorar el suelo, es posible usarlos como secuestradores de carbono. La aplicación de los biocarbones obtenidos se realizó en la finca Villa María, ubicada en la vereda el tunal, Zipaquirá con coordenadas geográficas 5°01'01,27" N 73° 56'22,84" O. con un área aproximada de 3.380 m<sup>2</sup>, y suelos entisoles. con pendiente mayor al 50%, y un paisaje montañoso con drenaje imperfecto a excesivo ("Geoportal, IGAC," 2002). Este proyecto se desarrolló con una metodología de estudios comparativos con aplicación al suelo de biocarbones producidos con residuos orgánicos, con el fin de relacionar el aumento de materia orgánica y captura de carbono en el suelo, Esta se llevó a cabo mediante (3) fases. Primera fase Selección, Clasificación, recolección, pretratamiento de biomasa, producción y caracterización de biochar e hidrochar. Segunda fase caracterización y adecuación de suelos tercera fase relación entre el aumento de carbono orgánico y materia orgánica y captura de dióxido de carbono Los biocarbones producidos, obtuvieron un porcentaje de carbono orgánico de 39,05% para hidrochar y 29,41% para Biochar, y un aumento en la materia orgánica del suelo, pasando de 0,258 a 4,926% por efecto del hidrochar y de 1,395 a 5,391% por

el Biochar, y mayor estabilidad en el suelo. Y un CO<sub>2</sub>eq por el hidrochar de 0,002247 Toneladas de CO<sub>2</sub>eq en comparación con 0,001673 CO<sub>2</sub>eq para Biochar.

**PALABRAS CLAVES:** Hidrochar. Biochar. Microondas. Tratamiento Hidrotermal. Captura de Carbono. Enmiendas Orgánicas.

## USE OF ORGANIC AMENDMENTS PRODUCED BY HYDROTHERMAL TREATMENT AND MICROWAVE RADIATION OF ORGANIC RESIDUES IN CARBON CAPTURE AND INCREASE OF ORGANIC MATTER IN SOILS

**ABSTRACT:** The objective is to show the use and transformation of organic waste into biofuels by microwave-assisted pyrolysis and hydrothermal carbonization as new alternatives for the generation of organic amendments from organic waste. With yields greater than 90% for hydrothermal heating and microwave-assisted pyrolysis processes in the production of biofuels. These technologies give added value to the waste used by transforming them into biochar and hydrochar, which in addition to having soil-improving properties, it is possible to use them as carbon sequestrants. The application of the biochar obtained was carried out in the Villa María farm, located in the village of El Tunal, Zipaquirá with geographic coordinates 5 ° 01'01.27 "N 73 ° 56'22.84" W. with an approximate area of 3,380 m<sup>2</sup>, and entisole soils. with a slope greater than 50%, and a mountainous landscape with imperfect to excessive drainage ("Geoportal, IGAC," 2002). This project was developed with a methodology of comparative studies with application to the soil of biofuels produced with organic waste, in order to relate the increase in organic matter and carbon capture in the soil. This was carried out through (3) phases. First phase Selection, Classification, collection, biomass pretreatment, production and characterization of biochar and hydrochar. Second phase characterization and adaptation of soils third phase relationship between the increase in organic carbon and organic matter and carbon dioxide capture The biochar produced, obtained a percentage of organic carbon of 39.05% for hydrochar and 29.41% for Biochar, and an increase in soil organic matter, from 0.258 to 4.926% due to hydrochar and from 1.395 to 5.391% due to Biochar, and greater stability in the soil. And a CO<sub>2</sub>eq per hydrochar of 0.002247 Tons of CO<sub>2</sub>eq compared to 0.001673 CO<sub>2</sub>eq for Biochar

**KEYWORDS:** Hydrochar. Biochar. Microwave. Hydrothermal Treatment. Carbón Capture. Organic Amendments.

### 1 INTRODUCCIÓN

La generación de residuos sólidos ha sido un problema inherente al desarrollo del ser humano, el manejo inadecuado, genera grandes impactos afectando el ambiente y al mismo ser humano, los innumerables beneficios que tiene aplicar técnicas de aprovechamiento de residuos orgánicos como es en este caso, la pirolisis asistida por microondas y la carbonización hidrotermal, estas, permiten usar gran cantidad de residuos, transformándolos en enmiendas o mejoradores de suelo con valor agregado, logrando así disminuir la disposición final en rellenos sanitarios, el proceso de incineración

e innovación en tecnologías limpias. Se aplicaron tecnologías de pirolisis por microondas y carbonización hidrotermal a los residuos sólidos orgánicos producidos en las plazas de mercado, constituidos principalmente por, hojas de cebolla, cascara de maíz y arveja, debido a su alto contenido de celulosa y fibra, para su transformación en biocarbones, que al aplicarlos en el suelo generan aumento en la materia orgánica, característica que va directamente relacionada con la captura de carbono, disminuyendo así las emisiones de gases efecto invernadero como el CO<sub>2</sub> a la atmosfera y formación de sumideros de carbono. Este escenario ofrece un gran campo de acción para la implementación de estas tecnologías y especialmente la aplicación de biochar e hidrochar para lograr un aporte en ese 20% de emisiones que Colombia se comprometió a reducir al año 2030 durante el acuerdo de Paris Las aplicaciones de estas alternativas inicialmente se podrían establecer en una escala local, y lograr involucrar a los pequeños agricultores en un mercado de carbono voluntario.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto se desarrolló con una metodología de estudios comparativos por medio de la aplicación al suelo de biocarbones producidos con residuos orgánicos, mediante tecnología de pirolisis por microondas y carbonización hidrotermal, con el fin de relacionar el aumento de materia orgánica y captura de carbono en el suelo, vinculando estas dos variables con la disminución de emisiones gases de efecto invernadero, principalmente el CO<sub>2</sub>. Esta se llevó a cabo mediante (3) fases.

### 2.1 FASE 1. SELECCIÓN, CLASIFICACIÓN, RECOLECCIÓN, PRETRATAMIENTO DE BIOMASA, PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCHAR E HIDROCHAR

Selección, Recolección y clasificación de biomasa.

Los residuos que se seleccionaron para la producción de los biocarbones fueron: hojas de cebolla larga, hojas de maíz y cascara de arveja, por su gran contenido fibra y celulosa, los cuales se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de la biomasa.

<i>Caracterización de la biomasa</i>		
<i>Residuo</i>	<i>% de Fibra</i>	<i>% de Celulosa</i>
<i>Hojas de cebolla larga</i> <sup>2</sup>	15	40
<i>Hojas de maíz</i> <sup>1</sup>	23,00	43,14
<i>Cascara de arveja</i> <sup>3</sup>	55,07	45*

Fuente: Elaborado por las autores a partir de <sup>1</sup>(Maribel Prado, 2012), <sup>2</sup>(Velandia, 2016) y <sup>3</sup>(Alasino, 2009).

La recolección y clasificación de los residuos se realizó por selección manual directamente en la fuente.

Pretratamiento de la biomasa. El pretratamiento para producción de biochar. Para la producción de biochar se secaron los residuos en una estufa eléctrica marca mwd, durante 24 horas a una temperatura de 105 °C, condiciones de referencia contempladas en la norma GG-8 Determinación de contenido de humedad. Para los residuos utilizados en la producción de hidrochar no es necesario realizar ningún pretratamiento.

**Producción de Hidrochar por Carbonización hidrotermal.** En la producción del hidrochar, se usó la tecnología de carbonización hidrotermal, donde se introdujo cada tipo de biomasa por separado en autoclave marca sterilof, a una temperatura de 180 °C y una presión 2,2 bares durante 3 horas después del proceso de carbonización, se comprimió la biomasa y luego se secó en estufa de aire a una temperatura de 105°C durante 24 horas. Terminado el proceso de secado en la estufa, los residuos de biomasa fueron llevados a un molino de pines que gira a 3600 RPM y tamizado en un tamiz de 1,2 mm.

**Producción de Biochar por Pirolisis por Microondas.** Los residuos previamente secados se someten a un proceso de molienda y pulverización. La biomasa pulverizada se pasó por un tamiz # 170 que equivale a un tamaño de grano de 0,09 mm y luego fue puesta dentro de capsulas de porcelana con una capacidad de 400 a 450 g, para terminar con el proceso de pirolisis se usó un horno microondas convencional, utilizando el 60% de potencia, manejando un tiempo total de 30 min aproximadamente (según el tipo de residuo), en segmentos de 30 segundos hasta observar un cambio de color a negro.

**Caracterización fisicoquímica de los biocarbones.** Una vez terminado el proceso de producción de biochar e hidrochar se hizo la caracterización de los biocarbones en donde se analizaron los parámetros relacionados en la tabla 2:

Tabla 2. Parámetros analizados en los biocarbones.

<b>PARAMETRO</b>	<b>MÉTODO</b>
<i>Densidad Aparente</i>	Gravimetría
<i>pH</i>	Potenciometría
<i>Carbono Orgánico</i>	Walkley Black
<i>Conductividad Eléctrica</i>	Potenciometría
<i>C.I.C</i>	Volumetría
<i>Nitrógeno Total</i>	Suma de Nitrógenos
<i>Área Superficial</i>	Tamaño de partícula

Fuente: Adaptado de Calderón (2017).



**Adecuación y Caracterización del suelo.** Se hizo la delimitación del área a tratar, encerrando 3 parcelas cada una de 2x2, separadas 30 cm entre ellas y se descapoto el suelo retirando los primeros 20 cm. Y se tomó muestras de suelo, el tipo de muestreo fue en forma de zig-zag del cual se tomaron 8 submuestras a lo largo y ancho de cada parcela, mezclando estas y homogenizando, se tomó de la muestra homogénea un kilogramo y se analizaron los siguientes parámetros:

Tabla 3. Parámetros analizados en el suelo.

<b>PARAMETRO</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>DETERMINACIÓN</b>
<i>Carbono Orgánico</i>	Walker y Black	Captura de Carbono
<i>Capacidad de Intercambio catiónico</i>	Acetato- NH <sub>4</sub> 1M pH 7 y NaCl; Volumétrico	Potencial de retención
<i>Nitrógeno Total</i>	Método Kjeldahl	Estabilidad del suelo
<i>Materia Orgánica</i>	Cálculo	Relación CO
<i>Relación C/N</i>	Cálculo	Estabilidad en el suelo
<i>Relación C/MO</i>	Cálculo	Relación CO
<i>Densidad Aparente</i>	Cilindro	Cálculo de CO <sub>2</sub> eq
<i>pH</i>	Potenciometría	Posibles cambios de pH
<i>Textura</i>	Bouyucos	cambios de textura

Fuente: Elaborado por los autores.

Los análisis de densidad aparente y textura fueron realizados en el laboratorio de la universidad de la Salle sede candelaria Bogotá, siguiendo el método del cilindro del manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos del SENA (Giraldo, 2013) y el método de Bouyucos del manual de suelos. Guía de laboratorio y campo (Campos, 2012), respectivamente. El pH fue tomado in situ con un pH metro de suelos HANNA, tomando en cada una de las parcelas 5 puntos de toma de datos, y posteriormente haciendo un promedio de los mismos para obtener un dato significativo de cada parcela. Las relaciones C/N y C/MO fueron calculadas con los datos obtenidos de Carbono Orgánico y Nitrógeno Total reportados en la tabla 7 resultados de análisis de suelo.

**Aplicación de los biocarbones.** Teniendo delimitado el terreno se aplicaron los biocarbones en dos parcelas, dejando la restante como blanco. Se agregó la masa total de biochar e hidrochar en tres aplicaciones por cada parcela, haciendo una mezcla

con ayuda de una horqueta entre cada aplicación y al final de esta, para lograr una compenetración de los biocarbones con el suelo. En cada una de las parcelas se aplicó el 1% de la masa del suelo en biochar e hidrochar a condiciones ambiente.

**Medición de la relación entre materia orgánica y captura de CO<sub>2</sub>.** Finalmente para determinar si el aumento de materia orgánica en el suelo se relaciona con la presencia de carbono orgánico, se utiliza una serie de ecuaciones, que permiten calcular el carbono orgánico del suelo, el carbono en el área, incremento de carbono y finalmente cálculo de Ceq (CO<sub>2</sub>eq), todas las ecuaciones descritas en cada etapa se usaron con base al documento: “manual Técnico: Guía para la Determinación de carbono en pequeñas comunidades rurales” (Rügnitz, Chacón, & Porro., 2009)Chacón, & Porro., 2009.

### Calculo del carbono orgánico en el suelo

*Ecuación 1. Cálculo de carbono orgánico en el suelo.*

$$COS = \sum_{horizonte-1}^{horizonte-n} COS_{horizonte} = \sum_{horizonte-1}^{horizonte-n} ([COS] * \delta a * P * d * (1 - frag) * 10)_{horizonte}$$

Dónde:

COS= Contenido de carbono orgánico en el suelo, representativo del tipo del uso del suelo (t C/ha).

COS<sub>horizonte</sub>= Contenido de carbono orgánico en el suelo para un determinado horizonte (t C/ha).

[COS]= Concentración de carbono orgánico del suelo para una determinada masa de suelo obtenida del análisis de laboratorio (g C/ kg suelo).

δa = Densidad aparente, masa de suelo por volumen de muestra (t de suelo m<sup>3</sup>).

P = Profundidad del horizonte o espesor de la capa de suelo, en metros (m).

Frag= Volumen porcentual de fragmentos gruesos/100, sin dimensiones.

**Calculo del área del proyecto.** Para calcular el carbono total del área, se debe sumar el carbono calculado parcialmente para cada uno de los estratos, para este caso solo se calcularon en la biomasa superficial del suelo.

*Ecuación 2. Calculo de carbono del área.*

$$\Delta C_{proyecto} = \sum \Delta C_{estratos}$$

*Ecuación 3. Cálculo del carbono en el estrato de biomasa superficial del suelo.*

$$C_{estratos} = (\Delta C_{BSA}) * area\ del\ estrato$$

$$\Delta C_{BSA} = biomasa\ sobre\ el\ suelo\ (t\ C/ha)$$

**Calculo del incremento de carbono.** El incremento del stock de carbono del proyecto resulta de la diferencia en las cantidades de carbono calculadas en dos momentos de medición.

*Ecuación 4. Incremento de carbono.*

$$\Delta C_{incremental} = C_{t_2} - C_{t_1}$$

$\Delta C_{incremental}$  = Incremento cantidad de carbono área total del proyecto (t C).

$C_{t_1}$  = Cantidad de carbono del proyecto en el momento  $t_1$ , considerando la superficie total (t C).

$C_{t_2}$  = Cantidad de carbono del proyecto en el momento  $t_2$ , considerando la superficie total (t C).

**Calculo del carbono equivalente.** Finalmente, las reducciones de emisiones resultantes de proyectos agroforestales son contabilizadas en forma de certificados de reducción de emisiones (CRE) y negociadas en mercados internacionales de carbono. Un CRE corresponde una tonelada métrica de CO<sub>2</sub>eq, calculada en base al potencial de calentamiento global de este gas. Una tonelada de carbono equivale a 3,67 toneladas de CO<sub>2</sub>eq (obtenido en razón de los pesos moleculares 44/12). Para saber la cantidad de CO<sub>2</sub>eq emitido o almacenado a partir de la cantidad de carbono de un determinado depósito se multiplica esta por 3,67.

### 3 RESULTADOS

**Calculo del área superficial de los biocarbones.** Siguiendo la metodología del tamaño de partícula descrita en la norma ASTM C-136-01, se obtuvieron los resultados en la tabla 4:

Tabla 4. Análisis por Tamizado Hidrochar.

Tamiz #	Abertura del tamiz (mm)	Masa retenida g	Fracción de masa retenida xi	Diámetro medio de partículas Dp (mm)	xi/dp
18	1	0,4	0,001		
20	0,85	4,2	0,014	0,925	0,015
35	0,5	59,8	0,199	0,675	0,295
40	0,425	47	0,157	0,463	0,339
170	0,09	160,1	0,534	0,258	2,072
Plato	-	26	0,087	-	-

Fuente: Elaborado por los autores.

Una vez determinados estos datos se aplicó la metodología descrita por (McCabe et al., 2002) para determinar área superficial, usando la siguiente ecuación:

$$A = \frac{6m}{\Phi_s \rho_p D_p}$$

Donde  $m$  y  $\rho_p$  son la masa total y la densidad de las partículas respectivamente y  $\Phi_s$  es el factor de esfericidad de las partículas, el cual se tomó 0,6 para los dos biocarbones por ser materiales triturados (McCabe et al., 2002). Pero como se tiene una mezcla de partículas, esta se divide en fracciones, cada una de densidad y tamaño aproximadamente constante, por lo anterior cada fracción se pesa y se aplica la siguiente ecuación:

$$A_w = \frac{6}{\Phi_s \rho_p} \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\bar{D}_{pi}}$$

Dónde:

$x_i$  = fracción de masa en un determinado incremento,  $n$  = número de incrementos y  $\bar{D}_{pi}$  = diámetro promedio de las partículas, obteniendo como resultado de la fracción constante  $\frac{6}{\Phi_s \rho_p} = 19.230,77$  y la sumatoria de  $\frac{x_i}{\bar{D}_{pi}} = 2,722$ , además como se debe excluir la fracción recogida en el plato receptor, se divide los resultados anteriormente descritos en  $1-x_i$ , por tanto  $1 - 0,087 = 0,913$ , Entonces el Área superficial para el hidrochar fue:

$$A_w = \frac{19.230,77 * 2,722}{0,913} = 57.306,44 \frac{mm^2}{g}$$

Para calcular el dato de área superficial en unidades del sistema internacional se divide en 10.000.000 para pasar a unidades de  $\frac{m^2}{g}$

$$A_w = 57.306,44 \frac{mm^2}{g} * \left( \frac{1 m^2}{10.000.000 mm^2} \right) = 0,057 \frac{m^2}{g}$$

El área superficial para el biochar, se determinó de la misma forma descrita anteriormente.

### Calculo de la Masa y Densidad del Suelo

**Masa del suelo:** se halló con la diferencia de pesos de las capsulas, con las muestras de suelo húmedo y después del secado especificados en la tabla 5.

Tabla 5. Cálculo de la masa del suelo.

<b>Capsula vacia (g)</b>	<b>Capsula + Suelo húmedo(g)</b>	<b>Capsula + Suelo seco (g)</b>	<b>Diferencia de pesos masa de suelo (g)</b>
155	385,9	321,1	64,8

Fuente: Elaborado por los autores.

**Densidad del suelo:** una vez los valores de la masa del suelo y el volumen del cilindro se conocen, se calcula la densidad aparente:

*Ecuación 5. Cálculo de la densidad aparente del suelo.*

$$\delta = \frac{m}{v}$$

Dónde:  $m$  = masa del suelo,  $v$  = volumen del cilindro

$$\delta = \frac{64,8g}{205 \text{ cm}^3} = 0,32 \frac{g}{\text{cm}^3}$$

Se hace el cambio de unidades de  $\text{cm}^3$  a  $\text{m}^3$  para tener unidades del SI:

$$205 \text{ cm}^3 = \left( \frac{1\text{m}^3}{1.000.000\text{cm}^3} \right) = 2,5 \times 10^{-4} \text{m}^3$$

**Masa de biocarbones para aplicación en el suelo.** Para saber la dosis de aplicación de los biocarbones, fue necesario determinar el volumen de cada una de las parcelas:

*Ecuación 6. Volumen de cada parcela.*

$$V = L * A * \text{profundidad}$$

$$V = 2m * 2m * 0,2 \text{ m} = 0,8\text{m}^3$$

Para calcular la masa del suelo que se tiene en cada parcela, teniendo en cuenta un volumen de  $0,8\text{m}^3$  se hace el siguiente cálculo:

$$64,8g \rightarrow 2,5 \times 10^{-4} \text{m}^3$$

$$x \rightarrow 0,8\text{m}^3$$

$$x = 207,300g$$

$$207,300g = \left( \frac{1kg}{1000g} \right) = 207,3 \text{ kg}$$

Cálculo de la masa de biocarbones necesaria por parcela con 1% de la masa del suelo:

$$207,3 \text{ kg} * 1\% = 2 \text{ kg}$$

De las dos parcelas seleccionadas, a una se le agregan 2 kg de biochar y al otro 2 kg de hidrochar.

**Producción de biochar e hidrochar.** Para conocer cuál fue el rendimiento que se obtuvo durante el proceso de producción, se hizo el cálculo en base seca antes y después de la carbonización hidrotermal y la pirolisis por microondas, resultados que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Peso de biomasa usada.

<i>Materia Prima</i>	<i>Biocarbón para Transforma</i>	<i>Cebolla (Kg)</i>	<i>Maíz (Kg)</i>	<i>Arveja (Kg)</i>	<i>Total (Kg)</i>
<b>Peso Inicial Biomasa</b>	<b>Biochar</b>	13	13	13	39
	<b>Hidrochar</b>	12,5	12,5	12,5	37,5
<b>Peso Final Biomasa</b>	<b>Biochar</b>	0,80	1,56	1,50	3,86
	<b>Hidrochar</b>	0,90	3,12	1,93	5,95
<b>Peso Final después de Calentamiento</b>	<b>Biochar</b>	0,71	1,48	1,46	3,65
	<b>Hidrochar</b>	0,85	3,06	1,89	5,8

Fuente: Elaborado por los autores.

Una vez se obtuvieron estos pesos, se realizó el cálculo del porcentaje de eficiencia del proceso de la siguiente forma:

$$\% \text{ de eficiencia} = \frac{\text{Kg de biocarbon resultante}}{\text{Kg de biomasa de entrada}} * 100$$

Obteniendo así los resultados relacionados en la tabla 7:

Tabla 7. Porcentaje de eficiencia en la producción de biocarbones.

<i>Biocarbón</i>	<i>Cebolla %</i>	<i>Maíz %</i>	<i>Arveja %</i>	<i>Total (%)</i>
<b>Biochar</b>	88,75	94,87	97,33	94,56
<b>Hidrochar</b>	94,44	98,08	97,93	97,48

Fuente: Elaborado por los autores.

**Caracterización de biocarbones.** En la tabla 8 se observa una síntesis de los resultados de la caracterización fisicoquímica de los biocarbones.

Tabla 8. Caracterización Físicoquímica de biocarbones.

<b>Parámetro</b>	<b>Hidrochar</b>	<b>Biochar</b>
<b>Densidad Aparente (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,52	0,29
<b>pH en 10%</b>	4,62	7,47
<b>Conductividad Eléctrica (dS/m)</b>	0,60	0,59
<b>C.I.C (meq/100g)</b>	43,30	36,80
<b>Nitrógeno Total (% P/P)</b>	1,52	1,92
<b>Carbono Orgánico Oxidable Total (% P/P)</b>	39,05	29,41
<b>Área Superficial*</b>	0,057	0,078

Fuente: Elaborado por los autores.

**Caracterización del suelo.** Para la comparación de las condiciones en el suelo, una vez se aplicaron los biocarbones, se realizó el análisis del suelo en el laboratorio de suelos del IGAC, resultados sintetizados en tabla 9.

Tabla 9. Caracterización Físicoquímica del suelo.

<b>Tiempo de Aplicación</b>		<b>Carbono Orgánico (%)</b>	<b>Nitrógeno Total (%)</b>	<b>C.I.C</b>	<b>Textura</b>	<b>pH</b>	<b>MO</b>	<b>C/N</b>	<b>CMO</b>
<b>INICIAL</b>	<b>Parcela 1</b>	0,810	0,356	19,381	Franco Limoso	5,39	1,395	2,275	0,581
	<b>Parcela 2</b>	0,150	0,359	20,331	Franco Limoso	5,41	0,258	0,417	0,581
	<b>Blanco</b>	0,470	0,386	20,999	Franco Limoso	5,40	0,810	1,217	0,581
<b>FINAL</b>	<b>Parcela 1 Biochar</b>	3,13	0,4233	18,147	Franco Limoso	5,69	5,391	7,394	0,581
	<b>Parcela 2 Hidrochar</b>	2,89	0,4234	21,035	Franco Limoso	5,62	4,978	6,755	0,581
	<b>Blanco</b>	0,471	0,386	20,999	Franco Limoso	5,40	0,811	1,218	0,581

Fuente: Elaborado por los autores.

**Calculo del carbono orgánico.** La tabla 11 hace referencia al aumento de carbono orgánico en el suelo en el área de estudio, los datos fueron determinados con respecto a las ecuaciones medición de la relación entre materia orgánica y captura de CO<sub>2</sub> en el suelo.

#### Calculo de CO<sub>2eq</sub> para Biochar

$$COS = \sum_{horizonte-1}^{horizonte-n} COS_{horizonte} = \sum_{horizonte-1}^{horizonte-n} ([COS] * \delta a * P * d * (1 - frag) * 10)_{horizonte}$$

**Contenido de carbono orgánico representativo del tipo de uso de suelo (t C/ha).** Teniendo en cuenta que el valor del carbono orgánico en el suelo se determinó usando una muestra de 0,1 kg, los gramos de C fueron 2,32.

$$COS = \left( \frac{2,32 \text{ g C}}{0,1 \text{ Kg}} \right) * \left( 0,29 \frac{\text{t}}{\text{m}^3} \right) * (0,20 \text{ m}) * 1 * (0,51) * 10$$

$$COS = 6,80 \frac{\text{t C}}{\text{ha}}$$

### Cambio de Carbono en el proyecto

$$C_{estratos} = (\Delta C_{BSA}) * \text{area del estrato}$$

Aplicando la fórmula de COS descrita anteriormente, se calculó el carbono en el suelo antes y después de la aplicación del biochar, este dato depende del área trabajada en el proyecto en hectáreas, que para este caso fue de 0,0004 ha.

$$\Delta C = 6,80 \frac{\text{t C}}{\text{ha}} * 0,0004 \text{ ha} = 0,00272 \text{ t C}$$

### Calculo CO<sub>2</sub>eq

Una vez se obtuvo el carbono orgánico en el área trabajada, para saber la reducción en las emisiones, se multiplica por el 3,67 que corresponde al valor de una tonelada de carbono equivalente.

$$\text{CO}_2\text{eq} = 0,00272 \text{ t C} * 3,67 = 0,0100 \text{ t C}$$

El principal parámetro del suelo para la aplicación de las ecuaciones, es el contenido de carbono orgánico, que para este caso solo se determinó en los primeros 20 cm del suelo, resultados que se reportaron en la tabla 10 antes y después de la aplicación de los biocarbones en el suelo.

Tabla 10. Cambios en contenido de Carbono del suelo, Ton de CO<sub>2</sub> eq.

Parámetros	Hidrochar		Biochar	
	Antes	Después	Antes	Después
<b>COS (t C/ha)</b>	2,32	7,93	2,62	6,80
<b>ΔC Proyecto (t C)</b>	0,00093	0,00317	0,00105	0,00272
<b>ΔC Incremental</b>	0,002247		0,001673	
<b>Ton CO<sub>2</sub>-eq</b>	0,0034	0,0116	0,0038	0,0100

Fuente: Elaborado por los autores.



## 4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

**Producción de biochar e hidrochar.** Las eficiencias de producción en los biocarbones se terminaron en base seca, los cuales se muestran en la tabla 7; para el caso del biochar la tecnología de pirolisis por microondas tuvo un rendimiento de 94,56% para la totalidad de la biomasa usada, siendo la cascara de la arveja el residuo con menor porcentaje de pérdida del 2,67%, seguido de la cascara del maíz con un 5,13% de pérdidas y finalmente la cebolla con 11,25 %. La hoja de cebolla tuvo un porcentaje menor de rendimiento, porque tiene mayor cantidad de sustancias volátiles. Las cascara de arveja y maíz, por el contrario, por su mayor contenido de celulosa y menor concentración de sustancias volátiles, su rendimiento de producción fue mayor.

Con respecto al proceso de carbonización hidrotermal, aunque la cebolla tuvo igualmente el menor rendimiento en comparación con los otros dos residuos usados, fue un valor que se mantuvo sobre el 90% y en forma general, comparado con la pirolisis se alcanzaron mayores rendimientos de producción con un total de 97,48%, este porcentaje de rendimiento, se traduce en menos emisiones de gases durante su producción, ya que las condiciones de temperatura y presión manejadas en el proceso de descomposición térmica generan un control sobre las sustancias volátiles, propias de la biomasa.

Estas dos tecnologías aplicadas tienen mayores rendimientos de producción en comparación otras variaciones del proceso de pirolisis, como es el caso de la pirolisis lenta donde se obtienen rendimientos entre el 25 y 35% (Piñeros & Hernandez, 2017), esto significa que ese 75% restante son emisiones de gases a la atmosfera, mientras que solo el 5,44 % y el 2,52% fueron emisiones para pirolisis por microondas y carbonización hidrotermal, respectivamente, esto se relaciona directamente con la minimización de los impactos ambientales por generación de gases contaminantes.

### 4.1 EFECTOS DE LOS BIOCARBONES EN EL SUELO

#### **Carbono orgánico y materia orgánica.**

En la caracterización de los biocarbones el porcentaje de carbono orgánico del biochar fue de 29,41%, un contenido más bajo que el del hidrochar con 39,05%, esto nos indica que el hidrochar permitió una mayor fijación del carbono aportado directamente por la materia prima usada. El suelo de las parcelas donde se aplicaron los biocarbones inicialmente tenía una cantidad baja de carbono orgánico con un porcentaje de 0,810 % para biochar y 0,150% para hidrochar, después de los dos meses de aplicación hubo un aumento de 2,32%, en la parcela de biochar alcanzando un valor máximo de carbono orgánico de 3,13%; y el aumento para hidrochar fue de 2,74%, obteniendo un valor final

de 2.89%. Comparando este parámetro con los efectos dados por los biocarbones, fue el hidrochar el que aportó gran porcentaje de carbono orgánico al suelo, posiblemente porque este contenido de carbono es menos resistente a la mineralización, ya que en tan solo dos meses logró un 7 % de estabilización, el carbono contenido por el biochar tiene un proceso más lento de estabilización en el suelo, los suelos de las parcelas analizadas.

La adición de los biocarbones, provocó un descenso en el valor de la densidad aparente en el suelo, aplicando una dosis al 1 %, esta describe la relación entre sólidos y espacio poroso, esto implica la formación de agregados más estables por la variación del contenido de materia orgánica, esto hace que existan espacios de aire dentro de las unidades del suelo, mejorando la absorción, retención de agua y los nutrientes del suelo, (Keller, 2010). Gracias al área superficial de los biocarbones, su interacción con el suelo permitió la adsorción de  $\text{CO}_2$  directamente de la atmósfera, esto se evidenció en el aumento de la materia orgánica final en las parcelas, la cual se complementa con el aporte de los biocarbones. La reducción de gases de efecto invernadero, en este caso  $\text{CO}_2$ , se logra en parte gracias a la captura de carbono en el suelo, el proceso hace que este absorba y transforme el  $\text{CO}_2$  en carbono orgánico y aumente a su vez la estabilidad de la materia orgánica; los biocarbones aportaron al aumento de la materia orgánica casi 5 veces, siendo el hidrochar el más significativo, gracias a su contenido de carbono orgánico y porosidad pudo capturar más  $\text{CO}_2$ .

**Nitrógeno total y relación carbono / nitrógeno.** El porcentaje total de nitrógeno, no sufrió ningún cambio considerable siendo el factor determinante el tiempo, pues para que haya un aumento significativo de nitrógeno tiene que existir una interacción entre un cultivo o una planta para la fijación de este. En este caso el aumento de nitrógeno fue aportado directamente por los biocarbones, pues antes de la aplicación, el porcentaje inicial de nitrógeno tenía valores de 0,356% para la parcela donde se agregó biochar y 0,359% para hidrochar, después de la aplicación de los biocarbones, el porcentaje de nitrógeno aumentó a 0,4233% para biochar y 0,4234 % para hidrochar, resultado que no afectó el rango óptimo de nitrógeno en el suelo. La relación Carbono Orgánico/Nitrógeno mide la estabilidad de la materia orgánica, gracias al aumento del Carbono Orgánico. En los resultados reportados para la relación  $\text{CO}/\text{N}$ , se observó un aumento significativo, principalmente por el porcentaje de carbono orgánico aportado por la mineralización de los biocarbones en el suelo y la captura de  $\text{CO}_2$ ; este aumento 6 veces con respecto a su valor inicial en la parcela de hidrochar y 5 veces en la de biochar, demostrando que el hidrochar por su mayor contenido de carbono orgánico aportó mayor estabilidad de la materia orgánica del suelo.

**Capacidad de intercambio catiónico (CIC) y pH.** Aunque el valor del pH de los biocarbones sugiere una alteración de este en el suelo, para biochar e hidrochar solamente hubo un aumento de 0.3 y 0.21 % respectivamente; esto puede justificarse por la estabilidad que el incremento de materia orgánica aporta al suelo, que además al generar un efecto coloidal en éste permite mejorar su capacidad para neutralizar el pH (capacidad buffer). Inicialmente el pH de las parcelas de estudio fue de 5.40, y posterior a la aplicación de los biocarbones paso a ser medianamente ácido con un pH de 5.65 para biochar 5.62 para hidrochar. Aunque el hidrochar tenía un pH ácido no acidificó el suelo en los dos meses de estudio, esto significa que el pH tiene un cambio gradual con respecto al tiempo, el cual tiende a ser alcalino (A. E. Rebolledo et al., 2016); Para el caso del biochar con un pH de 7.47, considerado ligeramente alcalino, en interacción con el suelo provocó un mayor aumento de este en comparación con el hidrochar. El Biocarbón por lo general incrementa la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo y, por lo tanto, la retención de iones, lo anterior se verifica principalmente por el comportamiento observado en la parcela de hidrochar, que paso de 20,331 a 21.036. Pero contrario a esto, el en la parcela de biochar, este parámetro disminuyó, posiblemente debido a que se presentó saturación y menor producción de grupos intercambiables.

#### **Proyecciones de captura de CO<sub>2</sub> eq a mayor escala.**

La forma en la que se comercializa la reducción de toneladas de CO<sub>2</sub> es la venta de bonos de carbono, que consiste en que si una empresa o país logra reducir sus emisiones de CO<sub>2</sub> puede poner en venta dicha reducción a países desarrollados que estén en obligación de emitir menos gases (Mendez & Restrepo, 2013). Con todo lo anterior, para conocer el valor de las toneladas de CO<sub>2</sub>eq capturadas en el suelo por la aplicación de los biocarbones en el área del proyecto, que fue de 0,0004 ha (4 m<sup>2</sup>) y su efecto en un tiempo de 2 meses, se hizo una proyección del comportamiento de los biocarbones, en la captura de carbono en un área de 20 hectáreas, asumiendo tiempos de 2, 6, 12 y 18 meses, (tiempo máximo en el que los biocarbones se mineralizan en su totalidad), además se tuvo en cuenta, la misma dosis de aplicación de biocarbones 1%, el mismo tipo de suelo, su densidad aparente y la concentración de CO resultantes del suelo estudiado en el proyecto, la proyección realizada, se hizo con base en los resultados obtenidos durante los dos meses después de la aplicación de los biocarbones y calculando las toneladas de CO<sub>2</sub>eq.

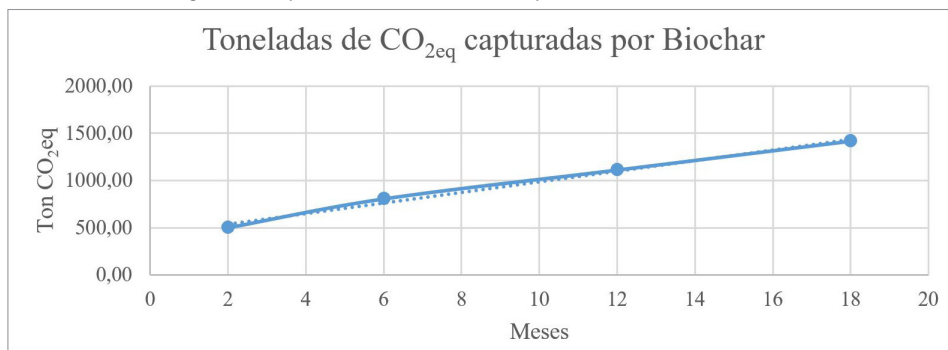
Tabla 11. Proyección de Captura de Carbono del Biochar.

<i>BIOCHAR</i>			
<i>Tiempo (meses)</i>	$\Delta C t$	COS (t C/ha)	t CO <sub>2</sub> eq
2	83,59	6,80	499,25
6	167,19	10,98	805,93
12	250,79	15,16	1112,74
18	334,39	19,34	1419,56

Fuente: Elaborado por los autores.

Como se observa en la tabla 11, los datos correspondientes a los 2 meses, fueron la base para la proyección de esta, teniendo en cuenta que en este tiempo hubo un incremento de 4,18 t C/ha, suponiendo un incremento lineal en la captura de Carbono, a un tiempo de 18 meses se ha capturado un total de 1.419,6 t CO<sub>2</sub>eq, en un área de 20 hectáreas.

Figura 1. Comportamiento Grafico de la captura de Carbono del Biochar.



Fuente: Elaborado por los autores.

Con respecto al comportamiento gráfico, la línea de tendencia rectifica un comportamiento lineal de la captura de carbono en el suelo por parte del biochar, además se comprueba igualmente con el factor R<sup>2</sup>, el cual es de 0,9919. Referente a la cantidad de dinero, una tonelada de CO<sub>2</sub>eq tiene un valor entre \$ 5.000 y \$ 20.000 (González, 2015), al calcular el valor con las toneladas capturadas a 18 meses, la ganancia sería mínimo de \$70 '978.000 utilizando biochar.

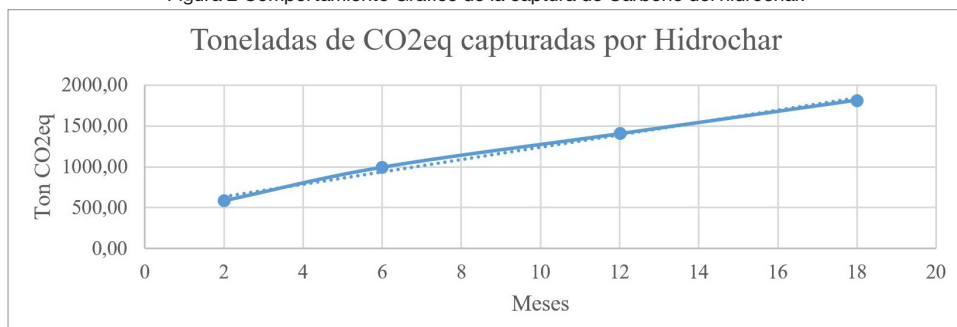
Tabla 12. Proyección de Captura de Carbono del Hidrochar.

<i>HIDROCHAR</i>			
<i>Tiempo (meses)</i>	$\Delta C t$	COS (t C/ha)	t CO <sub>2</sub> qe
2	112,27	7,93	582,25
6	224,47	13,54	993,84
12	336,67	19,15	1405,61
18	448,87	24,76	1817,38

Fuente: Elaborado por los autores.

En cuanto al hidrochar, el aumento fue de 5,61 t C/ha, en comparación con el biochar, aparte de que fue el que más capturo C del suelo, este valor le permite una relación mayor con respecto al incremento de captura que se da en el tiempo, lo que se rectifica tanto en la tabla 12 como en la gráfica de la figura 2.

Figura 2 Comportamiento Grafico de la captura de Carbono del hidrochar.



Fuente: Elaborado por los autores.

Considerando un tiempo de dos meses con una dosis de aplicación de biocarbones al 1%, la captura de CO<sub>2</sub>eq fue de 582,25 toneladas aumentando hasta 1817,38 toneladas a los 18 meses de aplicación. La ganancia de dinero, utilizando el hidrochar como medio de captura de carbono a 18 meses, con un total de 1817,38 toneladas de CO<sub>2</sub>eq, es de \$90 '869.000.

Aunque la diferencia en el aumento de la captura de las toneladas de C por hectárea es diferente para ambos biocarbones, como se observa en las figuras 1 y 2 la proyección en ambos casos tiene un comportamiento lineal, y los valores no representan un gran cambio, lo que permite inferir que aunque el hidrochar sigue teniendo mejor capacidad para capturar Carbono del suelo, el biochar también es una buena alternativa de aplicación.

**Proyección cantidad de biomasa.** Referente a la producción de biocarbones, ya que se usa como materia prima residuos orgánicos, se hizo una proyección de las toneladas de residuos orgánicos necesarios para realizar aplicaciones de 1%, 2% y 5%, en un área de 20 ha, esto se calculó con respecto a los resultados obtenidos en el estudio, relacionados en la tabla 14. Además, se tuvo en cuenta la misma densidad (0,32 g/cm<sup>3</sup>) y la misma profundidad (0,20 cm), datos necesarios para calcular la masa del suelo.

Tabla 13. Cantidad de Biomasa para producción de Biocarbones; Cantidad de Biocarbones producidos.

<i>Biocarbón</i>	<i>Biomasa Total Para Producción de Biocarbones (kg)</i>	<i>Masa de biocarbones Producidos (kg)</i>
<i>Biochar</i>	39	3,65
<i>Hidrochar</i>	37,5	5,8
<i>Total</i>	76,5	9,45

Fuente: Elaborado por los autores.

Se usó un total de 76,5 kg de residuos orgánicos para producir 9,45 kg de biocarbones; independientemente de la cantidad que se produjo de cada Biocarbón, la proyección se hizo teniendo en cuenta la cantidad total de biomasa requerida. Estos resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Proyección cantidad de residuos orgánicos para producción de Biocarbones.

<i>Dosis (%)</i>	<i>Kg Biocarbones</i>	<i>Ton Biocarbones</i>	<i>Kg Biomasa</i>	<i>Ton Biomasa</i>
1%	128.000	128	1'036.190,48	1.036,190
2%	256.000	256	2'072.380,95	2.072,38
5%	640.000	640	5'180.952,38	5.180,95

Fuente: Elaborado por los autores.

Con esta proyección, además de conocer la cantidad de biocarbones necesarios para aplicar al suelo dependiendo de una dosis específica, también permite saber la cantidad de residuos orgánicos requeridos para la producción de los mismos, así, que para aplicar biocarbones con una dosis al 1% se necesitan 1.036 toneladas de residuos, para una dosis de aplicación del 2%, 2.072 toneladas y para dosis del 5%, 5.180 toneladas de residuos.

Si se tiene en cuenta la cantidad de residuos orgánicos generados en la ciudad de Bogotá para el año 2012, según el Boletín No 41, del informe de Bogotá de estadísticas, consumo de alimentos y producción de residuos sólidos orgánicos en el suelo residencial urbano de Bogotá DC, publicado en la alcaldía de Gustavo Petro, en Bogotá de produjeron 2.770 ton/día, pero teniendo en cuenta que la producción de los biocarbones aproximadamente duro un mes, con este dato se tendrían 83.100 ton/mes, cantidad con la que se supliría la producción de los biocarbones si se aplica una dosis de 5%. Esto permite inferir que la cantidad de residuos llevados a disposición final disminuiría, pues la cantidad de residuos generada es suficiente para producir 16 veces dicha cantidad de residuos en dosis de 5%.

## CONCLUSIONES

El hidrochar, fue el Biocarbón que logro capturar la mayor cantidad de CO<sub>2</sub>eq de la atmosfera, con respecto al biochar, debido a su contenido de carbono orgánico, además porque fue el que más apporto carbono orgánico, parámetro que se relaciona directamente con el incremento de la materia orgánica.

Aunque, el biochar y el hidrochar son productos solidos ricos en carbono orgánico y se utilizan para las enmiendas de suelo, se producen a partir de un proceso y condiciones de pretratamiento completamente diferentes y sus propiedades físicas y químicas difieren significativamente.

El suelo entisol, característico de la zona de la finca Villa María donde se realizado el proyecto, paso de clasificarse como un suelo con bajo contenido de CO a un suelo con alto contenido de CO, según la tabla 1, después de la aplicación de los biocarbones.

Los resultados obtenidos, permiten concluir que el aumento de la Materia Orgánica en el suelo efecto de la mineralización de los biocarbones, tiene una relación directa con la cantidad de CO<sub>2</sub> capturada de la atmosfera.

Las tecnologías de pirolisis por microondas y carbonización hidrotermal, tienen mayores eficiencias de producción comparado con los rendimientos de otras formas de pirolisis, registrado en la tabla 8, porque su producción genera menos de 10% de emisiones de gases, mientras que, en tecnologías como la pirolisis lenta, las emisiones son de más del 60%.

La producción de hidrochar y biochar ayudan a minimizar los impactos producidos por la generación de residuos orgánicos, ya que además de disminuir la disposición final en rellenos sanitarios, da un valor agregado para proponer nuevas tecnologías de aprovechamiento.

Independientemente del aporte de carbono orgánico al suelo por acción del hidrochar, se observó que la aplicación de los dos biocarbones aportaron mejoras en el suelo, pues las diferencias en la mayoría de resultados obtenidos no fueron significativas como lo muestra la tabla 10, esto sugiere un aporte positivo al suelo por las propiedades adquiridas de ambos biocarbones, propiedades que se atribuyen directamente a las tecnologías de pirolisis por microondas y carbonización hidrotermal.

## BIBLIOGRAFÍA

Agro Waste. (2013). *Carboinzacion Hidrotermal*.

Ahmad, M., Upamali, R., Lim, J., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., . . . Sik, Y. (2013). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *ELSEVIER*.

- Alasino, M. C. (2009). *Harina de arveja en la elaboracion de pan, estudio del efecto emulsionante como mejoradores de volumen y vida util.*
- Arellano, O., Flores, M., Guerra, J., Hidalgo, A., Rojas, D., & Strubinger, A. (2016). *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*. Obtenido de Hydrothermal Carbonization of Corncob and Characterization of the Obtained Hydrochar: <http://www.aidic.it/cet/16/50/040.pdf>
- Ballester, E. P. (Julio de 2012). *El proceso de carbonización hidrotérmica aplicado a la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/30137/Tesina%20Estefania%20Ponce.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Biochar info*. (20 de Diciembre de 2016). Obtenido de Biochar overview: <https://www.biochar.info/biochar.biochar-overview.cfml>
- Campos, R. (2012). *Manual de suelos. Guías de laboratorio y campo*. Bogota.
- Decreto 2981. (2013). Bogota.
- FAO. (2000). *Biología y manejo de chisas*.
- FAO. (2011). *TENDENCIA GENERAL DE LA CAPTURA DE CARBONO EN EL SUELO*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/005/Y2779S/y2779s05.htm#TopOfPage>
- FAO. (2014). *Consideraciones sobre el manejo agronomico*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i4956s.pdf>
- FAO. (SF). *Coleccion: Acuicultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/faoterm/es/>
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (1994). *The research progress of biomass pyrolysis processes*. EEUU: Board.
- Geograf. (2008 ). *Mecanismos de Condensación*. Obtenido de <http://www.um.es/geograf/clima/tema05.pdf>
- Giraldo, J. C. (2013). *Manual de Prácticas de campo y del laboratorio de suelos*. Tolima.
- Gomez, A., Klose, W., & Rincon, S. (2008). *Pirolisis de Biomasa. Cuesco de palma de aceite*.
- GÓMEZ, I. D. (01 de Octubre de 2016). *Ingeniería Petrolera*. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/341522440/GEOLOGIA3>
- Gonzalez, M. (2000). *La Guía Química*. Obtenido de <http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/adsorcion>
- González, S. D. (25 de Octubre de 2015). *El Espectador*. Obtenido de <http://www.elespectador.com/noticias/economia/les-llego-hora-los-bonos-de-carbono-articulo-595060>
- Grossman, R. B. (S.F). *Pedogenesis and soil taxonomy II. Elsevier Science Publishers*, 55-99.
- Grupo de geotecnia facultad de minas . (SF). *Determinacion de contenido de humedad*. Medellin, Colombia.
- Huang, Y.-F., Chiueh, P.-T., Shih, C.-H., Lo, S.-L., Sun, L., Zhong, Y., & Qiu., C. (2015). *Microwave pyrolysis of rice straw to produce biochar as an adsorbent for CO2 capture*. China: Elsevier.



Ibrahim, M., Chacón, M., Cuartas, C., Naranjo, J., Ponce, G., Vega, P., ... Rojas, J. (2006). Almacenamiento de carbono en el suelo y la biomasa arbórea en sistemas de usos de la tierra en paisajes ganaderos de Colombia, Costa Rica y Nicaragua. *Agroforestería en las Américas* N° 45.

IGAC. (1982). Entisol. En A. C. Lombana, *Taxonomía de suelos*. Bogotá.

IGAC. (2000). *Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de cundinamarca*. Bogotá.

IGAC. (2002). *Geoportal, IGAC*. Obtenido de Mapa de suelos Colombia: <http://geoportal.igac.gov.co/ssig2.0/visor/galeria.req?mapald=6&title=Geopedolog%C3%ADa>

IGAC. (28 de Enero de 2017). *Tipos de suelo*. Obtenido de <http://www.igac.gov.co/wps/portal/igac/raiz/iniciohome/Glosario>

International Biochar Initiative. (20 de Diciembre de 2016). *International Biochar Initiative*. Obtenido de <http://www.biochar-international.org/definitions>

IPCC. (2001). *Anexo B, Tercer informe de evaluación Cambio Climatico 2001*.

IPCC. (2014). *Glosario de terminos*. Obtenido de IPCC.CH: <https://www.ipcc.ch/pdf/glossary/tar-ipcc-terms-sp.pdf>

IPCC, G. I. (2014). Obtenido de [https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/WG3AR5\\_SPM\\_brochure\\_es.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/WG3AR5_SPM_brochure_es.pdf)

Keller, T. H. (2010). Estimation of reference bulk density from soil particle size distribution and soil organic matter content.

Maribel Prado, M. J.-H. ( 2012). Characterization of maize leaves and of sugarcane bagasse to elaborate of a mixed cellulose pulp. *scielo org* , 8.

Márquez, L., Roy, A., & Castellanos, E. (2000). *Elementos Tecnicos para Inventarios de Carbono en uso del suelo* . Guatemala .

McCabe, W., Smith, J., & Harriott, P. (2002). *Operaciones unitarias en ingeniería química*. Mexico: Mc GrawHill.

MinAmbiente. (15 de julio de 2008). Resolución 0909 DE 2008. *Por la cual se establecen las normas y estándares de emisión admisibles de contaminantes a la atmósfera por fuentes fijas y se dictan otras disposiciones*. Bogotá, Colombia.

Ministerio de Ambiente. (2002). *Tecnologías de manejo integral de residuos sólidos*. Bogotá.

Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial . (15 de julio de 2008). RESOLUCIÓN 0909 DE 2008. *Por la cual se establecen las normas y estándares de emisión admisibles de contaminantes a la atmósfera por fuentes fijas y se dictan otras disposiciones*. Bogotá, Colombia.

Ministerio de vivienda, ciudad y territorio. (2013). DECRETO 2981.

Orbegozo, A. O. (2012). *Efectos de la aplicación de biochar en el modelo jerárquico de agregación de un suelo forestal bajo condiciones oceánicas*. Barcelona.

Organica, Q. (2003). *POLIMERIZACION*. Obtenido de <http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/organica/directorio/jaime/Polimeros.pdf>

- Ortega, L. P. (2013). *EL SUELO EDAFOLOGÍA*. Obtenido de [http://roble.pntic.mec.es/lorg0006/dept\\_biologia/archivos\\_texto/ctma\\_t10\\_suelo.pdf](http://roble.pntic.mec.es/lorg0006/dept_biologia/archivos_texto/ctma_t10_suelo.pdf)
- Pedraza, F. L. (12 de Diciembre de 2009). *Universidad Nacional de Colombia*. Obtenido de UN Periódico: <http://www.unperiodico.unal.edu.co/dper/article/bonos-de-carbono-negocio-ambiental-para-paises-industrializados.html>
- Piñeros, E., & Hernandez, F. (2017). *Evaluación del biochar producido por pirólisis lenta como medio adsorbente de zinc, cobre, cromo, níquel*. Bogota .
- Rebolledo, A. E., González, G. P., Moreno, C. H., Collado, J. L., Alves, J. C., Pacheco, E. V., & Barra, J. D. (2016). Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo. *TERRA LATINOAMERICANA VOLUMEN 34*.
- Rebolledo, M. A. (2013). *Biblio Colpos*. Obtenido de [http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2209/1/Escalante\\_Rebolledo\\_MA\\_DC\\_Edafologia\\_2013.pdf](http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2209/1/Escalante_Rebolledo_MA_DC_Edafologia_2013.pdf)
- Rügnitz, M., Chacón, M., & Porro, R. (2009). *Guía para la determinación de carbono en pequeñas propiedades rurales*. Lima.
- sefric. (2017). *sefric*. Obtenido de [http://www.sefric.com/02\\_01\\_hornos.php](http://www.sefric.com/02_01_hornos.php)
- Sistema Nacional de Información Ambiental, Chile. (S.F). *SINIA*. Obtenido de ¿Qué es el mercado del carbono?: <http://www.sinia.cl/1292/w3-article-48293.html>
- Song, Z., Yang, Y., Zhao, X., Sun, J., Wang, W., Mao, Y., & Ma, C. (2016). *Microwave pyrolysis of tire powders: evolution of yields and composition of products*. Obtenido de Science Direct: [http://ac.els-cdn.com/hemeroteca.lasalle.edu.co/S0360544215001814/1-s2.0-S0360544215001814-main.pdf?\\_tid=cd9813a8-c6fc-11e6-89bc-00000aab0f01&acdnt=1482270156\\_097aca4ad106bc47a8b4522002c7e7a1](http://ac.els-cdn.com/hemeroteca.lasalle.edu.co/S0360544215001814/1-s2.0-S0360544215001814-main.pdf?_tid=cd9813a8-c6fc-11e6-89bc-00000aab0f01&acdnt=1482270156_097aca4ad106bc47a8b4522002c7e7a1)
- Termodinamica. (2009). *Reacciones exotérmicas y endotérmicas*. Obtenido de [http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/upload/exo\\_endotermicas.pdf](http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/upload/exo_endotermicas.pdf)
- Universidad Nacional . (2008). *UNAD*. Obtenido de [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358011/ContLinea/glosario\\_de\\_terminos.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358011/ContLinea/glosario_de_terminos.html)
- USDA. (2006). *Claves para la taxonomía de suelos*.
- Velandía, K. D. (2016). Evaluación de las propiedades físicas y químicas de residuos sólidos. *LUNAZUL*, 9.
- Zambrano, A., Franquis, F., & Infante, A. (2004). EMISIÓN Y CAPTURA DE CÁRBONO EN LOS SUELOS EN ECOSISTEMAS FORESTALES. 11-20.

# CAPÍTULO 12

## DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXTRAPOLISACÁRIDO DE BACTERIAS PROVENIENTES DE RESIDUOS OLIVÍCOLAS<sup>1</sup>

Data de submissão: 23/08/2021

Data de aceite: 10/09/2021

### **Fodda Assad Robledo**

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
Provincia: La Rioja- Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-5202-0324>

### **María Alejandra Soloaga**

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
La Rioja- Argentina  
<https://orcid.org/0000-0003-1815-2240>

### **Patricia Alejandra Córdoba**

Centro de Investigación e Innovación  
Tecnológica (CENIIT)  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
La Rioja- Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-9929-7443>

### **María Celeste Rosso**

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
La Rioja- Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-2431-5627>

### **María de los Ángeles Spano Cruz**

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
La Rioja- Argentina

### **Verónica Alejandra Galleguillo**

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
La Rioja- Argentina

### **Gema Blanca Reynoso**

Laboratorio de Microbiología  
Departamento de Ciencias Exactas  
Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de La Rioja. (UNLaR)  
La Rioja- Argentina

**RESUMEN:** En este estudio se determinó la producción de extrapolisacáridos (EPS) a través de la capacidad para formar biopelículas, de cepas autóctonas de *Aerococcus viridans*,

<sup>1</sup> Financiación: Universidad Nacional de La Rioja. Resolución CICYT N° 026/2018.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

*Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de residuos olivícolas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de La Rioja, donde se crioconservan. La capacidad para formar biopelículas en estas cepas, se determinó cuantitativamente mediante la técnica O´Toole y se clasificaron según el criterio establecido por Stepanovic como no formadoras, formadoras fuertes, moderadas o débiles. La cuantificación por espectrofotometría determinó que todas las cepas estudiadas fueron productoras de biopelículas. La mayor cuantificación celular fue presentada por *Enterobacter cloacae* cuyo valor de densidad óptica fue 0.45 seguida de *Pseudomonas aeruginosa* que presentó una densidad óptica de 0.30, mientras que las densidades ópticas para *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* fueron de 0.21 y 0.16. Según la clasificación utilizada, se consideró a *Enterobacter cloacae* como formadora fuerte (punto de corte de 0,41- 0.56). *Pseudomonas aeruginosa* se consideró como formadora moderada (punto de corte 0.22- 0.41) y como formadoras débiles (puntos de corte 0.11- 0.26) se clasificó a *Aerococcus viridans* y *Acinetobacter iwoffii*. La caracterización del biofilm específico resulta importante para lograr describir los mecanismos en formación de las biopelículas bacterianas que promueven la resistencia a los antibióticos.

**PALABRAS CLAVES:** Extrapolisacáridos. Biopelículas. Residuos olivícolas. *Enterobacter cloacae*.

## DETERMINATION OF THE EXTRA-POLYSACCHARIDE PRODUCTION OF BACTERIA FROM OLIVE RESIDUES

**ABSTRACT:** In this study, the production of extra-polysaccharides (EPS) was determined through the ability to form biofilms of autochthonous strains of *Aerococcus viridans*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii* and *Pseudomonas aeruginosa*. They were isolated from olive residues in the Microbiology Laboratory of the National University of La Rioja, which is the place where they are cryopreserved. The ability to form biofilms in these strains was quantitatively determined using the O´Toole technique. They were classified, according to the criteria established by Stepanovic, as non-forming, strong, moderate or weak forming. The quantification by spectrophotometry determined that all the studied strains were biofilm producers. *Enterobacter cloacae* presented the highest cell quantification. Its optical density value was 0.45, followed by *Pseudomonas aeruginosa*, which presented an optical density of 0.30, while the optical densities for *Acinetobacter iwoffii* and *Aerococcus viridans* were 0.21 and 0.16. According to the classification used, *Enterobacter cloacae* is considered a strong producer (cut-off point of 0.41-0.56). *Pseudomonas aeruginosa* is considered a moderate producer (cut-off point 0.22-0.41). Lastly, *Aerococcus viridans* and *Acinetobacter iwoffii* were classified as weak producers (cut-off points 0.11-0.26). The characterization of the specific biofilm is important to describe the mechanisms in the formation of bacterial biofilms that promote resistance to antibiotics.

**KEYWORDS:** Extrapolisaccharides. Biofilms. Olive residues. *Enterobacter cloacae*.

## 1 INTRODUCCIÓN

La Rioja es una de las principales provincias productoras de aceite de oliva en Argentina. Esta agroindustria se caracteriza por generar una gran cantidad de subproductos y residuos líquidos, sólidos y semisólidos en sus procesos de transformación.

Los microorganismos producen polisacáridos de tres tipos distintos: extracelulares, estructurales y formas intracelulares de almacenamiento. Los extrapolisacáridos (en adelante EPS) son polisacáridos de alto peso molecular que se encuentran al exterior de la célula microbiana pudiendo encontrarse como cápsula o disociados totalmente de la célula acumulándose fuera de la pared celular<sup>12</sup>.

Los EPS pueden ser producidos por un amplio número de microorganismos tales como: arqueas, bacterias, algas unicelulares, levaduras y hongos<sup>4</sup>. Entre algunas bacterias se destacan: *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter sp*, *Alcagines latus*, *Enterobacter cloacae*, *Azobacter vinelandii*<sup>2</sup> y algunas especies del género *Bacillus*; como *B. megatorium*, *B. cereus*, *Paenobacillus jamilae*<sup>7</sup>.

Por otro lado, los EPS son constituyentes importantes de las biopelículas producidas por cepas bacterianas pertenecientes a la microbiota ambiental con un comportamiento saprófito, pero que frecuentemente son reportadas como microorganismos causantes de enfermedades tanto en humanos como en animales<sup>5</sup>. Las biopelículas son comunidades de células microbianas embebidas en una matriz de exopolímeros, entre ellos EPS, que ellas mismas producen como mecanismo de supervivencia y protección. Esta capacidad les permite adherirse y colonizar superficies tanto en tejido vegetal y animal, plásticos, acero<sup>13</sup>. Además, les confiere resistencia a agentes físicos y químicos como así también, a diferentes mecanismos del sistema inmune innato, otorgándoles mayor resistencia a antibióticos debido a varios factores, entre ellos, la incapacidad del antibiótico para penetrar a través de la matriz exopolisacárida disminuyendo su eficacia<sup>6</sup>.

La resistencia a antibióticos se debería a varios factores, entre ellos, la incapacidad del antibiótico para penetrar en la biopelícula, a través de la matriz exopolisacárida disminuyendo la eficacia de los antibióticos<sup>14</sup>. Los microorganismos multiresistentes, sobreviven en diferentes ambientes mediante la formación de biopelículas y la resistencia a múltiples fármacos, es una característica que se puede transmitir horizontalmente entre bacterias, exacerbando el problema de la resistencia a los antibióticos en humanos<sup>14</sup>.

Actualmente existe gran interés en estudiar la composición química de los EPS de las biopelículas bacterianas por sus múltiples aplicaciones industriales y biomédicas. Sin embargo, no abundan en la bibliografía especializada estudios tendientes a determinar la capacidad para formar biopelículas, estableciendo así su inocuidad para habilitar su empleo con fines biotecnológicos.

El objetivo general de este trabajo fue determinar la producción de EPS *in vitro*, a través de la capacidad para formar biopelículas de *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* aisladas de residuos olivícolas producidos en La Rioja, Argentina.

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS BACTERIANAS

El análisis filogenético de secuencias de ADNr 16S indicó que las cepas pertenecen a las especies *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aerococcus viridans*, confirmándose la identidad mediante pruebas fenotípicas<sup>9</sup>. Estas Cepas fueron previamente aisladas de muestras de residuos olivícolas<sup>10</sup> y conservadas mediante criopreservación según el método de Simione<sup>3</sup> en el laboratorio de Microbiología de la UNLaR.

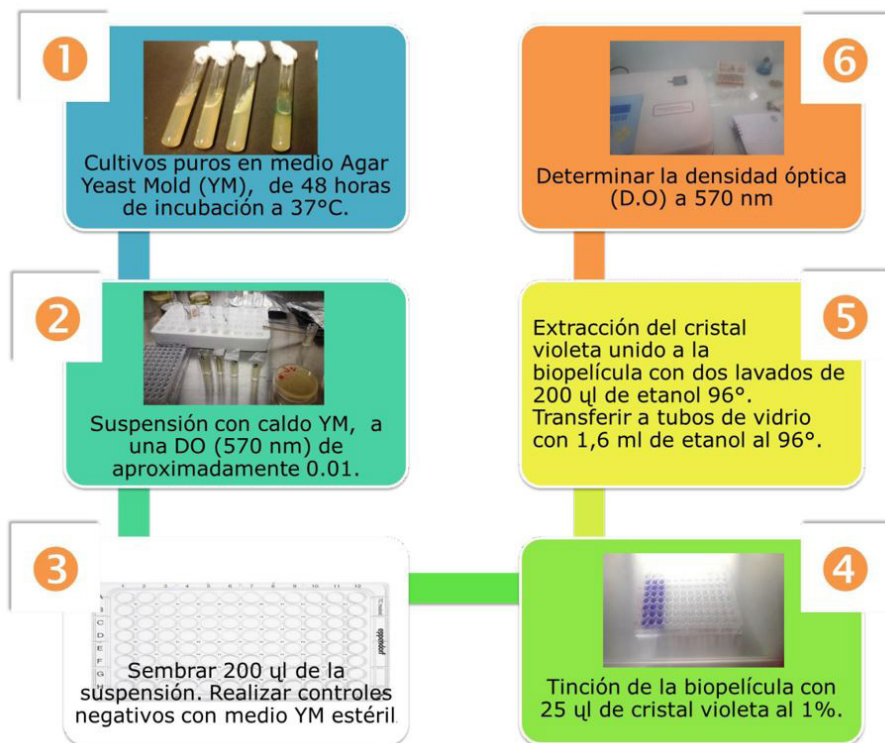
La viabilidad de las cepas criopreservadas se evaluó repicando las cepas en medio LB (Luria Beltrani) incubando a 30°C por 24 horas. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con Medio Mineral (Vogel- Bonner) adicionado con glucosa e incubadas a 37°C por 48 horas.

### 2.2 EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se determinó la capacidad de producir biopelículas de las cepas aisladas empleando la técnica de O´Toole<sup>8</sup> con modificaciones. Ver esquema del proceso en la figura 1. La formación de biofilms se produce porque las bacterias se adhieren a las cubetas de las microplacas de poliestireno de fondo curvo. A continuación, se cuantificó la producción de las biopelículas por espectrofotometría. La mayor densidad óptica se considera mejor producción de biopelículas.

Para ello, se tomaron 3 a 4 colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo solido Yeast Mold(YM), de 48 horas de incubación a 37°C. Se realizó una suspensión con caldo YM, a una densidad óptica ( $DO_{570}$ ) nm. de aproximadamente 0.01. En cada policubeta estéril, se sembró 200 ul de dicha suspensión, se realizaron controles negativos con medio YM estéril. Luego de incubar 12 horas a 37°C, se agregó 25 ul de una solución acuosa de cristal violeta al 1%, después de actuar 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con solución fisiológica para eliminar las células planctónicas (no integrantes de biopelículas). Sólo las células adheridas formadoras de biopelículas quedan en la superficie de la cubeta coloreadas con cristal violeta. Cuantificación de Biopelículas: el cristal violeta unido a las biopelículas se extrajo con dos lavados de 200 ul de etanol 96° (el cristal violeta adherido se solubiliza) y luego fueron transferidos a tubos de vidrio con 1,6 ml de etanol al 96°. Luego a determinó la densidad óptica (D.O) a 570 nm en un espectrofotómetro UV- Cercano Visible ZL-5000 Plus. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, se analizaron los promedios de las lecturas obtenidas para cada cepa y se compararon respecto al blanco.

Figura 1: Ensayo *in vitro* para la detección de la biopelícula en placa de poliestireno.



La interpretación de los resultados requiere definir un punto de corte que separe a las bacterias no formadoras de biopelículas de aquellas que sí son formadoras. Para ello se empleó una técnica estadística descrita por Stepanovic<sup>11</sup> para la interpretación de los resultados.

Para este estudio se calculó la media de la densidad óptica (DO) de los controles y se midió la densidad óptica de cada cepa bacteriana individualmente. A continuación, procedió a definir el punto de corte (DOc) utilizado. El DOc se define como tres Desviaciones estándares (DS) sobre la DO media de los controles:  $DOc = DO \text{ media de los controles} + (3 \times DS \text{ de los controles})$ .

Atendiendo a los resultados obtenidos, las bacterias se clasifican en:

- No Formadoras: La DO de la cepa se encuentra por debajo del punto de corte establecido ( $DO \leq DOc$ ).
- Formadores débiles: La DO de la cepa se encuentra entre el punto de corte y el valor de DO correspondiente al doble del mismo ( $DOc < DO \leq 2DOc$ ).
- Formadores moderados: La DO de la cepa se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el valor de DO correspondiente al cuádruple del mismo ( $2DOc < DO \leq 4DOc$ ).



- Formadores fuertes: La DO de la cepa se encuentra por encima del cuádruple del valor del punto de (4DOc < DO).

### 3 RESULTADOS

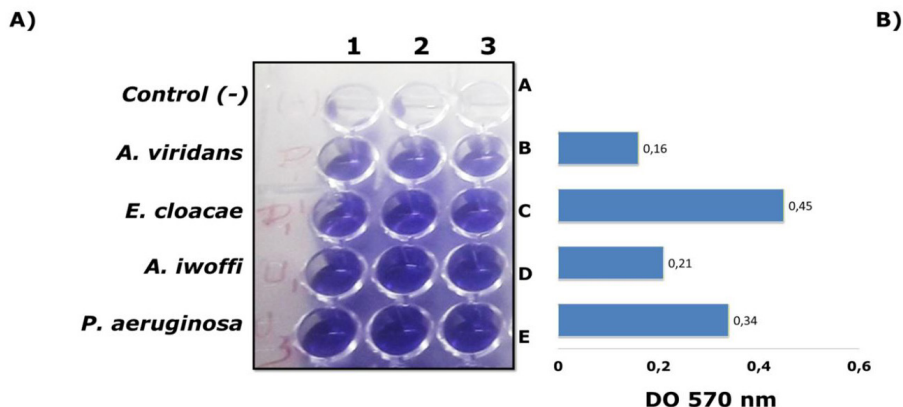
#### 3.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS BACTERIANAS

Las cuatro cepas fueron activadas empleando el medio LB (Luria Beltrani) tras la incubación a 37°C por 48 horas, se observaron características como turbidez, formación de un velo en la superficie del medio, depósitos en el fondo con crecimiento homogéneo. Luego de repicar las cepas en el Medio Mineral (Vogel- Bonner) adicionado con glucosa y tras la incubación a 37 °C durante 48 horas de incubación.

#### 3.2 EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Las cuatro especies bacterianas previamente identificadas, fueron estudiadas mediante la técnica de O'Toole<sup>8</sup>, la cuantificación por espectrometría determinó que todas las bacterias aisladas fueron productoras de biopelículas, algunas con mayor capacidad que otras, lo cual se evidenció con los resultados de las diferentes densidades ópticas. La mayor cuantificación celular fue presentada por *Enterobacter cloacae* cuyo valor de densidad óptica fue 0.45; seguida de *Pseudomona aeruginosa* que presentó una densidad óptica de 0.30, mientras que las densidades ópticas para *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* fueron de 0.21 y 0.16, respectivamente como se observa en la figura 2 A Y B.

Figura 2: A) Observación del ensayo *in vitro* para la detección de la biopelícula. Todas las muestras se testaron por triplicado. B) Valores promedio de las densidades ópticas obtenidas. Pocillos del 1A al 3A: Control negativo; del 1B al 3B: *A. viridans* (DO 0,16); del 1C al 3C: *E. cloacae* (DO 0,45); del 1D al 3D *A. iwoffii* (DO 0,21) y del 1E al 3E *P. aeruginosa* (DO 0,34).





Según la clasificación establecida por Stepanovic<sup>11</sup>, se pudo clasificar a las especies estudiadas. Se destacó como formador fuerte de biopelículas a *Enterobacter cloacae* (punto de corte de 0,41- 0.56), Dentro de formador moderado se situó a *Pseudomona aeruginosa* (punto de corte 0.22- 0.41) y como formadores débiles (puntos de corte 0.11- 0.26) se situó a *Aerococcus viridans* y *Acinetobacter iwoffii*, según se describe tabla 1:

Tabla 1: Clasificación estadística de la capacidad de formar biopelículas *in vitro* de cepas nativas aisladas de residuos olivícolas. *Enterobacter cloacae* es un formador fuerte de biopelícula (punto de corte de 0,41- 0.56). *Pseudomona aeruginosa* es formadora moderada (punto de corte 0.22- 0.41) y *Aerococcus viridans* y *Acinetobacter iwoffii* son formadoras débiles de biopelícula (puntos de corte 0.11- 0.26).

Especie	D.O	Puntos de corte
<i>A. viridans</i>	0.16	Formador débil (0.11 - 0.26)
<i>E. cloacae</i>	0.45	Formador fuerte (0.41-0.56)
<i>A. iwoffii</i>	0.21	Formador débil (0.11- 0.26)
<i>P. aeruginosa</i>	0.34	Formador moderado (0.22- 0.41)

#### 4 DISCUSIÓN

La técnica de O´Toole utilizada en este estudio, permitió cuantificar la producción *in vitro* de EPS a través de la capacidad de formar biopelículas. Sin embargo, se deben elaborar protocolos que permitan establecer una extrapolación de los resultados obtenidos bajo condiciones de experimentación *in vitro*, optimizadas e ideales, las cuales proporcionan una máxima formación de biopelículas, a una situación real *in vivo*<sup>11</sup>. Debido a este hecho, es importante identificar a aquellos microorganismos que son formadores fuertes de biopelículas *per se*, así como identificar también a los microorganismos que bajo determinados cambios de las condiciones del medio producidas en un medio *in vivo* son capaces de formar biopelículas. El punto crítico del estudio es lograr una estandarización del experimento ya que se hace imprescindible la necesidad de disponer de métodos de estudio de formación de biopelículas, un factor de virulencia que refleja directamente en la susceptibilidad a los antimicrobianos.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que las metodologías empleadas permitieron determinar la producción de EPS *in vitro*, a través de la capacidad

para formar biopelícula de *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans* aisladas de residuos olivícolas producidos en La Rioja, Argentina. Mediante la técnica de O´Toole se pudo cuantificar la producción de EPS *in vitro*, a través de la capacidad para formar biopelículas de estas cepas, resultado ser una técnica medible y reproducible en el laboratorio mediante el diseño de un protocolo adecuado. La cuantificación por espectrofotometría realizada, determinó que todas las cepas estudiadas fueron productoras de biopelículas, siendo *Enterobacter cloacae* la cepa que presentó la mayor cuantificación celular, seguida de *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter iwoffii*. Según la clasificación estadística propuesta por Stepanovi<sup>c11</sup>, se consideró a *Enterobacter cloacae* como formadora fuerte (punto de corte de 0,41-0.56). *Pseudomona aeruginosa* se consideró como formadora moderada (punto de corte 0.22- 0.41) y como formadoras débiles (puntos de corte 0.11- 0.26) se clasificó a *Aerococcus viridans* y a *Acinetobacter iwoffii*. Son extensas las publicaciones científicas acerca de la producción de biopelículas y su estudio está ampliamente cubierto por muchos autores, pero la mayoría de las revisiones revelan información habitualmente restringida a las especies de referencia, como *Staphylococcus aureus* en gram positivos y *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli* en gram negativos. No obstante, en este trabajo se pudieron determinar otros microorganismos productores de biopelículas como *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter iwoffii* y *Aerococcus viridans*. En este punto es importante resaltar que estas bacterias pertenecen a la microbiota ambiental con un comportamiento saprófito, pero que también son frecuentemente reportadas como microorganismos importantes a nivel hospitalario, es decir que son agentes causantes de enfermedades nosocomiales precisamente por la capacidad de producir biopelículas y la alta resistencia a desinfectantes y antibióticos. Además, este tipo de agentes están involucrados en la colonización e infección en pacientes inmunocomprometidos como patógenos oportunistas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Annous A. (2009). Biofilms in fresh fruit and vegetables. Biofilms in the food and beverage industries. Woodhead Publishing and CRC Press. Boca Raton; 517-535.
2. Chanprateep S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Bioscience and Bioengineering. 110(6), 621-632.
3. Day J., Stacey, G. (2007). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2ed. Totowa: Humana Press. 347.
4. De Almeida A. (2004). Bioplásticos: Una alternativa ecológica. Revista Química; 3: 122-133.

5. Dieser S., Fessia A., Ferrari M., Raspanti C., Odierno L. (2017). *Streptococcus uberis*: In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. *Revista Argentina Microbiología* 49(4):305-310.
6. Gunduz T., Tuncel G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 89:329-336.
7. Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A. (1990). Antibacterial activity of waste waters of olive oil mills. In: Cheremisinoff PN (eds) *Encyclopedia of environmental control technology*, vol 4. Gulf Publishing, Houston, 731–757.
8. O’Toole, G. A., y Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
9. Soloaga M.A., Rosso M.C., Spano Cruz M.A., Cordoba P.A., Rojas N.L. and Ghiringhelli P.D. (2018). Identificación molecular de bacterias nativas productoras de polihidroxicanoatos en residuos olivícolas. Bacteria 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. PopSet: 1418575285. GenBank. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nucore&Cmd=Link&LinkName=nucore\\_popset&IdsFromResult=1418575286](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nucore&Cmd=Link&LinkName=nucore_popset&IdsFromResult=1418575286) [visitado 27/08/2018].
10. Soloaga M. A., Rosso M. C., Spano Cruz, A., Galleguillo V., Zaracho A., Cortes Molina, V., Córdoba P., Rojas, N., Ghiringhelli P. (2016). Aislamiento de cepas bacterianas autóctonas productoras de polihidroxicanoatos en residuos olivícolas. I Simposio de Uso de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo: resúmenes y mesa redonda. 1° Ed. Edición INTA. ISBN 978-987-521-715-7. Pág: 95.
11. Stepanovic S., Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: over-view of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS*; 115:891-9.
12. Sutherland I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*; 147: 3-9.
13. Vanegas L.; Correa, C.; Morales M.; Martinez L.; Rúgeles, G. (2009). Antibiotic resistance of bacteria isolated from Biofilms in a food processing plant. *Rev. MVZ.*; 14:2.
14. Velázquez N.; Guadarrama L. Olivares C., Salinas E. (2017). Presence of environmental coagulase-positive *staphylococci*, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. *Revista Argentina Microbiología*. 49(1):15-23.

# CAPÍTULO 13

## SESQUITERPENOIDES DE PLANTAS NATIVAS DEL NOROESTE ARGENTINO CON ACCION INSECTICIDA<sup>1</sup>

Data de submissão: 10/09/2021

Data de aceite: 28/09/2021

**Susana Beatriz Popich**

Instituto de Montaña y Ambientes Áridos  
(IAMRA)

Universidad Nacional de Chilecito

Chilecito. La Rioja. Argentina

<https://orcid.org/0000-0002-4786-5285>

**RESUMEN:** Los vegetales desarrollaron estrategias de defensa hacia el entorno como la protección química mediante la elaboración de metabolitos secundarios con un amplio rango de actividades. Entre ellos los sesquiterpenoides tales como las lactonas sesquiterpénicas, poseen significativa actividad biológica sobre diferentes organismos. La Familia Asteraceae y dentro de ella la tribu Vernoniae se caracteriza por la presencia de estos metabolitos altamente oxigenados con efectos tóxicos, letales y subletales que las posicionan como compuestos de interés para el control de artrópodos de importancia sanitaria y agrícola. En este trabajo se realiza una breve revisión de

<sup>1</sup> Esta publicación ha sido costeadada a través del subsidio ESTIMULO Y DESARROLLO DE LA INVESTIGACION CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Chilecito (SECyT-UNDeC).

los efectos que estos metabolitos secundarios pueden ejercer y sus potenciales utilidades.

**PALABRAS CLAVE:** Sesquiterpenoides. Vernoniae. Toxicidad. Efectos subletales. Insectos.

### SESQUITERPENOIDS FROM NATIVE PLANTS TO NORTHWESTERN ARGENTINA WITH INSECTICIDAL ACTION

**ABSTRACT:** Plants developed different strategies to defend themselves against the environment such as chemical protection through elaborating secondary metabolites with a wide range of activities. Among them, sesquiterpenoids such as sesquiterpene lactones have significant biological activity over different organisms. The family Asteraceae and within it the Vernoniae tribe is characterised by the presence of these highly oxygenated metabolites. Their toxic, lethal and sub lethal effects rank these compounds as interest for the control of insects of health and agricultural importance. In this work, a brief review of the effects that these metabolites can exert and their potential utilities will be made.

**KEYWORDS:** Sesquiterpenoids. Vernoniae. Toxicity. Sub-lethal effects. Insects.

### 1 LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Durante el proceso evolutivo los seres vivos desarrollaron alternativas para protegerse de predadores; una de ellas es la

producción de agentes químicos con diferentes mecanismos de acción, estas sustancias pueden actuar como venenos, repelentes o sustancias tóxicas para otros organismos (Pérez Contreras, 1999).

Los vegetales, como todo ser vivo, desarrollaron estrategias para evitar ser “dañados”. Ellas sugieren la adaptación, tolerancia y la resistencia al consumo por parte de herbívoros. Cuando se habla de Resistencia se incluye la protección química o defensa química de las plantas. Esta “destreza” está relacionada con la capacidad de muchas de ellas de sintetizar biocompuestos llamados “metabolitos secundarios”.

Los metabolitos secundarios no intervienen en los procesos metabólicos primarios, sino que son sustancias vinculadas a la defensa de las plantas respecto de su entorno, con un amplio rango de actividades que pueden ejercer por medio de su estructura original o ser precursores de otros compuestos (Rattan, 2010).

Entre los tipos de metabolitos secundarios se pueden citar:

- 1.1. Compuestos reductores de la digestibilidad: Son hidratos de carbono, galacturonanos y galactanos estructurales presentes en las paredes celulares vegetales. Estos productos para ser digeridos, requieren de la presencia de organismos simbióticos que produzcan enzimas capaces de degradarlos (Granados-Sánchez et al., 2008).
- 1.2. Los alcaloides: Ejercen diversos efectos en animales tales como inhibición de la síntesis de DNA y RNA, de la mitosis e incluso pueden actuar como supresores o activadores de la sinapsis (García Ávalos y Perez-Urria Carril, 2009).
- 1.3. Aminoácidos No Proteicos: Son metabolitos con estructuras muy similares a los aminoácidos formadores de proteínas y pueden conformar proteínas defectuosas (Ramos et al., 1998).
- 1.4. Proteínas tóxicas: Son proteínas que las plantas almacenan generalmente en las semillas. Son reservas de nitrógeno y potentes venenos para los animales.
- 1.5. Glicosidos cianogénicos: Son moléculas que se sintetizan cuando algunos tejidos de ciertas plantas se ven dañados.
- 1.6. Glicosinolatos: La toxicidad de estas sustancias en animales se debe a que son compuestos similares a los glicosidos cianogénicos.
- 1.7. Terpenoides: Son los metabolitos que poseen mayor actividad biológica. Son compuestos orgánicos cíclicos insaturados. Algunos resultan fundamentales para las plantas como el ácido giberélico; otros son tóxicos para algunos animales. Algunos de ellos tienen acciones defensivas hacia insectos como el caso de los piretroides, otros son inhibidores de la respiración celular y

algunos actúan como reguladores del crecimiento. Este conocimiento previo, permitió profundizar los estudios sobre el uso de los metabolitos secundarios como compuestos que ejerzan acciones sobre insectos utilizándolos como posibles controladores o repelentes (Pascacio-Villafán et al., 2016).

## 2 INVESTIGACIONES DE COMPUESTOS BOTÁNICOS COMO CONTROLADORES DE INSECTOS

En los años 30 ya se registraron investigaciones sobre el tema. Metzger y Grant (1932) evaluaron la actividad de 390 plantas como repelentes de *Popillia japónica* Newman, coleóptero plaga de importancia agrícola para durazneros y manzanos.

Eger (1937), observó la respuesta cuantificada de larvas de lepidópteros al adicionar a sus dietas habituales sustancias de origen vegetal y evaluó diferentes grados de aceptación. En los años 60, los estudios cobraron mayor importancia. Particularmente a partir de los trabajos de Pradhan (mencionado por Ascher, 1969) quién descubrió la actividad del extracto del neem (*Azadirachta indica*) en el tratamiento contra langostas (*Schistocerca gregaria*). En el decenio siguiente se produjo un gran progreso respecto de estudios de sustancias denominadas juvenoides y su acción en la disrupción del desarrollo de insectos (Sehnal et al., 1976). En este sentido el descubrimiento de las propiedades del juvocrinem II en la albahaca, *Ocimum basilicum* (Bowers y Nishida, 1980) condujo a la síntesis de una segunda generación de productos hormonales comerciales, como el piriproxifen y el fenoxicarb, conocidos como IGR o reguladores de crecimiento (Bowers, 1993).

Las nuevas tecnologías irrumpieron el campo de los productos botánicos con la microencapsulación. En 2005 se constató la eficacia de los aceites esenciales volátiles encapsulados como pesticidas, repelentes, ovicidas, larvicidas y agentes antivirales. Linder et al. (2005). En 2009 se ensayó el uso de microcápsulas poliméricas conteniendo IGR, para ser utilizadas como insecticidas en el control de insectos chupadores (Herrero, 2009). En 2012 se desarrollaron microencapsulados asociados a un sinergista, a partir de tres familias diferentes de biocidas (nicotinoides, piretroides y carbamatos) utilizadas para el control de insectos plagas voladoras (Alonso y Luz, 2012).

En el año 2016, se planteó el control con nanoformulaciones. Se probó en insectos de granos almacenados y fue una alternativa elemental debido a la necesidad de inocuidad de los alimentos que provenían de granos. En este caso, Soujanya et al. (2016) en una completa revisión, aluden a la efectividad de los productos botánicos en las nanoformulaciones y apuntan a la tecnología de la microencapsulación de extractos de

plantas, los aceites esenciales y/o sus compuestos puros, en el control insectos plagas en lugares de almacenamiento de granos.

En 2018, Brasil incurre en el uso de nanopartículas de aceites esenciales de frutas de *Zanthoxylum riedelianum* en pruebas de repelencia y de oviposición. Son Pereira et al. (2018) quienes proponen el manejo del hemíptero *Bemisia tabaci* mediante ésta tecnología.

### 3 LA FAMILIA ASTERACEAE COMO PRODUCTORA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La familia Asteraceae es la más diversa de las Angiospermas y una de las más modernas evolutivamente. Comprende más de 1.700 géneros y entre 24.000 a 30.000 especies distribuidas por todo el mundo exceptuando la Antártida (Katinas et al. 2007). Las asteráceas son valiosas porque se emplean con fines muy diversos tales como alimento, como fuente de aceites comestibles, como plantas ornamentales e incluso son malezas de algunos cultivos (Rivas, 2007). Como característica destacable, la familia Asteraceae posee una estructura altamente diferenciada denominada *capítulo*, que se comporta como una flor con funciones de atracción hacia los vectores de polinización.

En Argentina representa la familia vegetal más numerosa con 227 géneros y cerca de 1400 especies. Dos grupos de sustancias son marcadores quimiotaxonómicos de asteráceas: las lactonas sesquiterpénicas (LS) y los compuestos poliacetilénicos (CP) (Del Vitto y Petenatti, 2009). A las primeras se las conoce también como sesquiterpenolidos o sesquiterpenoides; son compuestos que poseen 15 átomos de carbono y un grupo funcional del tipo  $\gamma$ -lactona (Ruiz-Reyes y Suarez, 2015). Los compuestos poliacetilénicos se distinguen por su rigidez en las cadenas, lo que los hace viables para nanotecnología molecular. Tanto las LS como los CP conforman un extenso grupo de metabolitos con diversos efectos biológicos sobre diferentes organismos.

### 4 LA TRIBU VERNONIEAE Y SUS PARTICULARIDADES QUÍMICAS

La tribu Vernoniaceae pertenece a la familia Asteraceae. En cuanto a la química de la tribu, Robinson et al. (1980) en su trabajo "*Chemosystematic notes on the Asteraceae. III. Natural subdivisions of the Vernoniaceae*" mencionaron como característica principal, la presencia LS del tipo germacranólidos e hirsutinólidos. Estos autores separaron los géneros del viejo y nuevo mundo usando estos compuestos como referencia y además aludieron a la presencia de LS altamente oxigenadas de sabor amargo, que producen un gran número de efectos sobre múltiples sistemas biológicos.

Particularmente las LS constituyen un grupo de terpenoides que deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno y algunos productos de transposición.

Una de las principales características es su rol de protección sobre la planta a la acción de patógenos, de insectos herbívoros y de mamíferos (Picman, 1986). Las LS han sido aisladas de diferentes fuentes, tales como de Hepaticae (Asakawa, 1995), de Cupresaceae (pinos y cipreses) (Neerman, 2003) y de las Asteraceae. Rodríguez et al. (1976) mencionaron para la tribu Vernonieae el porcentaje LS en peso seco; este puede variar entre 0,001% y el 5 % dependiendo de la especie.

## 5 LOS SESQUITERPENOIDES COMO SUSTANCIAS CON BIOACTIVIDAD

Son interesantes las investigaciones realizadas sobre efectos de las LS en diversos organismos. Amat (1983) probó las propiedades citotóxicas de dos especies de la tribu: *Vernonia amygdalina* y de *V. hymenolepis*. Determinó como compuestos responsables de los efectos a dos LS: vernodalina y vernomygdina; la primera presente en *V. amygdalina* y segunda en la especie *V. hymenolepis*. Swee et al. (2010), mencionaron a *V. amygdalina* como especie medicinal usada en África para tratamiento de la malaria, pero también aducen a la cualidad antibacteriana, antiplasmodial, antifúngica y antidiabética.

En 1974 Burnett et al., alegaron que lepidópteros pertenecientes al género *Spodoptera* alimentados con LS adicionadas a la dieta a dosis variables (entre 0,125 y 0,500 % de LS en peso de dieta) redujeron significativamente el crecimiento de larvas y pupas. Mabry y Gill (1977) en estudios de ingesta suplementadas con LS sobre insectos y mamíferos, observaron para los primeros un incremento de la duración del ciclo de vida, reducción de pesos larvales, pupales y malformaciones en adultos. Para mamíferos comprobaron una marcada reducción de peso corporal y complicaciones en la digestibilidad del alimento.

Respecto de las propiedades insecticidas y repelentes de las LS, Adeniy et al. (2010), mencionan resultados logrados con cuatro extractos etanólicos de Vernonias, (entre las que figura *V. amygdalina*) para el control de *Acanthoscelides obtectus*, un coleóptero plaga de granos almacenados. Estos autores indican haber logrado una mortalidad superior al 33% a la dosis más alta utilizada (4% peso/volumen). Otro estudio interesante fue el de Arivoli et al (2011) sobre *Vernonia cinerea* cuyas hojas y semillas son utilizadas como antihelmínticas en India (DOMAP: Database of Medicinal and Aromatic Plants in Rajasthan; 2016). En su estudio se constató el efecto larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* utilizando extractos de hojas de *V. cinérea*. Lo llamativo del estudio fue el proceso de liofilización de los extractos crudos (de acetato de etilo, de



cloroformo, de acetona y de metanol), que fueron preparados utilizando DMSO (dimetil-sulfóxido) como diluyente.

Varios autores (Swee et al., 2010; Toyang y Verpoorte, 2013 Qing He et al., 2014) indicaron además, a las LS con efectos larvicidas sobre *Culex pipiens*, *Plasmodium falciparum* y *Aedes albopictus* como también acciones repelentes sobre otros dípteros hematófagos. Se menciona además, el efecto alelopático de LS (Popa et al., 2008) y efectos citotóxicos (Jimenez-Usuga et al., 2016), genotóxicos y antiproliferativos en células tumorales y cancerígenas (Wu et al., 2017). Pero las LS aisladas de la tribu Vernoniae ejercen su acción como repelente, insecticidas, de inhibición del crecimiento y del desarrollo sobre insectos de diferentes órdenes. Borkosky, et al. (2009), estudia los efectos de LS sobre *Biomphalaria peregrina* molusco directamente involucrado en la transmisión de la esquistosomiasis. Una completa revisión sobre diferentes actividades biológicas sobre insectos la realizó Isman (2017) and research on botanical insecticides has surged since 2000 according to a recent bibliographic analysis of scientific literature. Thousands of papers have now been published documenting the bioactivities of botanicals such as neem (from *Azadirachta indica*) y da un paso más desde los laboratorios hacia a la fabricación de compuestos para uso farmacológico.

## 6 BIOENSAYOS SOBRE INSECTOS

Los ensayos biológicos sobre insectos, son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes químicos sobre éstos organismos. Se realizan bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Los efectos que producen pueden ser de inhibición o de alteración de algún proceso metabólico (Lewis y Van Emdem, 1986). Se evalúan: mortalidad, inhibición del crecimiento, estadios larvales supernumerarios, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos y fertilidad entre otros (Mareggiani, 2001).

### 6.1 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

La toxicidad, es la capacidad que tiene una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo (Rattan, 2010). El resultado dependerá de las propiedades químicas del compuesto, de su concentración, de la duración y frecuencia de exposición al tóxico y sus efectos en el ciclo de vida normal del organismo (Ponsankar et al., 2016). Se define como un ensayo de toxicidad, a la determinación del efecto de un material o mezcla de materiales, sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. En base a lo expresado, se considera importante mencionar algunos conceptos:

### 6.1.1 Toxicidad aguda:

Son los efectos adversos (letales o subletales), inducidos sobre los organismos en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo. Usualmente se evalúan durante un tiempo T de pocos días.

### 6.1.2 Toxicidad crónica:

Son los efectos tóxicos que ocurren más allá del tiempo de exposición es decir a largo plazo. Están relacionados con cambios en el metabolismo, en el crecimiento o en la capacidad de supervivencia del organismo prueba (Scroggins, 1999).

### 6.1.3 Ensayos de Topicación o de Contacto:

Pueden ser de dos tipos:

#### 6.1.3.1 Por inmersión completa:

El sistema biológico es sumergido en una solución prueba a diferentes concentraciones por breves segundos y se observan los efectos producidos sobre el sistema.

#### 6.1.3.2 Sobre una parte del cuerpo:

Una parte del sistema o un estado (huevo, larva, pupa), se expone al tóxico durante un tiempo determinado y se observan los efectos.

Se evalúan los resultados por porcentaje de mortalidad y se procede a la determinación de las Dosis Letales 50 y 90 ( $DL_{50}$  y  $DL_{90}$ ) (Ferrero et al., 2001). Como  $DL_{50}$ , la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) la define como: la dosis calculada estadísticamente de un agente químico o físico (puede ser radiación) que se espera que mate al 50% de los organismos de una población, bajo condiciones determinadas. La  $DL_{90}$ , la IUPAC la define como la dosis calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (puede ser radiación) que se espera que mate al 90% de los organismos de una población bajo condiciones definidas (Repetto et al., 1995).

### 6.1.4 Ensayos de Exposición a vapores

El sistema biológico se expone a vapores tóxicos en un recipiente herméticamente cerrado. Las sustancias se acumulan en los tejidos grasos de artrópodos (cuerpos grasos) que actúan como órganos de detoxificación. En este caso se evalúa la Concentración

Letal 50 (CL<sub>50</sub>) que se define como la concentración del tóxico que mata el 50 % de la población en estudio (Juárez y Villagra de Gamundi, 2007).

### 6.1.5 Ensayos de ingesta obligada

Estos bioensayos consisten en someter al sistema biológico a la ingesta obligada de los productos a los cuales se quiere evaluar sobre un soporte de dieta artificial o natural (Huerta et al., 2008). Se determinan efectos diversos entre los que figuran: mortalidad, variación del crecimiento, malformaciones en cualquiera de los estados, efectos sobre la puesta (fecundación) y efectos sobre la fertilidad de los huevos (Canelón et al. 2009).

#### 6.1.5.1 Evaluación de los Índices Nutricionales:

Son ensayos que pueden incluirse en los de Ingesta obligada. Son una herramienta que permite valorar el efecto del tóxico sobre el metabolismo primario del insecto, y un método para evaluar el consumo y posterior utilización del alimento. Para ello se establece un período de medición (t) donde se desarrolla la experiencia de cálculo de los Índices Nutricionales. Ese período puede ser todo el ciclo de vida del modelo, un estado del ciclo (larva, pupa ó adulto) o un período arbitrario de tiempo definido por el investigador. Según Waldbauer (1968), tres datos son importantes para determinar la utilización del alimento ingerido por un modelo biológico:

- a. Conocer el gasto de energía que requiere comer el alimento suministrado
- b. Saber la cantidad del alimento comido que es digerido
- c. De esa cantidad de alimento digerido, cuanto es asimilado

Estos tres parámetros son fundamentales para establecer cuánto alimento comió el modelo (ingesta), la digestibilidad de ese alimento ingerido (aprovechamiento de un alimento) y la eficiencia en convertir el alimento ingerido en masa corporal. Los índices nutricionales según Álvarez Colom et al., (2007) aplicados a dos especies de lepidópteros *Spodoptera cosmiodes* y *S. frugiperda* fueron:

Índice de Crecimiento:  $GR = (A-B)/t$

Índice de Consumición:  $CR = D/t$

Índice de Eficiencia en la Conversión de Dieta Ingerida en masa:  $ECDI=(A-B)/D$

A = peso final de la larva al concluir el experimento

B = peso inicial de la larva

t = tiempo de duración del experimento

D = peso de dieta consumida

La adquisición de nutrientes y el balance energético son factores fundamentales para la supervivencia y reproducción de los insectos. La incorporación de potenciales sustancias insecticidas de origen vegetal en las dietas, pretende alterar estos factores en el desarrollo de los insectos (Rosetti et al., 2017).

Imagen 1 : Diferencia de tamaño en larvas de *Spodoptera frugiperda* del mismo estadio (4to estadio larval). La larva superior corresponde a una larva control. La inferior larva tratada con lactonas sesquiterpénicas adicionadas a su dieta.

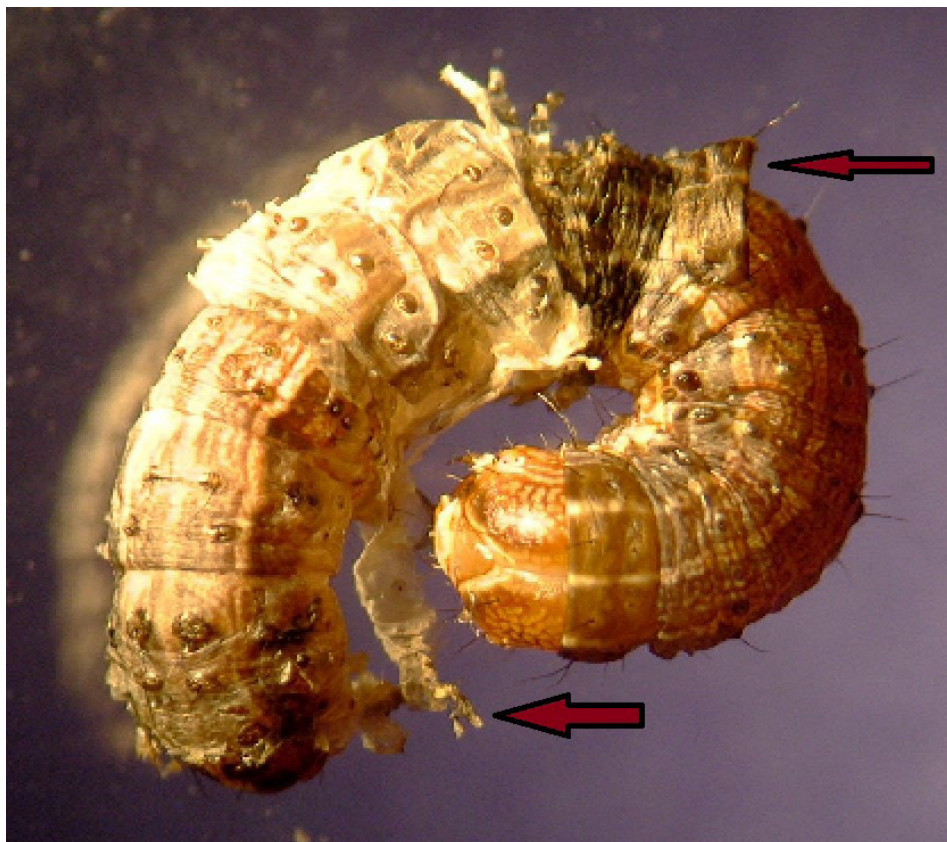


#### 6.1.5.2 Efectos letales y subletales:

Son los que se producen por debajo del nivel que causa la muerte y como resultado de la exposición a una determinada concentración del agente tóxico (Díaz Báez et al., 2004). Se evalúan cambios de comportamiento, disminución en la oviposición, irregularidades en la emergencia de larvas, cambios en el metabolismo, disminución de crecimiento, cambios en el peso, alargamiento del ciclo de vida y otras anomalías evidentes (Martínez et al., 2008).

Este tipo de daños secundarios en insectos, contribuyen a disminuir las poblaciones de insectos plaga a lo largo del tiempo. Son efectos considerados como alternativos en los planes de “Manejo Integrado de Plagas” (MIP).

Imagen 2: Efectos subletales en una larva del 3<sup>er</sup> estadio de *Spodoptera frugiperda* mostrando exuvias sucesivas que no pueden ser eliminadas, producto de la ingesta obligada de dieta adicionada con lactonas sesquiterpénicas de *Vernonanthura squamulosa* (Vernonieae).



#### 6.1.5.3 Efectos sobre la fecundidad y fertilidad:

Los parámetros reproductivos de algunas de las especies de insectos, son fundamentales para estructurar procesos de cría y diseñar ensayos con el fin de optimizar técnicas de control (Amate et al., 2000). Estas cuantificaciones están directamente vinculados con el tipo de alimentación larval y del adulto (Martínez et al., 2019). Los huevos de los lepidópteros y de los insectos son centrolecíticos, esto significa que el vitelo (mezcla de nutrientes) se dispone internamente en el centro del mismo rodeando al núcleo. En las fases tempranas de desarrollo, inmediatamente después de la fecundación, las células comienzan a dividirse sin presentar citocinesis. Por lo tanto, una gran cantidad de núcleos migran hacia la periferia estableciendo *la banda germinal*; en ella la actividad mitótica es muy alta (Alfaro, 1998).

#### 6.1.5.4 Efectos sobre la organomorfia:

El modo de acción de los metabolitos secundarios sobre los insectos puede variar de acuerdo a la especie de insecto bajo estudio. Pueden actuar como repelentes, antialimentarios, reguladores del crecimiento e insecticidas. Sin embargo, a pesar de las numerosas investigaciones sobre su actividad, en la mayoría de los casos no se han identificado los sistemas o tejido blanco sobre los cuales actúan. Tampoco se conocen con certeza, los mecanismos de acción involucrados.

### BIBLIOGRAFÍA

Adeniy, S., Orjiekw, C., Ehiagbonare J., Arimah, B. (2010). Preliminary Phytochemical Analysis and Insecticidal Activity of Ethanolic Extracts of Four Tropical Plants (*Vernonia amygdalina*, *Sida acuta*, *Ocimum gratissimum* and *Telfaria occidentalis*) against Beans Weevil (*Acanthoscelides obtectus*). *International Journal of Physical Sciences* 5(6): 753–762. <http://www.academicjournals.org/IJPS>

Alfaro, D. C. (1998). *Estados inmaduros de insectos de las órdenes Coleoptera, Diptera y Lepidoptera: manual de reconocimiento*. Nro. 27. CATIE.

Alonso, A., Luz, M. (2012). *Microencapsulación de biocidas*. <http://hdl.handle.net/10810/6944>

Alvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S., Bardón, A. (2007). *Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)*. *Journal of Pest Science*, 80(1): 63-67.

Aly, M., Badran, R. (1996). *Mosquito Control with Extracts from Plants of the Egyptian Eastern Desert*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 3(4): 3–8.

Amat, A.G. (1983). *Taxones de Compuestas Bonaerenses Críticos Para La Investigación Farmacológica*. *Acta Farm. Bonaerense*, 2(1): 23–36.

Amat, A.G. (1983). *Taxones de Compuestas Bonaerenses Críticos Para La Investigación Farmacológica*. *Acta Farm. Bonaerense*, 2(1): 23–36.

Amate, J., Cabello, P., Barranco, Y. T. (2000). *Biología en condiciones controladas de especies de noctuidos plaga (Lepidoptera: Noctuidae)*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 26: 193-201.

Arivoli, S., Tennyson, S., Martin J.J. (2011). *Larvicidal Efficacy of *Vernonia Cinerea* (L.) (Asteraceae) Leaf Extracts against the Filarial Vector *Culex Quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)*. *Journal of Biopesticides* 4(1): 37–42.

Asakawa, Y. (1995). *Chemical Constituents of the Bryophytes*. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Herz, W., Kirby, G., Moore, R., Steglich, W., Tamm, Ch. (Eds) Springer. Viena. Pp. 1–562

Ascher, K.R.S. (1969). *Insect Pest Control by Chemosterilization and Other Advanced Methods (Antifeedants, Microbial Pesticides, Etc.)*. In *Act. Congr. Intern. Antiparasitaires* Milán, Italia. Pp. 291–294.

Borkosky, S., Ponce de León, S., Juárez, G., Gonzalez Sierra, M., Bardón, A. (2009). *Molluscicidal Sesquiterpene Lactones from Species of the Tribe Vernonieae (Compositae)*. *Chemistry & Biodiversity* 6(4): 513–519.



- Bowers, W.S. (1993). *Phytochemical Contributions to Pest Management*. In *Pest Management: Biologically Based Technologies* P. 257.
- Bowers, W.S., Nishida, R. (1980). *Juvocimenes: Potent Juvenile Hormone Mimics from Sweet Basil*. *Science* 209: 1030–1032.
- Burnett Jr, W., Jones, S., Mabry, T., Padolina, W. (1974). *Sesquiterpene Lactones — Insect Feeding Deterrents in Vernonia*. *Biochem. Sys. Ecol.*, 2: 25–29.
- Canelon, D.J., Suarez, A.I., Compagnone, R.S., Trejo, E. (2009) *Actividad antialimentaria de Senefelderopsis chiribiquetensis sobre Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae)*. *Ciencia [online]*.17(3): 197-204.
- Del Vitto, L., Petenatti, E. (2009). *Asteraceas de Importancia Económica y Ambiental. Primera Parte. Sinopsis Morfológica y Taxonómica, Importancia Ecológica y Plantas de Interés Industrial*. *Multequina* 18: 67–115. <https://www.academia.edu/16776429>.
- Díaz Baez, M.C., Pica Granados, Y., Ronco, A., Sobrero, C., Bulus Rossini, G., Feola G., Forget, G., Sánchez Bain, A. (2004). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Ed. Castillo Morales G., ed. 1ª ed. Mexico. Pp 189.
- DOMAP: *Database of Medicinal and Aromatic Plants in Rajasthan*. (2016). DOMAP: [bioinfo.bisr.res.in/project/domap/contact.php](http://bioinfo.bisr.res.in/project/domap/contact.php).
- Eger, H. (1937). *Über Den Geschmacksinn von Schmetterlingsraupen*. *Biol. Zbl.* 57: 293-308.
- Ferrero, A., Carriac, M., Ggutierrez, M., Laumann, R., Cervellini, P. (2001). *Evaluación en laboratorio de un aceite mineral y extractos crudos vegetales en huevos y adultos de Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae), (gusano del manzano)*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 27: 121-128.
- García Ávalos, A., Perez- Urría Carril, E. (2009). *Metabolismo Secundario de Plantas*. *Reduca. Biología. Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
- Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P., Barrera-Escorcía, H. (2008). *Ecología de La Herbivoría*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 14(1): 51–63.
- Herrero, P. M. (2009). *Formación y funcionamiento de las microcápsulas poliméricas Inesfly: estudio de microscopía óptica y electrónica*. *Rev. Tec. Sater. Ind. Pint. Tint.*, 18: 1-13.
- Huerta, A., Chiffelle, I., Lizana, D., Araya, J.E. (2008). *Actividad insecticida de extractos del fruto de Melia azedarach en distintos estados de madurez sobre Drosophila melanogaster*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 34: 425-432.
- Isman, Murray B. (2017) *Bridging the Gap: Moving Botanical Insecticides from the Laboratory to the Farm*. *Industrial Crops and Products* 110: 10–14. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017304739>.
- Jimenez-Usuga, N del S., Malafronte, N., Cotugno, R. (2016). *New Sesquiterpene Lactones from Ambrosia Cumanensis Kunth*. *Fitoterapia* 113: 170-174. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X16301770>.
- Juárez, J., Villagra de Gamundi, A. (2007). *Bioensayos preliminares para evaluar la toxicidad del lindano sobre Simocephalus vetulus (OF Muller, 1776) (Crustacea: Cladocera)*. *Revista peruana de Biología*, 14(1): 65-67.

- Katinas, L., Gutiérrez, D, Grossi, M., Crisci, J. (2007). *Panorama de La Familia Asteraceae (= Compositae) En La Republica Argentina*. Bol. Soc. Argent. Bot. 42(1-2): 113-129.
- Lewis, A. C., y Van Emden, H. F. (1986). *Assays for insect feeding*. In *Insect-plant interactions*. Springer, New York, NY. Pp. 95-119.
- Linder, Ch., Markus, A., Schuster, D., Strongin, P. (2005) *Formulaciones que contienen aceites esenciales microencapsulados*. ES2344416T3.
- Mabry, T.J., Gill, J.T.( 1977). *Antifeedant Sesquiterpene Lactones in the Compositae*. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. Host Plant Resistance to Pest. Paul A. Hendin (Ed.). Pp 1-449.
- Mareggiani G. (2001). *Manejo de Insectos Plaga Mediante Sustancias Semioquímicas de Origen Vegetal*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 60: 22-30.
- Martínez, C., Soria, C.A., León, R. (2019). *Morfología comparativa del corión del huevo de Symmetrischema tangolias (Gyen 1913) y Tecia solanivora (Povolny 1973), polillas del cultivo de Solanum tuberosum*. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB, 40(1): 11-22.
- Martínez, L.C., Valencia, C., Aldana, R.C. (2008). *Efecto letal y subletal causado por un extracto cítrico sobre Demotisca neivai (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Palmas, 29: 39-46. <https://www.researchgate.net/publication/236612179>.
- Metzger, F.W, Grant, D.H. (1932). *Repellency to the Japanese Beetle of Extracts Made from Plants Immune to Attack*. USDA. Tech.Bull. 299. Eger, H. (1937). *Über Den Geschmacksinn von Schmetterlingsraupen*. Biol. Zbl. 57: 293-308.
- Pascacio-Villafán, C., Williams, T., Birke, A., Aluja, M.( 2016). *Nutritional and nonnutritional food Components modulate phenotypic variation but not physiological trade-offs in an Insect*. Sci. Rep. 6: 1-11.
- Pereira, K.D., Quintela, E.D., Da Silva, D.J., Do Nascimento, V.A., Da Rocha, D.V., Silva, J.F, Forim, M.R., Silva, F.G., Cazal, C.D. (2018). *Characterization of Nanospheres Containing Zanthoxylum riedelianum Fruit Essential Oil and Their Insecticidal and Deterrent Activities against Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae)*. Molecules 23( 8): 2052-2061.
- Pérez Contreras, T. (1999). *La Especialización En Los Insectos Fitófagos: Una Regla Más Que Una Excepción*. Evolución y Filogenia de Arthropoda. Ecología Evolutiva: 26: 559-576.
- Picman, A.K. (1986). *Biological Activities of Sesquiterpene Lactones*. Biochem. Sys. Ecol. 14: 255-281.
- Ponsankar, A., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Thanigaivel, A., Edwin, E.S., Selin-Rani, S., Paik, C.H. (2016). *Target and non-target toxicity of botanical insecticide derived from Couroupita guianensis L. flower against generalist herbivore, Spodoptera litura Fab. and an earthworm, Eisenia foetida Savigny*. Ecotoxicology and environmental safety, 133: 260-270
- Popa, V.I., Dumitru, M., Volf, I., Anghel, N. (2008). *Lignin and Polyphenols as Allelochemicals*. Industrial Crops and Products 7(2): 144-149.
- Qing He, Xin Chao Liu, Rui Qi Sun, Zhi Wei Deng, Shu Shan Du, Zhi Long Liu, (2014). *Mosquito Larvicidal Constituents from the Ethanol Extract of Inula racemosa Hook. f. Roots against Aedes albopictus*. Journal of Chemistry Article ID 738796. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/738796>
- Ramos, G., Frutos, P., Giráldez, F., Mantecón, A.R. (1998). *Los Compuestos Secundarios de Las Plantas En La Nutrición de Los Herbívoros*. Archivos de Zootecnia 47(180): 596-620.



- Rattan, R. (2010). *Mechanism of Action of Insecticidal Secondary Metabolites of Plant Origin*. Crop Protection 29: 913–920.
- Repetto, M., Sanz, P., Jurado, C., López-Artíguez, M., Menéndez, M., De la Peña, E. (1995). *Glosario de términos toxicológicos*. copyright c.
- Rivas, A.L. (2007). *Claves para identificar malezas asociadas con diversos cultivos en el Estado Monagas, Venezuela I. Monocotiledóneas*. Revista Científica UDO Agrícola, 7(1): 79-90.
- Robinson, H., Bohlmann, F., King, R.N. (1980). *Chemosystematic Notes on the Asteraceae. III. Natural Subdivisions of the Vernoniae*. Phytologia 46: 421–436.
- Rodriguez, E.G., Towers, H.N., Mitchell, J.C. (1976). *Review. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones*. Phytochemistry 15: 1573–1580.
- Rossetti, M.R., Defagó, M.T., Carpinella, M.C., Palacios, S.M., Valladares, G. (2017). *Biological activity of extracts of Melia azedarach on larvae of Spodoptera eridania (Lepidoptera: Noctuidae)*. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 67(1-2): 115-125.
- Ruiz-Reyes, E., Suarez, M. (2015). *Lactonas Sesquiterpénicas. Diversidad Estructural y Sus Actividades Biológicas*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 46(1): 9–24.
- Scroggins, R. P. (1999). *Guidance Document on Application and Interpretation of Single-species Tests in Environmental Toxicology*, Report EPS 1/RM/34. Environmental Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Sehnal F., Metwally M. M., Gelbič I. (1976). *Reactions of Immature Stages of Noctuid Moths to Juvenoids*. Journal of Applied Entomology 81: 85–102.
- Soujanya, P.L., Sekhar, J.C., Kumar, P. (2016). *J. Food Sci Technol* 53: 2169-2184. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2161-0>.
- Swee K.Y., Wan Y.H., Boon K.B. (2010). *Vernonia amygdalina, an Ethnoveterinary and Ethnomedical Used Green Vegetable with Multiple Bio-Activities*. Journal of Medicinal Plants Research 4(25): 2787–2812.
- Toyang, N.J., Verpoorte, R. (2013). *A Review of the Medicinal Potentials of Plants of the Genus Vernonia (Asteraceae)*. Journal of Ethnopharmacology 146(3): 681–723. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411300069X>.
- Waldbauer, G. P. (1968). *The consumption and utilization of food by insects*. In Advances in insect physiology. Academic Press. Vol. 5: 229-288.
- Wu, Jie-Wei, Chun-Ping Tang, Yao-Yao Cai, (2017) *Cytotoxic Germacrane-Type Sesquiterpene Lactones from the Whole Plant of Inula Cappa*. Chinese Chemical Letters 28(5): 927–930. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841716303989>.

# CAPÍTULO 14

## DORMANT RUPTURE AND HORMONES LEVELS IN *Jatropha curcas* L. AND *Jatropha macrocarpa* GRISEB SEED

Data de submissão: 10/09/2021

Data de aceite: 29/09/2021

**Oscar Terenti**

Laboratorio Fisiología Vegetal  
Facultad de Ingeniería y  
Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de San Luis  
Villa Mercedes, Argentina  
Estación Experimental Agropecuaria  
INTA-SAN LUIS  
Villa Mercedes, Argentina  
CV

**Erika Ayelen Escudero**

Laboratorio Fisiología Vegetal  
Facultad de Ingeniería y  
Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de San Luis  
Villa Mercedes, Argentina  
CV

**Nancy Elisabeth Tavecchio**

Laboratorio Fisiología Vegetal  
Facultad de Ingeniería y  
Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de San Luis  
Villa Mercedes, Argentina  
CV

**Lihué Olmedo Sosa**

Laboratorio Fisiología Vegetal  
Facultad de Ingeniería y  
Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de San Luis  
Villa Mercedes, Argentina  
CV

**Ana Edit Vigliocco**

Departamento de Ciencias Naturales  
Facultad de Ciencias Exactas  
Físico-Químicas y Naturales  
Universidad Nacional de Río Cuarto  
Río Cuarto, Argentina  
CV

**Hilda Pedranzani**

Laboratorio de Fisiología Vegetal  
Facultad de Química Bioquímica y Farmacia  
Universidad Nacional de San Luis  
San Luis, Argentina  
CV

**ABSTRACT:** *J. curcas* L. and *J. macrocarpa* Griseb. are perennial shrub with the greatest importance mainly from its biofuel potential. Several authors consider that seed tegument is one of the factors that induce dormancy. The aim of the work was to study the role of tegument and abscisic acid (ABA) y jasmonic acid (JA) in dormancy and germination in

these species. *J. macrocarpa* present dormancy since it does not germinate by traditional methods. Consequently, seeds of *J. macrocarpa* were subjected to different treatments to break seed dormancy: T1) Control; T2) Scarification with sandpaper; T3) Total elimination of the tegument; T4) Immersion in boiling water; T5) Alternating hot and cold water; T6) Immersion in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 15 min; T7) Immersion in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min; T8) Stratification in wet and cold paper; T9) Stratification in moist sand and cold. After each treatment the seeds were placed in Petri dishes containing distilled water at 30°C temperature. Germination percentages (GP) were determined during 30 days. We used 20 seeds by treatment, with three replications each one. ABA and JA were extracted and purified from both *Jatropha* species tegument. These hormones were identified and quantified from tissue using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry (MS). The total removal of tegument showed a 50% increase in germination percentage, with the other treatments achieved between 0-10%. JAs were the most abundant compound detected in tegument. ABA level was higher in *J. curcas* (628%) than in *J. macrocarpa*, for this reason we assume that the tegument ABA level is not directly linked to germination and/or dormancy of these *Jatropha* species. In contrast, level of JAs was higher in *J. macrocarpa* (101%) than in *J. curcas*. In effects JA could have a roll in inhibition of germination of *J. macrocarpa* seeds.

**KEYWORDS:** Dormancy. Phytohormones. Seeds. *Jatropha*.

## 1 INTRODUCTION

The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae) includes 172 species native to Central America and is also widely distributed in Africa, Asia and South America. In Argentina, it is reported that 11 native species of *Jatropha* include *J. curcas* L. and *J. macrocarpa* Griseb. These plants are perennial deciduous shrub, with the greatest importance mainly from its biofuel potential (Tang *et al.*, 2011). *J. curcas* and *J. macrocarpa* growing in semi-arid and arid soils, and their non-edible seeds have high oil content (Achten *et al.*, 2008).

While that *J. curcas* has aroused much interest worldwide as a new oleaginous crop for biodiesel, it is not a suitable crop for arid zones and plants are sensitive to frost (Andrade *et al.*, 2008) and need annual rainfall is greater than 700 mm for good fruit production (Achten *et al.*, 2008). In arid areas with winter frost, the species *J. macrocarpa* could be an interesting alternative because its natural distribution area presents in such climatic conditions (Wassner *et al.*, 2012).

To achieve a good production of a crop, it is essential to know the ability of the species to successfully complete two critical stages in the life cycle such as germination and seedling establishment. On the other hand, the plants have evolved seed dormancy, a temporal suppression of germination under the conditions favorable to germination; which ensures that seeds germinate at the appropriate time. Dormancy is a complex trait

because it is influenced by both environmental and endogenous factors. Moreover, the final level of dormancy is determined by the contributions of the different tissues that comprise a seed; between them the seed coat (Lee *et al.*, 2010) (Smykal *et al.*, 2014). Induction of seed dormancy during the maturation stage and its release at a dry state after a certain period of time, which is called “after-ripening”, is widespread phenomena observed in diverse species of seed plants (Beuley *et al.*, 2013). In fact, in various species the mechanisms related to dormancy imposed by the seed head are related to restrictions the permeability of water and/or oxygen, with the existence of a mechanical resistance to the protrusion of the radicle, with the presence of inhibitors and/or the inability to leach inhibitors from the embryo Debeaujon *et al.*, 2000) (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Studies previous showed high variation in *J. curcas* seeds germination (Ginwall *et al.*, 2005) (Ahamad *et al.*, 2013).

This variation is influenced by genotype, age, storage conditions of the seed and environmental conditions of the crop (Islam *et al.*, 2009) (Pompelli *et al.*, 2010) (Windauer *et al.*, 2012) (Duong *et al.*, 2013) (Moncaleano-Scandon *et al.*, 2013). The germination rate decreases with age and with the storage of seed, this strongly affects the content of reserve substances in seeds and low germination rate (Moncaleano-EsScandon *et al.*, 2013). Also, it has been reported that the mechanical rupture of the tegument as a pre-planting treatment significantly increased seed germination and slightly stimulated the growth of *J. curcas* seedlings (Marcello *et al.*, 2015) *J. curcas* and *J. macrocarpa* present a hard seminal covering that encloses the endosperm and the embryo. Several authors consider that this tegument is one of the factors that induce dormancy in *J. curcas* (Windauer *et al.*, 2012) (Mohan *et al.*, 2011); however, in the *J. macrocarpa* the effects of the tegument in the low germinative power, is not yet studied. Several plant hormones play a role in dormancy and germination control (Linkies and Leubner-Metzger, 2012) (Arc *et al.*, 2013). Abscisic acid (ABA) is one of such hormone; that plays a prominent role in dormancy and germination control in coordinated interaction with various others (Nonogaky *et al.*, 2014) (Nambara *et al.*, 2010) (Shu *et al.*, 2016). Recently, evidences have been provided for an interaction between ABA and jasmonates (JAs) in the regulation of these processes (Dave *et al.*, 2016) (Xu *et al.*, 2016). In particular, in ABA-JA interaction, Dave *et al.* (2016) confirmed that *Arabidopsis thaliana* seed dormancy is correlated with the accumulation level of oxo-phytodienoic-acid (OPDA), which acts synergistically with ABA, ABI5 transcription factor, DELLA RGL2 protein and MFT dormancy promoting factor in regulation of this process. On the contrary, Xu *et al.* (2016) reported that JAs and ABA have opposing roles in the regulation of dormancy release by stratification in wheat.

We hypothesize that the tegument is one of the factors that induce dormancy. The aim of the work was to study the role of tegument and abscisic acid (ABA) y jasmonic acid (JA) in dormancy and germination in these species.

## 2 MATERIAL AND METHODS

Seeds of *J. macrocarpa* were collected in a wild population located 30 km south of La Rioja city, Argentina (29.3°S; 66.8°W, 438 m above sea level) while the seeds of *J. curcas* were obtained from experimental plots located in Siete Palmas, Formosa, Argentina (58°17'59.67"W - 25°13'21.04"S).

### 2.1 SEED MORPHOLOGY

Ten *J. macrocarpa* and *J. curcas* seeds were imbibed in distilled water for 24 h to facilitate removal of tegument to observe the embryo and nutritive tissues and ten endosperm of each species were obtained.

### 2.2 SEED TREATMENTS TO BREAK DORMANCY IN *J. MACROCARPA*

The seeds of *J. macrocarpa* were subjected to different scarification and stratification treatments: T1) Control; T2) Scarification with sandpaper; T3) Total elimination of the tegument; T4) Immersion in boiling water for 1 min and then immersed in cold water for 24 h; T5) Alternating hot and cold water for 5 min each one; T6) Immersion in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 15 min; T7) Immersion in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min; T8) Stratification in wet and cold paper (4 °C) for 90 days; T9) Stratification in moist sand and cold (4 °C) for 90 days. After each treatment the seeds were immediately placed on filter paper in Petri dishes containing 3 ml of distilled water at 30 °C temperature. The test was conducted under dark condition. Germination percentages (GP) were determined during 30 days. We used 20 seeds by treatment, with three replications each one.

The seeds of *J. curcas* don't were subjected to different treatments scarification and stratification because they haven't dormancy.

### 2.3 EXTRACTION AND PURIFICATION OF ENDOGENOUS HORMONES

ABA and JA were extracted from both *Jatropha* species tegument using a modification of the protocol of Durgbanshi *et al.* (2005). 200 mg of tegument were homogenized in a mortar with liquid nitrogen and 5 ml ultra-pure water. D6-ABA (NRC-Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Canada) and D6-JA (Leibniz-Institute of Plant

Biochemistry, in Halle, Germany) were used as internal standards. Extracts were transferred to 50 ml tubes, centrifuged at 1500x g for 15 min, pH of the supernatant was adjusted to 2.8 with 15% acetic acid, and supernatant was partitioned twice against an equal volume of diethyl ether. The aqueous phase was discarded, and the organic fraction was evaporated under vacuum. Dried extracts were dissolved in 1 ml methanol. Samples were filtered through a syringe filter tip on a vacuum manifold at flow rate < 1 ml min<sup>-1</sup>, and the eluate was evaporated at 35 °C under vacuum in a SpeedVac SC110 (Savant Instruments Inc. NY, USA). The assay employed four biological replicates.

## 2.4 HORMONE IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-ESI MS-MS)

ABA and JAs were separated from tissue using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). An Alliance 2695 separation module (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a RestekC<sub>18</sub> column (100 m × 2.1 mm, 3 μm) was used to maintain performance of the analytical column. Fractions were separated using a gradient of increasing methanol concentration, constant glacial acetic acid concentration (0.2% in water) and initial flow rate 0.2 ml.min<sup>-1</sup>. The gradient was increased linearly from 40% methanol/60% water-acetic acid at 25 min, to 80% methanol/20% water-acetic acid. After 1 min, the initial conditions were restored, and the system was allowed to equilibrate for 7 min. The identification and quantification of all hormones was performed with a quadruple tandem mass spectrometer (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, UK) fitted with an electrospray ion (ESI) source, in multiple reactions monitoring mode (MRM) using precursor ions and their transitions ABA (m/z 263/153) and D6-ABA (m/z 269/159) and JAs (m/z 209/59), D6-JA (m/z 215/59), with retention times of 8.25 and 14.30 min, respectively. The collision energies used were 20 eV for JAs and ABA, and the cone voltage was 35 V. The spec spectrometry software used was Mass Lynx version 4.1 (Micromass).

## 2.5 STATISTICAL ANALYSIS

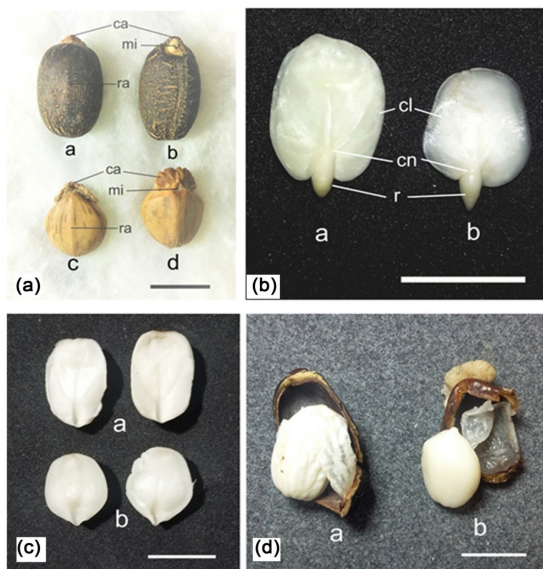
Analysis of variance (ANOVA) was applied and data were subjected to Multiple Range the Duncan. Test using the software INFOSTAT-UNC.

## 3 RESULTS

### 3.1 EXTERNAL AND INTERNAL SEED MORPHOLOGY

Seeds of *J. curcas* are oblong in shape with a convex dorsal area along which the raphe is visualized and in the hilar region a small conical caruncle of ivory color is observed (Figure 1(a), a). The average measurements of these seeds are: length  $1.8 \pm 0.03$  cm, width  $1.0 \pm 0.01$  cm and thickness  $0.8 \pm 0.02$  cm. The tegument is very dark brown, smooth with porous texture and with small cracks that are more evident in the ventral zone. In this area, in the center of the caruncle the micropyle is observed (Figure 1(a), b). The tegument of *J. macrocarpa* is also smooth but light brown, mottled with dark brown. The seeds are subspherical, on average they are  $1.5 \pm 0.05$  cm long,  $1.3 \pm 0.04$  cm wide and  $0.9 \pm 0.02$  cm thick. The dorsal area is slightly convex and is traversed by an evident raphe (Figure 1(a), c) in these seeds the ventral zone is the most convex and to the hilar zone end is inserted. With a prominent caruncle that forms a ridge with irregular edges, the micropyle can be seen at the base of the crest (Figure 1(a), d). The embryo of *J. curcas* has a cylindrical radicle of approximately 6 mm in length and two whitish ovoid, foliate, cotyledons that are inserted into the embryonic axis knot at its base. The blade of these leaves are thin and show a trinervia venation as it presents three main nerves that are born from the base of the blade foliar, two of them open laterally. The ribs are very marked on both the abaxial and adaxial sides (Figure 1(b)). In *J. macrocarpa* the embryo is smaller than in *J. curcas*, the radicle reaches 3 mm in length and its apex is markedly conical, its cotyledons are broad-bodied with apex rounded. The blade is fleshy and also trinervia although the ribs are less evident than in *J. curcas* (Figure 1(b)). In both species the cotyledons are faced for their adaxial face protecting the sheepish, and are externally surrounded by the nutrient tissue that in these seeds is the endosperm with compactly arranged isodiametric parenchyma cells (Tavecchio *et al.*, 2019). This nutrient tissue is strongly attached to the embryo and has on its outer surface the impression of the radicle and the veins running along the abaxial surface of each cotyledon blade (Figure 1(c)). On the outside the endosperm is protected by a whitish membrane that is in contact with the tegument. The protective membrane of the seed of *J. curcas* is thicker and is furrowed by a set of important veins that leave their imprint on the inner side of the endosperm to which it covers firmly (Figure 1(d)). This membrane in *J. macrocarpa* is very tenuous and although this innervate does not form remarkable grooves in the surface of the same (Figure 1(d)).

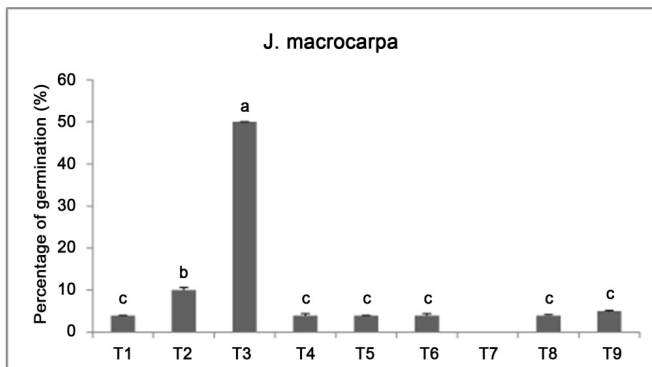
Figure 1.(a) Visual external aspect of seeds of *J. curcas* (a and b) and *J. macrocarpa* (c and d). (b) Embryo of *J. curcas* (a) and *J. macrocarpa* (b). (c) Internal surfaces of the endosperm in contact with the embryo of *J. curcas* (a and b) and *J. macrocarpa* (c and d). (d) Seeds with broken tegument showing the outer surface of the endosperm and the protective membrane, *J. curcas* (a) and *J. macrocarpa* (b). Abbreviations: ca caruncle; cl, co- tyledonal leaf; cn, cotyledonal node; r, radical; mi, micropyle; ra, raphe. Scale bar = 1 cm.



### 3.2 BREAK DORMANCY

*J. macrocarpa* presents dormancy since it does not germinate by traditional methods. The effect of the different treatments to break seed dormancy of *J. macrocarpa* is showed in Figure 2. The total removal of tegument showed a 50% increase in germination percentage, with the other treatments achieved between 0%-10%. The seeds of *J. curcas* germinate without treatments for that reason the treatment was done only in the seeds of *J. macrocarpa*.

Figure 2. Scarification and stratification treatments of *J. macrocarpa* seeds. T1) Control (not ripping); T2) Scarification with sandpaper; T3) Total elimination of the tegument; T4) Immersion in boiling water 1 minute and cold water 24 h; T5) Alternating hot and cold water; T6) Immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 15 min; T7) Immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min; T8) Stratification in paper and cold (4 °C); T9) Stratification in moist sand and cold (4 °C). Values are mean ± SE from triplicate experiments. Different letters indicate significant differences (p ≤ 0.05).





### 3.3 ABA AND JAS LEVEL IN *JATROPHA* TEGUMENT

ABA and JAs were detected in tegument of *J. macrocarpa* and *J. curcas* seeds. JAs were the most abundant compound. Level of JAs was higher in *J. macrocarpa* (101%) than in *J. curcas*. In contrast, ABA level was higher in *J. curcas* (628%) than in *J. macrocarpa* (Table 1).

Table 1. JA and ABA contents in *J. curcas* and *J. macrocarpa*. Values are mean  $\pm$  SE from triplicate experiments. Different letters indicate significant difference ( $p > 0.05$ ).

Hormones	Species	Content (pmol·g <sup>-1</sup> FW)
JA	<i>J. curcas</i>	8369.26 $\pm$ 2682.33 b
	<i>J. macrocarpa</i>	16860.41 $\pm$ 1482.22 a
ABA	<i>J. curcas</i>	737.96 $\pm$ 68.82 a
	<i>J. macrocarpa</i>	101.29 $\pm$ 27.08 b

## 4 DISCUSSION

External morphology of the seeds of *J. curcas* and *J. macrocarpa* allow different them easily since they vary in size, shape and coloration of the tegument and the caruncle. Internally also the embryos show evident differences in special, in form, size and thickness of the foliar cotyledons and in length and shape of the radicle. Nevertheless, both species are endosperm and this tissue surrounds firmly to the embryo. The internal structure of these seeds is unusual in dicotyledons, but is common in Euphorbiaceae. A similar organization has been described for the seeds of other species of this family as *Ricinus communis* L. (Sing, 1954), *Croton floribundus* Spreng y *Croton urucurana* Baill (Paoli *et al.*, 1995), *Jatropha elliptica* Mull. Arg. (Añes *et al.*, 2005) and *Cnidoscclus juercifolius* Paxe K. Hoffm (Silva *et al.*, 2007).

Morphological characteristics found in the seeds of *J. curcas* were in many aspects coincident with those described previously by Loureiro *et al.*, (2013) although the cotyledon form for these authors is cordiform, with the narrow apex and a broad base excavated and rounded while for us they are ovoid.

The protective seed membrane that is located between the tegument and that tightly binds to the endosperm in *J. curcas*, it carry microorganisms that will hamper the seed germination (Mohan *et al.*, 2011). Nevertheless, the tegument is a major barrier to radicle protrusion for many seeds (Zhang *et al.*, 2008), whose physical properties determine its effect on seed germination (Debeaujon *et al.*, 2000). Our results showed

that germination percentage of *J. macrocarpa* seeds with intact tegument was very low (4%). However, when the tegument was removed completely increased GP (from 4% to approximately 50%). These results indicate the presence of physical dormancy in *J. macrocarpa* seeds. In fact, it was reported that mechanical or chemical scarification can break physical seed dormancy (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Similarly, Zhang *et al.* (2008) demonstrated that the tegument of canola (*Brassica napus*) restricted seed germination at low temperature and this inhibitory effect was more apparent in the yellow seed line compared to the black seed line. It is possible that differences in color of tegument of *J. curcas* and *J. macrocarpa* are also related to the differential level of dormancy observed between these seeds. In many species, the presence of tegument pigmentation color is associated with a different degree of permeability and dormancy (Mac Gregor *et al.*, 2015).

The tegument eliminated of *J. macrocarpa* increase the germination of seeds, from 4% to 50%, so the tegument is directly relationally with de dormancy, although other tissues could be involved in the imposition of dormancy. This is a clear example that dormancy in some seeds resides in their teguments with probable intervention of the hormones, JA in this particular case. In this sense, the seed dormancy can be imposed by the embryo, the envelopes (tegument, endosperm, etc.), or a combination of both factors to an extent that depends on the plant species (Bewley, 1997). Recent physiological and molecular studies have shown that physiological dormancy includes an embryo and coat component, and their sum and interaction determine the degree of whole-seed physiological dormancy (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). In fact, the dormancy attributed to different tissues of the seed has been reported in different species (Brunick, 2007) (Gu *et al.*, 2015).

Hormones found in the dry seed are generally provided from the mother plant during seed maturation; in some cases, hormones leak from the embryo during late embryogenesis (Finkelstein *et al.*, 2002). On the other hand, the mechanisms that lead to the definition of the structures composing the seed are highly coordinated and extremely complex and they involve a tight hormonal control and a continuous interchange of signals from and to the maternal tissues (Loscacio *et al.*, 2014). There is considerable evidence that ABA is an important positive regulator of both the induction of dormancy and their maintenance (Nambara *et al.*, 2010). We found that the tegument of *J. macrocarpa* dry seed have a significantly lower ABA content than *J. curcas*, for this reason we assume that the tegument ABA level is not directly linked to germination and/or dormancy of these *Jatropha* species. Indeed, in *Arabidopsis thaliana* the final ABA levels present in mature dry seeds are unrelated to the depth of dormancy (Lee *et al.*, 2010) (Ali-Rachedi

*et al.*, 2004) that suggest that ABA abundance or signaling, or both, play an indirect role in promoting seed dormancy during seed development (Chahtane *et al.*, 2017). In contrast, different studies have shown that the seed structures surrounding the embryo contain compounds possessing germination inhibitory activities including ABA (Bewley *et al.*, 2013). For example, Jin *et al.* (1995) showed that high concentrations of ABA in pericarp and seed coat of rose achene could be inhibiting germination. Respect to JAs, there is no functional evidence supporting a role for a correlation between endogenous content in dry seed and level of seed dormancy. For example, Preston *et al.*, 2009 showed that in dry seed of *Arabidopsis thaliana*, the JAs content in non dormant seeds was ten-fold higher than in dormant seeds. On the contrary, Andrade *et al.*, 2015 showed a high JAs content in pericarp of dormant B123 sunflower cypselas. In agree to the findings of Andrade *et al.*, 2015, we found higher JA levels in tegument of *J. macrocarpa* respect to *J. curcas*. In effects JA could have a roll in inhibition of germination of *J. macrocarpa* seeds.

## 5 CONCLUSION

This study has demonstrated the characteristics of dormancy of both species proposed for the production of biodiesel. It was shown that *J. macrocarpa* have physical dormancy. These studies are fundamental to face studies in relation to the crop establishment.

## REFERENCES

- Achten, W.M., Verchot, L., Franken, Y.J., Mathijs E., Singh V.P., Aerts R. and Muys B. (2008). *Jatropha Bio-Diesel Production and Use. Biomass and Bioenergy*, 32, 1063-1084. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.03.003>
- Ahamad, S., Joshi, S.K., Arif, M. and Ahmed, Z. (2013). Performance of *Jatropha curcas* L. in Semi-arid Zone: Seed Germination, Seedling Growth and Early Field Growth. *Notulae Scientia Biologicae*, 5, 169-174. <https://doi.org/10.15835/nsb528961>
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P. and Jullien, M. (2004). Changes in Endogenous Abscisic Acid Levels during Dormancy Release and Maintenance of Mature Seeds: Studies with the Cape Verde Islands Ecotype, the Dormant Model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219, 479-488. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1251-4>
- Almeida, A.Q., Souza, R.M.S., Silva, M., Silva, S.M.S.E., de Oliveira Junior, I.S., de Sousa Cavalcante, F. and da Silva Melo, J.A. (2016). Space-Time Dependence of *Jatropha* Growth Parameters Grown in Brazilian Semi-arid. *Revista Caatinga*, 29, 358-366. <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n212rc>
- Andrade, A., Riera, N., Lindström, L., Alemanno, S., Alvarez, D., Abdala, G. and Vigliocco, A. (2015). Pericarp Anatomy and Hormone Profiles of Cypselas in Dormant and Non-Dormant Inbred Sunflower Lines. *Plant Biology*, 17, 351-360. <https://doi.org/10.1111/plb.12244>

Andrade, G.A., Caramori, P.H., De Souza, F.S., Marur, C.J. and de Arruda Ribeiro, A. (2008). Temperatura mínima letal para plantas jovens de pinhão-manso [Mini- mum Lethal Temperature for Seedlings of the Oil Seed Plant]. *Bragantia*, 67, 799-803. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052008000300031>

Añes, L.M.M., Coelho, M.F.B., Albuquerque, M.C.F. and Dombroski, J.L.D. (2005). Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 28, 563-568. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000300012>

Arc, E., Secher, J., Corbineu, F., Raijhou, L. and Marion-Poll, A. (2013). ABA Cross- talk with Ethylene and Nitric Oxide in Seed Dormancy and Germination. *Frontiers in Plant Science*, 4, 63. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00063>

Bewley, J.D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 96, 1055-1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>

Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. *Springer, New York, NY*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>

Brunick, R.L. (2007). Seed Dormancy in Domesticated and Wild Sunflowers (*Helianthus annuus* L.): Types, Longevity and QTL Discovery. *Doctoral Dissertation, Department of Horticulture, Oregon State University*, 63.

Chahtane, H., Kim, W. and Lopez-Molina, L. (2017). Primary Seed Dormancy: A Temporally Multilayered Riddle Waiting to Be Unlocked. *Journal of Experimental Botany*, 68, 857-869.

Dave, A., Vaistj, F.E., Gilday, A.D., Penfield, S.D. and Graham, I.A. (2016). Regulation of *Arabidopsis thaliana* Seed Dormancy and Germination by 12-Oxo-Phytodienoic Acid. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2277-2284. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw028>

Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M. and Koornneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122, 403-414. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.403>

Duong, T.H., Shen, J.L., Luangviriyasaeng, V., Ha, H.V. and Pinyopusarerk, K. (2013). Storage Behaviour of *Jatropha curcas* Seeds. *Journal of Tropical Forest Science*, 22, 193-199.

Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V. and Gómez Cadenas, A. (2005). Simultaneous Determination of Multiple Phytohormones in Plant Extracts by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8437-8442. <https://doi.org/10.1021/jf050884b>

Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed Dormancy and the Control of Germination. *New Phytologist*, 171, 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787>

Finkelstein, R.R., Gampala, S.S. and Rock, C.D. (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *Plant Cell*, 146, 15-45. <https://doi.org/10.1105/tpc.010441>

Ginwal, H.S., Phartyal, S.S., Rawat, P.S. and Srivastava, R.L. (2005). Seed Source Variation in Morphology, Germination and Seedling Growth of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. *Silvae Genetica*, 54, 76-80. <https://doi.org/10.1515/sg-2005-0012>

Gu, X.Y., Zhang, J., Ye, H., Zhang, L. and Feng, J. (2015). Genotyping of Endosperms to Determine Seed Dormancy Genes Regulating Germination through Embryonic, Endospermic, or Maternal Tissues in Rice. *G3 (Bethesda)*, 5, 18 3-193. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015362>

Islam, A.K.M.A., Anuar, N. and Yaakob, Z. (2009). Effect of Genotypes and Pre-Sowing Treatments on Seed Germination Behaviour of *Jatropha*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8, 433-439. <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.433.439>

Jin, B., Dong, H. and Yang, X. (1995). Shortening Hybridization Breeding Cycle of Rose a Study on Mechanisms Controlling Achene Dormancy. *Acta Horticulturae*, 404, 40-47.

Lee, K.P., Piskurewicz, U., Turecková, V., Strnad, M. and Lopez-Molina, L. (2010). A Seed Coat Bedding Assay Shows That RGL2-Dependent Release of Abscisic Acid by the Endosperm Controls Embryo Growth in Arabidopsis Dormant Seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 19108-19113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012896107>

Linkies, A. and Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond Gibberellins and Abscisic Acid: How Ethylene and Jasmonates Control Seed Germination. *Plant Cell Reports*, 31, 253-270. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1180-1>

Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J. and Varotto, S. (2014). Current Perspectives on the Hormonal Control of Seed Development in Arabidopsis and Maize: A Focus on Auxin. *Frontiers in Plant Science*, 5, 412. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00412>

Loureiro, M.B., Clarissa Abreu Santos Teles, C.S., Argolo Colares, C.C., Nascimento de Araújo, B.R., Gonzaga Fernández, L. and Delmondez de Castro, R. (2013) Caracterização morfoanatômica e fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) 2013. *Revista Árvore*, 37, 1093-1101. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000600011>

Mac Gregor, D.R., Kendall, S.L., Florance, H., Fedi, F., Moore, K., Paszkiewicz, K., Smirnov, N. and Penfield, S. (2015). Seed Production Temperature Regulation of Primary Dormancy Occurs through Control of Seed Coat Phenylpropanoid Metabolism. *New Phytologist*, 205, 642-652. <https://doi.org/10.1111/nph.13090>

Marcello, L., Nicla, C., Luca, G. and Maurizio, M. (2015). Effects of Pre-Sowing Treatments on *Jatropha curcas* Seed Germination and Seedling Growth. *African Journal of Agricultural Research*, 10, 2553-2561. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9788>

Mohan, N., Nikdad, S. and Singh, G. (2011). Studies on Seed and Embryo Culture of *Jatropha curcas* L. under in Vitro Conditions. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, 1, 187-194.

Moncaleano-Scandon, J., Silva, B.C.F., Silva, R.S., Granja, J.A.A., Alves, M.C. and Pompelli, M.F. (2013). Germination Responses of *Jatropha curcas* L. Seeds to Storage and Aging. *Industrial Crops and Products*, 44, 684-690. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.035>

Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M. and Kamiya, Y. (2010) Abscisic Acid and the Control of Seed Dormancy and Germination. *Seed Science Research*, 20, 55-67. <https://doi.org/10.1017/S0960258510000012>

Nonogaki, H. (2014). Seed Dormancy and Germination-Emerging Mechanisms and New Hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, 5, 233. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00233>

Paoli, A.A.S., Freitas, L. and Barbosa, J.M. (1995). Caracterização morfológica dos frutos, sementes e plântulas de *Croton floribundus* Spreng. e de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 17, 57-68. <https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v17n1p57-68>

Pompelli, M.F., da Rocha Gomes Ferreira, D.T., da Silva Cavalcante, P.G., de Lima Salvador, T., de Hsie, B.S. and Endres, L. (2010). Environmental Influence on the Physic-Chemical and Physiological Properties of *Jatropha curcas* Seeds. *Australian Journal of Botany*, 58, 421-427. <https://doi.org/10.1071/BT10102>

Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M. and Nambara, E. (2009). Temporal Expression Patterns of Hormone Metabolism Genes during Imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds: A Comparative Study on Dormant and Non-Dormant Accessions. *Plant and Cell Physiology*, 50, 1786-1800. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp121>

Silva, L.M.M., Aguiar, I.B. and Tertuliano, S.S.X. (2007). Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Cnidoscopus juercifolius* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 7, 1519-5228.

Singh, R.P. (1954). Structure and Development of Seeds in Euphorbiaceae: *Ricinus communis* L. *Phytomorphology*, 4, 118-123.

Shu, K., Liu, X.-D., Xie, Q. and He, Z.-H. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant*, 9, 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010>

Smykal, P., Vernoud, V., Blair, M.W., Soukup, A. and Thompson, R.D. (2014) The Role of the Testa during Development and in Establishment of Dormancy of the Legume Seed. *Frontiers in Plant Science*, 5, 351.

Tang, M., Liu, X., Deng, H. and Shen, S. (2011). Over-Expression of JcDREB, a Putative AP2/EREBP Domain-Containing Transcription Factor Gene in Woody Biodiesel Plant *Jatropha curcas*, Enhances Salt and Freezing Tolerance in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 181, 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.014>

Tavecchio, N., Dardanelli M., Reguera Y., Reinoso H., Terenti O., Garbero M. and Pedranzani H. (2019). Potencial Technological Use of Reserves of *Jatropha curcas* L. and *J. macrocarpa* Griseb. *American Journal of Plant Sciences*, 10, 1444-1456. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.108102>

Windauer, L., Martinez, J., Rapoport, D., Wassner, D. and Benech-Arnold, R. (2012). Germination Responses to Temperature and Water Potential in *Jatropha curcas* L. Seeds. A Hydrotime Model Explains the Difference between Dormancy Expression and Dormancy Induction at Different Incubation Temperatures. *Annals of Botany*, 109, 265-273. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr242>

Xu, Q., Truong, T.T., Barrero, J.M., Jacobsen, J.V., Hocart, C.H. and Gubler, F. (2016). A Role for Jasmonates in the Release of Dormancy by Cold Stratification in Wheat. *Journal Experimental of Botany*, 67, 3497-3508. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw172>

Zhang, X.K., Chen, J., Chen, L., Wang, H.Z. and Li, J.N. (2008). Imbibition Behavior and Flooding Tolerance of Rapeseed Seed (*Brassica napus* L.) with Different Testa Color. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 1175-1184. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9318-x>

# CAPÍTULO 15

## DESAFIOS NO ENSINO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS BIOFILMES

Data de submissão: 08/09/2021

Data de aceite: 24/09/2021

### Manuel Simões

LEPABE

Departamento de Engenharia Química  
Faculdade de Engenharia  
Universidade do Porto, Portugal  
ORCID ID: 0000-0002-3355-4398

### Lúcia Chaves Simões

Centro de Engenharia Biológica  
Universidade do Minho, Campus de Gualtar  
Braga, Portugal  
ORCID ID: 0000-0002-4893-1985

### Conceição Fernandes

Centro de Investigação de Montanha (CIMO)  
ESA-IPB, Bragança, Portugal  
ORCID ID: 0000-0003-2873-501X

### Maria José Saavedra

Departamento de Ciências Veterinárias  
Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias  
UTAD, Vila Real, Portugal  
Centro de Investigação e Tecnologias  
Agroambientais e Biológicas (CITAB), UTAD  
Vila Real, Portugal  
ORCID ID: 0000-0002-7492-4965

**RESUMO:** Os biofilmes são o resultado da tendência natural dos microrganismos se fixarem a superfícies (bióticas ou abióticas), multiplicarem e incorporarem numa matriz viscosa de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). À medida que o biofilme se desenvolve, o descolamento e os processos de crescimento entram em equilíbrio, levando a uma quantidade constante de biomassa na superfície e à libertação de células do biofilme que permitem a colonização de superfícies vizinhas e a formação de novas comunidades sésseis. EPS dos biofilmes são responsáveis pela ligação entre as células e com outros materiais particulados. A adaptação bem sucedida das bactérias às mudanças das condições naturais requer também que o microrganismo possa sentir e responder ao seu ambiente externo e, em consequência, modular a expressão dos seus genes. Mesmo que os biofilmes sejam provavelmente a primeira forma de vida comunitária na Terra, a incorporação de aspetos científicos da ciência e tecnologia dos biofilmes nos conteúdos de ensino pré ou pós graduado é uma tarefa desafiante, uma vez que esta área de investigação está em constante evolução.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biofilme. Ciência e tecnologia multidisciplinar. Microbiologia aplicada. Resistência antimicrobiana.

### CHALLENGES IN TEACHING BIOFILM SCIENCE AND TECHNOLOGY

**ABSTRACT:** Biofilms are result of a natural tendency of microorganisms to attach to



surfaces (biotic and abiotic), to multiply and to embed themselves in a slimy matrix of extracellular polymeric substances (EPS). The attachment of microorganisms to surfaces is a very complex process. As biofilm matures, detachment and growth processes come into balance leading to a constant amount of biomass on the surface but also to the release of biofilm cells. These enable the colonization of neighbour surfaces and the formation of new biofilm communities. EPS in biofilm systems are responsible for binding cells and other particulate materials together. The successful adaptation of bacteria to changing natural conditions requires also that the microorganism can sense and respond to its external environment and modulate gene expression accordingly. Even if biofilms are probably the first form of community life on Earth, the incorporation of scientific aspects on biofilm science and technology in teaching content is a challenge task as this research field is constantly evolving.

**KEYWORDS:** Antimicrobial resistance. Applied microbiology. Biofilm. Multidisciplinary science and technology.

## 1 BIOFILMES – ENQUADRAMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS GERAIS E O IMPACTO

Muitos microrganismos têm uma tendência natural para se fixar a superfícies, multiplicar e incorporar numa matriz viscosa, resultando em biofilmes. Supõe-se que a organização de microrganismos em biofilme seja a primeira forma de vida multicelular existente no planeta. Também, é estimado que a maioria dos microrganismos da Terra estão organizados em biofilmes e podem ocorrer em ambientes extremos como centrais nucleares, fontes hidrotermais, ambientes oligotróficos e tubagens industriais sujeitas a forte desinfecção (Costerton et al., 1987). Contudo, a existência de biofilmes só foi documentada de forma pioneira por Zobell, em 1943, que observou células microbianas aderidas em paredes de garrafas. Posteriormente, o termo filme microbiano ou biológico foi atribuído por Atkinson et al. (1964, 1967) à camada gelatinosa de células e dos seus subprodutos aderidos às paredes de um reator biológico. Outros investigadores (Topiwala e Hamer, 1971; Howell et al. 1972) observaram camadas de células bacterianas e as suas substâncias poliméricas extracelulares que designaram como “crescimento de parede”. Bill Characklis (1973a, 1973b) publicou uma marcante e extensa revisão bibliográfica sobre os fundamentos básicos e as implicações práticas dos biofilmes, que designou como “lama microbiana”. Em 1984, um consenso dos principais investigadores na área definiu um biofilme como uma coleção de microrganismos, predominantemente bactérias, embebidos numa matriz tridimensional gelatinosa de polímeros extracelulares excretados pelos microrganismos colonizadores, conforme reportado em Marshall (1984).



A formação de biofilme é um processo complexo, que depende de muitas variáveis, nomeadamente a temperatura, o pH, a velocidade de escoamento do fluido, a concentração de nutrientes, a concentração de desinfetante e a composição e o estado de conservação dos materiais de adesão (Deines et al., 2010; Simões et al. 2010).

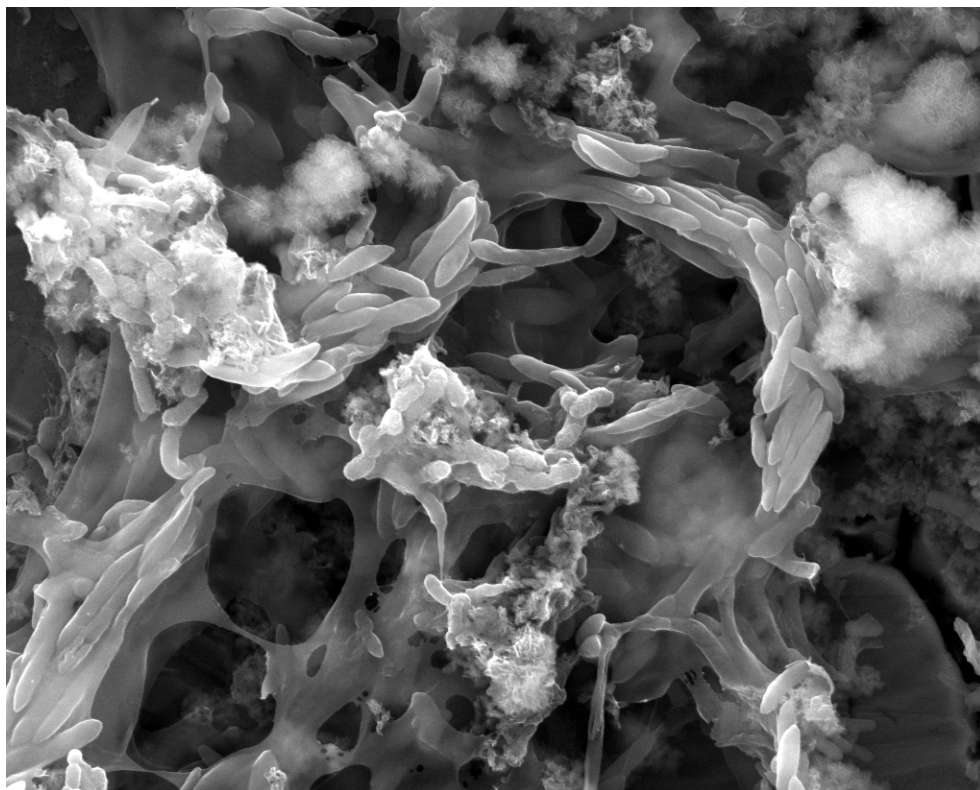
Os mecanismos envolvidos na formação de um biofilme são sequenciais, terminando na formação de uma estrutura madura. No entanto, esta estrutura tem um comportamento dinâmico – fenómenos de crescimento e desprendimento acontecem simultaneamente (Simões et al. 2010).

O transporte dos microrganismos até à superfície é a primeira etapa da formação de um biofilme. Este transporte pode realizar-se por difusão ou convecção. Adicionalmente, poderá existir transporte promovido pelas estruturas de mobilidade celular, como é o caso de microrganismos portadores de flagelos ou de outras estruturas celulares com esta funcionalidade.

Após esta etapa, as células aderem à superfície. Isto resulta de forças de interação entre ambas as superfícies, nomeadamente forças de natureza hidrofóbica e eletrostática. Posteriormente, acontecem fenómenos de comunicação entre as células (quórum sensing), mediados por moléculas sinalizadoras, e a maturação do biofilme - momento em que as células se reproduzem, até atingir um limite máximo. É durante esta etapa que ocorre a formação da matriz de polímeros extracelulares. Esta matriz é altamente hidratada, conferindo ao biofilme estabilidade e resistência a agressões externas, nomeadamente a exposição a antibióticos ou a outros produtos antimicrobianos. Nesta fase, o biofilme pode sofrer desprendimento de células ou de aglomerados de células. Este mecanismo ocorre devido à erosão superficial, em que as camadas mais externas do biofilme libertam células. No entanto, as células residentes do biofilme replicam-se, permitindo que o biofilme permaneça num estado “maduro” ou estado quasi-estacionário.

As células (individuais) e porções de biofilme desprendido podem multiplicar-se e aderir a novas zonas da superfície - iniciando a formação de um novo biofilme. A Figura 1 mostra a estrutura de um biofilme “maduro” formado pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*, numa superfície de aço inoxidável. Nesta imagem é perceptível a existência de células e da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) a envolver as células colonizadoras.

Figura 1 – Biofilme formado pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* obtido por microscopia eletrônica de varrimento (ampliação  $\times 10000$ ). As estrutura bacilar das bactérias é evidente assim como a existência da matriz de EPS a envolver as células.



A formação de biofilmes pode ser benéfica ou pode causar problemas. Biofilmes benéficos são encontrados em sistemas de tratamento biológico de efluentes e em processos industriais de produção de biomoléculas. Diversas configurações de reatores com biofilmes são usados para o tratamento de água residuais. Nestas configurações, e dado que as células se encontram imobilizadas, o seu tempo de permanência no reator é independente do tempo de residência do meio líquido. Em reatores com células suspensas o tempo médio de permanência da fase líquida no sistema não pode ser menor do que o tempo de geração das células, caso contrário estas não têm tempo suficiente para se replicar, sendo removidas do sistema. Bactérias comensais existem em biofilmes da pele e dentro de certos órgãos do corpo humano (Klitgord and Segrè, 2010). Este microbioma natural auxilia nas funções metabólicas e está envolvido na prevenção de doenças (Stephani et al., 2011). Além disso, os biofilmes bacterianos são importantes componentes do ambiente, sendo encontrados em relações simbióticas com raízes de plantas (Chang et al., 2011), em águas estagnadas (Chollet-Imbert et al.,

2009), em rochas submersas (Ridal et al., 2007), e em muitas outras superfícies. Mais recentemente, os biofilmes têm sido estudados para a produção de diversos produtos de interesse biotecnológico (Edel et al. 2019).

Biofilmes indesejáveis podem causar problemas na indústria (incrustação de condutas, permutadores de calor e estruturas marinhas, corrosão de superfícies metálicas induzida por microrganismos, contaminação de produtos alimentares e farmacêuticos) e na saúde (formação de placa dentária, feridas, infecção dos mais diversos tecidos biológicos, contaminação de superfícies e dispositivos médicos). De facto, é reconhecido que 60 a 80% das infeções microbianas se devem à presença de biofilmes (Simões, 2011). Os problemas associados a biofilmes podem variar em importância relativa – desde um simples incómodo a uma ameaça à vida (Hall-Stoodley et al., 2004). A formação destas comunidades sésseis e a sua resistência inerente aos agentes antimicrobianos estão na raiz de muitas infeções bacterianas persistentes e crónicas (Borges et al. 2015; Afonso et al. 2021). No entanto, o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos por parte dos microrganismos em biofilme, não se deve totalmente à falha desses agentes antimicrobianos (Simões et al. 2010). Em vez disso, esta resistência pode ser explicada pela hipótese da existência de limitação no acesso a nutrientes pelas células residentes. Esta limitação faz com que as células dos biofilmes entrem num estado de crescimento lento. Células metabolicamente dormentes ou sem crescimento mostraram ser menos suscetíveis a agentes antimicrobianos comparativamente às mesmas células cultivadas num meio rico em nutrientes, e com elevadas taxas de crescimento (Mah e O’Toole, 2001). Outra hipótese para explicar a reduzida suscetibilidade das células em biofilmes a agentes antimicrobianos é a aquisição de um fenótipo que permite manter as células num estado diferenciado que confere resiliência às agressões externas (Cochran et al., 2000). O uso de agentes antimicrobianos têm sido a principal arma usada para controlar os biofilmes indesejáveis, interferindo com o metabolismo microbiano ou induzindo o seu desprendimento da superfície de adesão. No entanto, muitos agentes antimicrobianos mostraram ser ineficazes na prevenção e no controlo de biofilmes – reforçando a elevada resistência e resiliência das células em biofilmes (Simões et al. 2010; Afonso et al. 2021).

Os biofilmes microbianos podem formar-se praticamente em qualquer material que esteja em contacto com a água. Uma vez formados, são extremamente difíceis de serem completamente removidos (Simões et al. 2010). As células em biofilme têm vantagens em termos de capacidade de sobrevivência comparativamente às mesmas células em suspensão. Além do estado fisiológico das células em biofilme referido anteriormente, a presença da matriz de polímeros extracelulares tem um papel importante na resistência

dos biofilmes à ação de agentes métodos químicos ou físicos para o seu controlo. Esta matriz é constituída predominantemente por água (até 95% em peso húmido) e por substâncias poliméricas extracelulares, particularmente proteínas, polissacáridos e ácidos nucleicos, que providenciam estabilidade ao biofilme - atuando como um escudo protetor das agressões externas (Flemming & Wingender, 2010). Na Tabela 1 estão indicadas algumas propriedades e funções destas substâncias.

Tabela 1 – Propriedades e funções das substâncias poliméricas extracelulares. Baseado em Smirnova et al. (2010) e Simões et al. (2010).

<b>Função da matriz</b>	<b>Natureza das substâncias</b>	<b>O papel no biofilme</b>
<b>Estrutural</b>	Polissacáridos neutros e ácidos	Componente estrutural
	Amilóides	
<b>Adsorativa</b>	Polissacáridos hidrofóbicos ou com carga	Troca iónica, adsorção
<b>Ativante</b>	Enzimas extracelulares	Degradação de moléculas
<b>Superfície ativa</b>	Anfifílicos	Superfície ativa
	Vesículas de membrana	Exportação das células, adsorção
<b>Informativa</b>	Lectinas	Especificidade, reconhecimento
	Ácidos nucleicos	Informação genética, estrutura
<b>Nutritiva</b>	Vários polímeros	Fontes de carbono, nitrogénio e fósforo

## 2 ENQUADRAMENTO DOS BIOFILMES EM CONTEÚDO CURRICULAR

A ciência e tecnologia de biofilmes é uma disciplina técnica relativamente nova, que surgiu em resposta à necessidade de metodologias para o seu controlo. Investigação na área dos biofilmes avançou rapidamente nas últimas décadas como resultado da colaboração de médicos, microbiólogos, bioquímicos, químicos, ecologistas microbianos, engenheiros e matemáticos. Através de uma variedade de técnicas microscópicas e moleculares, a comunidade científica passou a entender muitas coisas sobre a biologia e o comportamento dos biofilmes microbianos. Embora os biofilmes sejam diferentes entre si, *i.e.* a sua composição microbiana, como e onde crescem, a sua virulência, etc, há aspetos gerais que todos os biofilmes tendem a exibir. A existência de tais características possibilitou a aplicação de conceitos de catálise heterogénea para descrever os fenómenos de transporte de massa e de reação biológica nos biofilmes (Simões & Malcata, 2020). Este é um dos poucos exemplos que permitiu a inclusão da presença de biofilmes na performance e dimensionamento de reatores com biomassa imobilizada. Estes conceitos são correntemente ensinados em contexto universitário. Por exemplo,

na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto a unidade curricular Tecnologia Ambiental possibilita a aprendizagem do dimensionamento de reatores de biofilme incorporando os efeitos simultâneos da transferência de massa e reação biológica.

No entanto, e surpreendentemente, a introdução aos conceitos fundamentais e aplicados sobre biofilmes não é convencionalmente lecionada a estudantes pré ou pós graduados, nem considerada em práticas hospitalares ou industriais. São exemplo disso: i) O não enquadramento dos biofilmes na seleção da terapia antimicrobiana – os antibiogramas usam células em estado fisiológico substancialmente diferente do encontrado em biofilmes – apesar das infeções microbianas, particularmente as mais críticas, se deverem essencialmente à presença de biofilmes. ii) A seleção de desinfetantes para uso industrial ou hospitalar é feita com base em testes com células em estado planctónico.

O ensino dos biofilmes é uma ótima maneira de introduzir uma diversidade de conceitos biológicos (microbiologia, ecologia microbiana, comunicação molecular através de biomoléculas, genética, antibioterapia, virulência, etc) e de engenharia (transferência de calor e massa, reação biológica, simulação, fenómenos interfaciais, etc). Atividades experimentais com biofilmes são relativamente simples e estimulam a compreensão de fenómenos e processos (McOwat & Stanley-Wall, 2018).

### 3 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por: Financiamento Base - UIDB/00511/2020 da Unidade de Investigação - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE; financiamento CIMO (UIDB/00690/2020); financiamento CITAB UIDB/04033/2020 e UIDP/04033/2020; financiamento CEB UIDB/04469/2020 - por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC) e PT2020.

- Projeto PTDC/BII-BTI/30219/2017 - POCI-01-0145-FEDER-030219 e POCI-01-0247-FEDER-072237, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC).

### REFERÊNCIAS

Afonso, A. Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões M. **“Biofilms in diabetic foot ulcers: impact, risk factors and control strategies.”** *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2021): 8278.

Atkinson, B. **“Biochemical reactors.”** London: Pion Press, 1964.

Atkinson, B., Swilley, E. L., Busch, A. W., & Williams, D. A. "**Kinetics, mass transfer and organism growth in a Biological Film Reactor.**" *Transactions in Instrumental Chemical Engineering* 46 (1967): T257-T264.

Borges, A., Abreu, A. C., Saavedra, M. J., Borges, F., & Simões, M. "**New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms.**" *Molecules* 21 (2016): 877.

Chang, Y.L., Wang, E.T., Sui, X.H., Zhang, X.X. & Chen, W.X. "**Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China.**" *Systematic and Applied Microbiology* 34 (2011): 276–284.

Characklis, W. G. "**Attached microbial growths: I. Attachment and growth.**" *Water Research* 7 (1973a): 1113-1127.

Characklis, W. G. "**Attached microbial growths: II. Frictional losses due to microbial slimes.**" *Water Research* 8 (1973b): 1249-1258.

Chollet-Imbert, M., Gancel, F., Slomianny, C. & Jacques, P. "**Differentiated pellicle organization and lipopeptide production in standing culture of *Bacillus subtilis* strains.**" *Archives of Microbiology* 191 (2009): 63–71.

Costerton, J. W., Cheng, K.-J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Daugupta, M., & Marrie, T. J. "**Bacterial biofilms in nature and disease.**" *Annual Reviews in Microbiology* 41 (1987): 435-464.

Deines, P., Sekar, R., Husband, P. S., Boxall, J. B., Osborn, A. M., & Biggs, C. A. "**A new coupon design for simultaneous analysis of *in situ* microbial biofilm formation and community structure in drinking water distribution systems.**" *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2010): 749-756.

Edel, M., Horn, H., & Gescher, J. "**Biofilm systems as tools in biotechnological production.**" *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (2019): 5095-5103.

Flemming, H.-C., & Wingender, J. "**The biofilm matrix.**" *Nature Reviews in Microbiology* 8 (2010): 623-633.

Schaule, G., McDonog, R., & Ridgway, H.F. "**Effects and extent of biofilm accumulation in membrane systems.**" *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems* 1994: 63-90.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. "**Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.**" *Nature Reviews in Microbiology* 2 (2004): 95-108.

Jenkinson, H. F., & Lappin-Scott, H.M. "**Biofilms adhere to stay.**" *Trends in Microbiology* 9 (2001): 9-10.

Howell, J. A., Chi, C. T., & Pawlowsky, U. "**Effect of wall growth on scale-up problems and dynamic operating characteristics of the biological reactor.**" *Biotechnology and Bioengineering* 14 (1972): 253-265.

Klitgord, N. & Segrè, D. "**Environments that induce synthetic microbial ecosystems.**" *PLoS Computer Biology* 6 (2010): e1001002.

Marshall, K. C. "**Microbial adhesion and aggregation.**" London: Springer-Verlag, 1984.

McOwat, K., & Stanley-Wall, N. R. "**Biofilm building: a simple board game to reinforce knowledge of biofilm formation.**" *Journal of Microbiology & Biology Education* 19 (2018): 19.1.59.

Ridal, J.J., Watson, S.B. & Hickey, M.B. "**A comparison of biofilms from macrophytes and rocks for taste and odour producers in the St. Lawrence river.**" *Water Science Technology* 55 (2017): 15–21.

Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. "**A review of current and emergent biofilm control strategies.**" *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010): 573-583.

Simões, M. "**Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms.**" *Current Medicinal Chemistry* 18 (2011): 2129-2145.

Simões, M., & Malcata, F. X. "**Simple protocol to facilitate students' understanding of the effects of enzyme immobilization on kinetics of reaction and mass transfer.**" *Journal of Chemical Education* 97 (2020): 2308-2313.

Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., & Yu. M. Romanova. "**Structural and functional characteristics of bacterial biofilms.**" *Microbiology* 79 (2010): 413-423.

Stephani, J., Radulovic, K. & Niess, J.H. "**Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease.**" *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59 (2011) 161-177.

Topiwala, H. H., & Hamer, G. "**Effect of wall growth in steady state continuous culture.**" *Biotechnology and Bioengineering* 8 (1971): 919-922.

Zobell, C. E. "**The effect of solid surfaces upon bacterial activity.**" *Journal of Bacteriology* 46 (1943): 39-56.



## BIOÉTICA EN LA FORMACIÓN EN MEDICINA<sup>1</sup>

Data de submissão: 05/10/2021

Data de aceite: 22/10/2021

**Julia Susana Elbaba**

Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad FASTA

Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina  
<https://orcid.org/0000-0003-3529-1277>

**RESUMEN:** El perfil del médico propuesto en la Universidad Fasta de Mar del Plata, busca integrar la formación científico-técnica con la humanística cristiana; desarrollar la vocación de servicio y sentido social que promueva, en la comunidad estilos de vida saludables. En este sentido la bioética personalista y sus principios son un eje integrador, ya que se basa en la búsqueda del bien integral de la persona humana. El objetivo de esta investigación es: indagar la percepción de los estudiantes de cuarto año de la Facultad de Ciencias Médicas, tanto al inicio como al final de la asignatura Bioética, en el 2018, respecto del aporte de la Bioética en su formación médica, analizando la cosmovisión que la sustenta y evaluando las competencias que se han fortalecido con ella.  
**PALABRAS CLAVES:** Bioética. Medicina. Percepción. Competencias.

### BIOETHICS IN MEDICINE TRAINING

**ABSTRACT:** The doctor profile proposed by FASTA University in Mar del Plata aims at integrating scientific and technical training with humanities and Christianity; developing a commitment to service and a social sense that promotes a healthy lifestyle within the community. In this sense, personalist bioethics and its principles are a central point based on looking for the general wellbeing of the person. The goal of this research is to: explore the perception of fourth year students both at the beginning and at the end of their Bioethics course in 2018 in the School of Medical Sciences on the contribution of Bioethics to medical training, analyzing the supporting cosmovision and evaluating the competences that it strengthens.

**KEYWORDS:** Bioethics. Medicine. Perception. kills.

### 1 INTRODUCCIÓN

La obra del destacado bioeticista Sgreccia (1996), en la que resalta la importancia de la Ética en torno a las ciencias de la vida y la salud, contienen una riqueza que ha servido de base a múltiples estudios posteriores. La actividad médica es una actividad profundamente ética ya que es poner la ciencia al servicio del bien integral de

<sup>1</sup> Trabajo presentado anteriormente en el X Congreso Iberoamericano de Educación Científica "Enseñanza y Aprendizaje de las Ciencias en Debate" CIEDUC 2019.



la vida, la dignidad y los derechos de cada persona. Es necesario para ello que los futuros médicos desarrollen una formación que les permita una actuación responsable frente a la persona y la sociedad en su conjunto.

El valor ético de la Medicina se refiere al respeto incondicional debido a cada ser humano, desde la concepción hasta la muerte natural, en cada momento de la existencia y en cada circunstancia, acompañando y cuidando a la persona para que concrete su bien integral, como lo menciona la Nueva carta de los Agentes Sanitarios, del Pontificio Consejo para los Agentes Sanitarios (2017).

Juan Pablo II (1995) veía la Bioética como una contribución para favorecer el diálogo acerca de los temas fundamentales que afectan la vida del hombre y forma parte de la formación integral de los profesionales de la salud. Contribuye a humanizar la Medicina centrándola en el respeto por la integridad y la búsqueda del bien total de la persona, promoviendo el respeto por los derechos humanos, la libertad responsable y la toma de conciencia respecto a la gestión de la salud y la promoción de hábitos saludables.

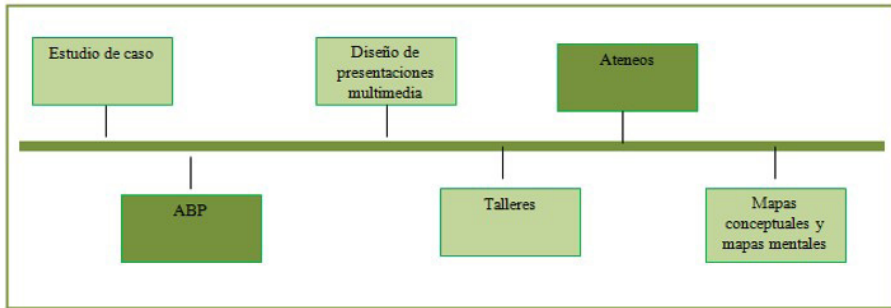
La cátedra de Bioética en la carrera de Medicina de nuestra casa de estudios busca fortalecer el perfil del médico, según el programa académico de Bioética (2018):

“un profesional médico con una sólida formación en las ciencias médicas que le permita actuar como médico general, con énfasis en la atención primaria de la salud, integrando la formación científico-técnica con la humanística cristiana, con vocación de servicio y sentido social que promueva estilos de vida saludables; que tiene un desempeño ético de la profesión; que reconoce y respeta integralmente a la persona desde la concepción hasta la muerte natural; responsable, comprometido en el servicio a la comunidad, y competente para: diagnosticar y solucionar los problemas de salud y derivar adecuada y oportunamente. Es un profesional que resuelve situaciones problemáticas utilizando las estrategias en el manejo de la información y la metodología científica con una actitud creadora e innovadora, participa en investigaciones científicas, respetando al paciente, colabora en equipos interdisciplinarios y asume actitudes de autoevaluación y autoformación permanente en orden a actualizar su desempeño profesional”.

La presente investigación se integra a la Tesis Doctoral que desarrolla la autora de la misma. El objetivo propuesto es indagar la percepción de los estudiantes de cuarto año de la Facultad de Ciencias Médicas, tanto al inicio como al final de la asignatura Bioética, en el 2018, del aporte de la Bioética en su formación médica, analizando la cosmovisión que la sustenta y evaluando las competencias que se han fortalecido con ella.

Bioética forma parte de la línea transversal de formación humanística cristiana y está programada con una asignación de 4 horas semanales teniendo como correlativa anterior Ética Fundamental y Social y como correlativa posterior Antropología Médica. A continuación se presenta un diagrama con algunas estrategias implementadas por la cátedra:

Diagrama 1 Estrategias seleccionadas por la cátedra de Bioética.



Fuente: Elaboración propia.

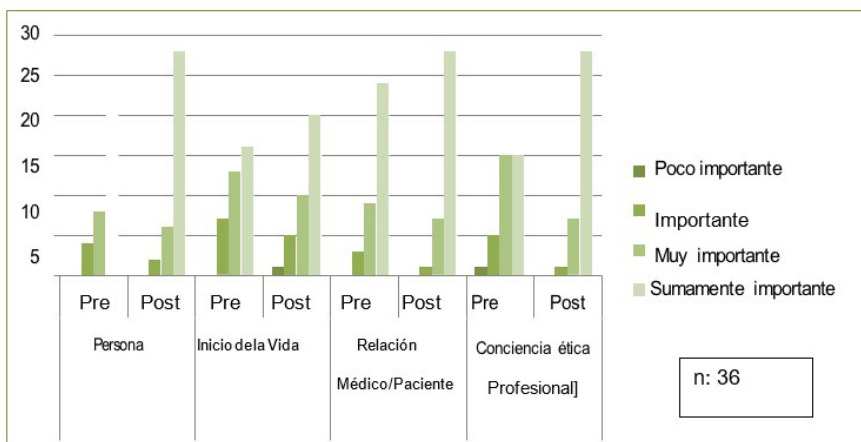
Además se propone la participación en una Jornada sobre donación de órganos con talleres de concientización en esta problemática, con aspirantes a ingresar en la carrera y estudiantes de escuelas secundarias. Se intenta con ello que, los futuros médicos asuman un liderazgo frente a sus pares en temas de relevancia social como es el trasplante de órganos y tejidos.

También se participa de la XVII edición de la Jornada de Ética, cuyo título para el 2018 fue: “¿Vida real vs. vida virtual?”, dirigida a todos los estudiantes de 4to año, en la cual se analiza esta temática desde los aspectos particulares disciplinarios de cada carrera.

## 2 DESARROLLO

La investigación se desarrolla en forma descriptiva, el diseño es no experimental. La muestra es de 36 estudiantes seleccionados en forma no probabilística por conveniencia, pertenecientes a cuarto año de la carrera de Medicina. Los datos se obtienen por encuesta *on line*, realizada al iniciar el dictado de la cátedra y al finalizar la misma en el año 2018.

Figura 1: Grado de importancia que los alumnos le asignan a su formación en las temáticas seleccionada.



Fuente: Elaborado sobre datos de la investigación.

Ante la pregunta que indagaba cuáles eran las competencias que los estudiantes reconocían que les había aportado, la currícula humanística, se transcriben textualmente algunas de sus respuestas:

- *Me instruyó más acerca de temas como la donación de órganos, aborto, servicio hacia personas en vulnerabilidad (de salud) y ética médica.*
- *Capacidad para tener empatía con los pacientes.*
- *Aportó a mi formación conocimientos de importancia, tales como el significado y la importancia de la relación médico paciente, el respeto por la vida humana, desde el inicio hasta el final de la vida, cómo debe ser la práctica médica, que debe ser humanizada, y no ver al paciente de una forma unidimensional, es decir, no contemplarlo desde una visión biológica únicamente, sino también desde sus dimensiones espiritual, psicológica y social.*
- *Relación médico-paciente, confidencialidad, empatía, humildad, acompañar al paciente. Valorar la vida humana. Respeto y dignidad de la persona humana. Dimensiones de la persona.*
- *Éticos, culturales, comunicativos que nos van a permitir en un futuro abordar a la persona de manera integral. Me han enseñado la importancia del servicio al prójimo, al que más lo necesita, a tener en cuenta a la persona en todas sus dimensiones, no solo como alguien que presenta una patología, o que algo físico lo aqueja. Aprendí que uno es médico por y para el paciente y que es de suma importancia establecer una buena relación con el mismo, para poder obtener confianza por parte de esa persona y de esa manera involucrarse con el todo que lo rodea y poder ofrecerle ayuda y en el caso de ser posible una solución a sus problemas.*
- *Considero que la currícula humanística aporta fundamentos para entender la importancia de la dimensión espiritual de la persona, que también es fundamental en la atención de la salud y la base de la relación médico-paciente.*

Con la totalidad de las mismas se realiza una nube de palabras que permite visibilizar con mayor tamaño aquellos conceptos más referidos por los estudiantes.

Figura 2: Percepción de los estudiantes sobre las competencias que la currícula humanística les aporta.

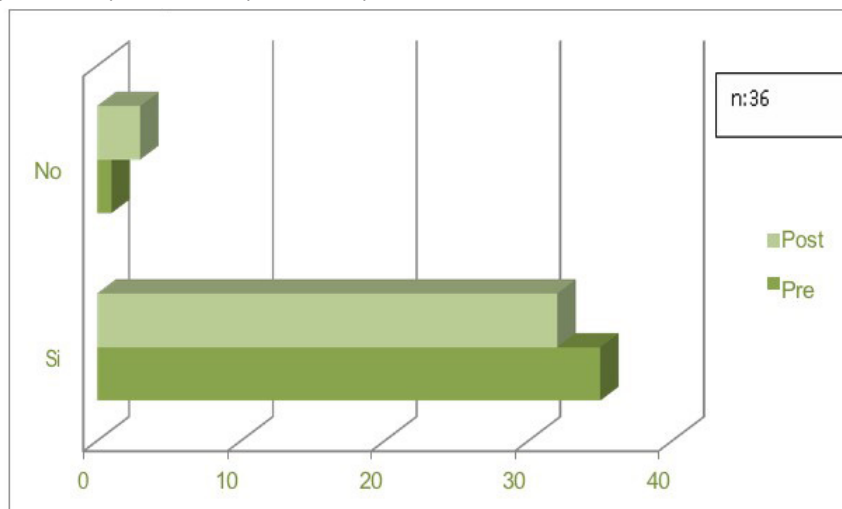


Fuente: Elaborado sobre datos de la investigación.

Se les consulta si la Ética se relaciona con las ciencias de la salud. El 100% de la muestra considera que sí. A continuación se indaga cuál es la relación que reconocen entre ambas. Se transcriben textualmente algunas de sus respuestas:

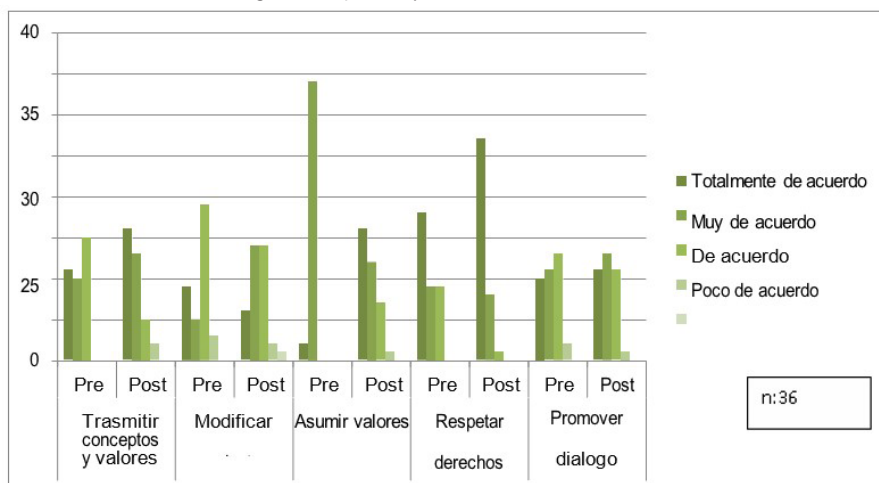
- *La relación existente entre bioética y las ciencias de la salud se da a nivel de la relación médico-paciente, en donde éste primero aplica la ética para el logro de un trato totalmente humano apuntando siempre al bienestar de la persona.*
- *Considero que la relación que existe es que en las ciencias de la salud al trabajar directamente con personas y el sufrimiento de las mismas en muchos casos, es interesante tener una perspectiva para abordar ese sufrimiento que están pasando, y aconsejarlos acerca de las decisiones que puedan o deban tener (no solo en el momento del sufrimiento, sino así en cualquier acto médico).*
- *La bioética nos ayuda a actuar como futuros profesionales de manera correcta para con nuestros pacientes y con nuestros pares.*
- *Llevar los conceptos aprendidos en bioética a la práctica diaria del quehacer médico.*
- *La bioética trata las situaciones de controversia en el ámbito de la medicina, desde la visión de la persona en su integridad.*
- *Es fundamental formar a los profesionales de la salud con una clara formación humanística del valor de las personas y como obrar con conciencia y ética profesional.*
- *Las decisiones que toman los comités de bioética sobre tratamiento es necesaria para guiar el camino corrector de la actividad profesional.*
- *Las ciencias de la salud que tienen a la persona como centro de su tarea requieren de la Bioética para desarrollarse correcta y plenamente siguiendo los valores y principios morales.*

Figura 3: Percepción sobre el aporte de competencias de la currícula humanística a la formación médica.



Fuente: Elaborado sobre datos de la investigación.

Figura 4: Objetivos que relaciona con la Bioética.



Fuente: Elaborado sobre datos de la investigación.

### 3 CONCLUSIONES

La intencionalidad de Bioética es que los estudiantes rescaten valores del respeto por la vida humana desde la concepción hasta la muerte natural a fin de “humanizar” la Medicina, centrarla en el paciente, promover una relación médico paciente deliberativa y el desarrollo ético del ejercicio profesional. La formación integral de los médicos requiere interpretar la cambiante realidad a la luz de valores y principios morales tal como lo hace la bioética personalista, coincidiendo también con Perez Sanches; Martin Linares

(2003). Ésta aporta tanto una fuerte visión antropológica como competencias para la atención integral del paciente y el desarrollo ético del quehacer profesional. Desde esta cosmovisión personalista no se trata solo de ser buenos profesionales sino buenas personas, al servicio de quien lo necesita.

Esto explica la inclusión de la asignatura Bioética en la carrera de Medicina propiciando espacios dentro del currículo que fortalezcan en el estudiante de Medicina el trato respetuoso de los pacientes, la responsabilidad frente al trabajo y el liderazgo que debe ejercer en la sociedad promoviendo conductas responsables y saludables. La acción médica no se restringe solo a la relación médico paciente sino que también se extiende a la familia y al entorno del paciente, así como a todo el equipo de salud. En este sentido ejercer la Medicina implica una actitud ética que ponga a la persona en el centro de cada acto médico, que respete los derechos fundamentales de las personas, el primero el derecho a la vida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Juan Pablo II. Carta Encíclica *Evangelium Vitae*. Santa Sede., 25 de marzo, AAS 87 (1995).

Pontificio Consejo para los agentes sanitarios. Nueva Carta de los Agentes Sanitarios, Santander: Sal Terrae, 2017, 173 pp., 15 x 21, ISBN 978-84-293-2683-3.

Puleo Puleo, Domenica, García Rojas, Edgar, & Serrano Rivera, Marco Antonio. (2016). Satisfacción de estudiantes de Medicina con un Hospital Simulado en Universidad del Valle de México. *Horizonte sanitario*, 15(3), 135-141. Recuperado en 10 de noviembre de 2018, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-74592016000300135&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-74592016000300135&lng=es&tlng=es)

Sgreccia, E. (1996). *Manual de bioética Elio Sgreccia*. Edições Loyola.

## SOBRE O ORGANIZADOR

**Manuel Simões** é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; N° orcid: 0000-0002-3355-4398

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Acetonic root extract 41  
Aguas de maquinado de aceitunas 96, 99  
Aplicaciones biomédicas 16, 17, 21  
Áreas preservadas 74

### B

Biochar 110, 111, 113, 114, 115, 116, 120, 121, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153  
Biodiversidade aquática 74  
Bioética 199, 200, 201, 204, 205  
Biofilme 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196  
Biopelículas 41, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161  
Biorremediación 96, 98, 102, 105, 106, 107, 108

### C

Captura de carbono 112, 116, 132, 133, 134, 136, 145, 146, 147, 148, 151, 153  
Carbono orgánico 110, 111, 115, 116, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 135, 136, 137, 142, 143, 144, 145, 150  
Caries 28, 29, 30, 36, 37, 38, 39  
Ciência e tecnologia multidisciplinar 190  
Cobre 19, 50, 51, 52, 122, 153  
Competencias 199, 200, 202, 203, 204, 205

### D

Destinação 85, 87, 89, 90  
Diabetes mellitus 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13, 14, 15  
Dormancy 177, 178, 179, 180, 183, 185, 186, 187, 188, 189

### E

Efectos subletales 163, 172  
Efluentes 96, 97, 98, 100, 102, 106, 107, 193  
Ejercicio físico 62, 63, 66, 68, 70  
Endometriosis 50, 51, 53, 58, 59, 60  
Enfermedad cardiovascular 62, 63



Enmienda orgánica 110, 111, 125, 126, 129  
Enmiendas orgánicas 110, 111, 132, 133  
Enterobacter cloacae 155, 156, 157, 159, 160, 161  
Esmalte 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37  
Espécies endêmicas 74, 75, 76, 78, 82  
Estradiol 51, 52, 54, 55, 57, 59  
Extrapolisacáridos 154, 155, 156

## F

Factores de caries 29  
Falta de gestão 85

## G

Glicemia 1, 2, 5, 9, 12

## H

Hidrochar 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150  
Hormona 1, 10, 11, 12, 51

## I

Incorporación de efluentes 96  
Insectos 163, 164, 165, 166, 167, 168, 171, 172, 173, 175  
Insulina 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13

## J

Jatropha 48, 177, 178, 180, 184, 185, 186, 187, 188, 189

## M

Medicina 1, 4, 11, 13, 18, 28, 61, 62, 66, 67, 72, 175, 199, 200, 201, 204, 205  
Medio ambiente 62, 63, 64, 66, 69, 97  
Microbial biofilms 41, 42, 49  
Microbiologia aplicada 190  
Microondas 132, 133, 134, 135, 141, 144, 150  
Microorganismos nativos 96, 99, 102, 103, 104, 106, 107

## N

Nanotubos de carbono 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26

## P

Per capita 85, 86, 89, 91

Percepção 199, 200, 203, 204

Permeabilidade dentinal 29, 37

Phytohormones 178, 187

Pirolisis 110, 111, 113, 119, 120, 124, 125, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 141, 144, 150, 151, 153

Potencial zeta 17, 19, 21, 22, 24

Productividade 110, 111, 112, 117, 128, 129

## R

Reología 17

Resíduo sólido 85, 88, 89, 91

Resíduos olivícolas 155, 156, 160, 161, 162

Resíduos orgánicos 89, 110, 111, 113, 117, 118, 125, 132, 133, 134, 148, 149, 150

Resistência antimicrobiana 190

## S

Savana 74, 75, 77

Savana brasileira 74

Seeds 178, 179, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189

Sesquiterpenoides 163, 166, 167

Suero fetal bovino 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25

## T

Tetratiomolibdato de amonio 50, 51, 52

Tipos de esmalte 29

Toxicidad 41, 163, 164, 168, 169, 174

Tratamiento hidrotermal 132, 133

## V

Vernonieae 163, 166, 167, 168, 172, 173, 176

## Z

Zinnia peruviana 40, 41, 43, 44, 46, 48, 49