

CONTENIDO

- Editorial

FITORREMIACIÓN

- *Eichhornia crassipes*, su invasividad y potencial fitorremediador
María Fernanda Guevara Granja y Lenin Javier Ramírez Cando

PRODUCTOS NATURALES

- Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador
Patricio Yáñez, Diana Balseca, Lorena Rivadeneira y Christian Larenas

PATOLOGÍAS BOVINAS

- Prevalencia de leucosis bovina en la comunidad Santo Domingo No. 1, Cayambe-Ecuador 2012
Nancy Bonifaz y Fernando Ulcuango

BIOTECNOLOGÍA

- standarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de *colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango (*Mangifera indica* L.)
Luis Alberto Valdés, Adys Gómez, María Elena Carballo, Maricela Capote, Ingrid González y Rohde W.

PRODUCTOS NATURALES

- Desarrollo de la pitahaya (*Cereus* sp.) en Ecuador
Laura Huachi, Elizabeth Yugsi, María Fernanda Paredes, Daniel Coronel, Karla Verdugo y Pablo Caba Santamaría

MEDICINA VETERINARIA

- Actualizaciones en vacunología canina: ¿cómo adaptar el protocolo vacunal a cada animal?
Juliette Cadier

OTRAS PUBLICACIONES DE LA UNIVERSIDAD

UNIVERSITAS, Revista de Ciencias Sociales y Humanas

ALTERIDAD, Revista de Educación

RETOS, Revista de Ciencia de la Administración y Economía

INGENIUS, Revista de Ciencia y Tecnología

SOPHIA, Colección de Filosofía de la Educación

UTOPIÍA, Revista de Pastoral Juvenil Universitaria



LA GRANJA

Número 2 • 2015

ISSN impreso: 1390-3799

ISSN electrónico: 1390-8596

Volumen

22

REVISTA DE CIENCIAS DE LA VIDA

FITORREMIACIÓN

- *Eichhornia crassipes*, su invasividad y potencial fitorremediador

PRODUCTOS NATURALES

- Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador

PATOLOGÍAS BOVINAS

- Prevalencia de leucosis bovina en la comunidad Santo Domingo No. 1, Cayambe-Ecuador 2012

BIOTECNOLOGÍA

- Estandarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de *colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango (*Mangifera indica* L.)

PRODUCTOS NATURALES

- Desarrollo de la pitahaya (*Cereus* sp.) en Ecuador

MEDICINA VETERINARIA

- Actualizaciones en vacunología canina: ¿cómo adaptar el protocolo vacunal a cada animal?



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA SALESIANA
ECUADOR

Indexada en Latindex

LA GRANJA: REVISTA DE CIENCIAS DE LA VIDA

Volumen 22, Número 2, julio - diciembre 2015

ISSN impreso: 1390-3799 • ISSN electrónico: 1390-8596

Indexada en:



Sistema Regional de Información en línea para Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.

La administración de LA GRANJA se realiza a través de los siguientes parámetros:

- La revista utiliza el sistema anti-plagio académico



- Los artículos cuentan con código de identificación (*Digital Object Identifier*)



- El proceso editorial se gestiona a través del *Open Journal System*



Es una publicación de acceso abierto (*Open Access*) con licencia *Creative Commons*



Las políticas *copyright* y de uso *post print*, se encuentran publicadas en el Repositorio de Políticas de Autoarchivo *SHERPA/ROMEO*.

Los artículos de la presente edición pueden consultarse en: <http://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja>



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA DEL ECUADOR

Rector

Javier Herrán Gómez, sdb
Turuhuayco 3-69 y Calle Vieja
Casilla Postal 2074
Cuenca, Ecuador
Teléfono: (+593 7) 2050000
Fax: (+593 7) 4088958
rpublicas@ups.edu.ec

Tiraje: 730 ejemplares

Consejo de publicaciones

Javier Herrán Gómez, sdb
PRESIDENTE

Juan Bottasso Boetti, sdb
Teodoro Rubio Martín
José Juncosa Blasco
Jaime Padilla Verdugo
Floralba Aguilar Gordón
Sheila Serrano Vincenti
Fabricio Freire Morán
John Calle Sigüencia
Armando Grijalva Brito
Mónica Ruiz Vásquez

Luis Álvarez Rodas
EDITOR GENERAL

Diseño, diagramación y maquetación en L^AT_EX

Andrés Merino / Editorial Universitaria Abya-Yala

Foto portada

Lucía Fernanda Maldonado Toro
Estudiante de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales
Universidad Politécnica Salesiana
Fotografía ganadora del Concurso "Ciencias de la Vida".

Leyenda: "Un rostro, una orquídea, una imagen.
La realidad es una ilusión, sensible y oculta;
percibida e imaginada; subjetiva, alterna y cambiante;
pero... ¿cuál es su verdadera naturaleza?"

Impresión

Editorial Universitaria Abya-Yala
Av. 12 de Octubre N23-116 y Wilson
Quito, Ecuador
Teléfono: (02) 2506-247 / (02) 2506-25
E-mail: editor@abyayala.org
Portal electrónico:
<http://www.abyayala.org>

El sistema tipográfico utilizado para componer esta revista fue L^AT_EX, el cual es un sistema de composición orientado especialmente a la creación de libros y documentos científicos de alta calidad sobre software libre.

ÍNDICE

Editorial	4
FITORREMEDIACIÓN	
<i>Eichhornia crassipes</i> , su invasividad y potencial fitorremediador.....	5
María Fernanda Guevara Granja y Lenin Javier Ramírez Cando	
PRODUCTOS NATURALES	
Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género <i>Capsicum</i> cultivadas en Ecuador	12
Patricio Yáñez, Diana Balseca, Lorena Rivadeneira y Christian Larenas	
PATOLOGÍAS BOVINAS	
Prevalencia de Leucosis Bovina en la comunidad Santo Domingo N. 1, Cayambe-Ecuador 2012	33
Nancy Bonifaz y Fernando Ulcuango	
BIOTECNOLOGÍA	
Estandarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislados en plantas de mango (<i>Mangifera Indica L.</i>)	40
Luis Alberto Valdés, Adys Gómez, María Elena Carballo, Maricela Capote, Ingrid González y Rohde W.	
PRODUCTOS NATURALES	
Desarrollo de la pitahaya (<i>Cereus sp.</i>) en Ecuador	50
Laura Huachi, Elizabeth Yugsi, María Fernanda Paredes, Daniel Coronel, Karla Verdugo y Pablo Coba Santamaría	
MEDICINA VETERINARIA	
Actualizaciones en vacunología canina: ¿cómo adaptar el protocolo vacunal a cada animal?	59
Juliette Cadier	
Normas para la presentación de los manuscritos	66

Estimadas y estimados lectores:

La producción editorial científica se encuentra en una imparable carrera, de la cual el Ecuador es partícipe oficial desde hace escasos siete años. El quehacer científico e investigativo de las universidades hoy, más que nunca, está claro y con reglas de juego muy definidas: rankings, factores de impactos, métricas, por mencionar algunas; son palabras con las que lidiamos los científicos todos los días. Quienes hacemos este *journal*, somos conscientes de estos cambios, y hemos hecho esfuerzos para que los artículos de nuestros autores tengan la debida visibilidad.

En este contexto, a partir del año 2014 la Edición General de la UPS con el respaldo del Consejo de Publicaciones de nuestra Universidad, se han empeñado en cumplir con los requisitos indispensables que permitirán a LA GRANJA ingresar en corto y mediano plazo a otros índices internacionales. Entre estos requisitos están el haber logrado hospedar a nuestra Revista en Pórtico, que es un repositorio de salvaguarda de los artículos publicados; la asignación del DOI (*Digital Object Identifier*), que es la numeración única que identifica a cada artículo en la web, lo que facilita su ubicación en los índices y repositorios; la implementación del sistema anti-plagio académico *Urkund*; la Licencia *Creative Commons*, que es la forma de presentarse de la Revista con características de Acceso Abierto (*Open Access*); *Sherpa Romeo* que consiste en la declaración de Políticas de *Copyright (post-print)*, que aseguran tanto los derechos de autor, como el acceso libre a cada artículo. Todos estos sistemas han sido implementados conjuntamente con el *Open Journal System (OJS)*, sistema informático de administración de la Revista.

LA GRANJA, Revista de Ciencias de la Vida, en esta edición presenta contribuciones que giran alrededor de las temáticas de la fito-tecnología y la veterinaria. Los artículos publicados dejan abiertos nuevos conceptos en el campo

de las ciencias de la vida, el desarrollo tecnológico y científico en busca del buen vivir.

Así, la presente edición empieza con un *review* elaborado por Ma. Fernanda Guevara y Lennin Ramírez que nos muestra al Jacinto de agua tanto como amenaza, como un potencial remediador en aguas. A continuación dos productos nacionales de gran interés y potencial nutricional y farmacológico: el primero el ají, analizado su contenido de capsaicina en una investigación de Patricio Yáñez, Christian Larenas y colaboradores, mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta presión. El segundo producto, la pitahaya, una fruta tropical de características únicas, abordadas en el estudio elaborado por Laura Huachi y colaboradores. Mientras que, Luis Valdez y sus colaboradores presentan una estandarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango.

Finalmente en el área veterinaria tenemos el trabajo realizado por la Dra. Juliette Cadier quien presenta un estudio sobre la vacunología canina en cachorros en la cual describe las implicaciones del conocimiento actual sobre el período crítico inmunológico. Mientras que Nancy Bonifáz y Fernando Ulcuango realizan un estudio de la Leucosis bovina, en reces de Cayambe.

De esta manera, ponemos a su disposición y análisis este grupo de artículos científicos esperando que éstos cubran sus expectativas y se generen nuevas inquietudes referentes a los temas abordados.

Estamos seguros que los esfuerzos por mejorar los procesos editoriales conjuntamente con la calidad de los artículos harán a la Revista de ciencias de la vida, La Granja, un instrumento de visibilidad científica cada vez de mayor calidad e impacto.

Fís. Sheila Serrano Ms.C
Editora

Ms.C Pablo Arévalo Ph.D
Director del Área de Ciencias de la Vida

Eichhornia crassipes, SU INVASIVIDAD Y POTENCIAL FITORREMEDIADOR

Eichhornia crassipes, ITS INVASIVENESS AND PHYTOREMEDIATION POTENTIAL

María Fernanda Guevara Granja¹ y Lenin Javier Ramírez Cando^{2,3}

¹Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana, Av. Isabel la Católica N. 23-52 y Madrid, Quito, Ecuador.

²Grupo de Investigación en Ciencias Ambientales (GRICAM), Universidad Politécnica Salesiana, Rumichaca y Morán Valverde s/n, Quito, Ecuador.

³Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF), Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine 15, 50144 Firenze, Italy.

Autor para correspondencia: mguevarag@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 30 de julio de 2015. Aceptado, tras revisión, el 3 de diciembre de 2015.

Resumen

El jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) es una planta acuática perenne, que se emplea como especie ornamental para los estanques. Originaria de Brasil, tiene alta capacidad reproductiva y adaptativa, factores que le han permitido estar entre las 10 malezas más invasivas del mundo, extendiéndose a más de cincuenta países de los cinco continentes, causando efectos adversos sobre la flora y fauna nativa. Además forma densas colonias flotadoras, con el consecuente descenso del flujo de agua en los embalses, reducción de cantidad de luz y disminución de la cantidad de oxígeno disuelto. El principal método de control es aplicación de herbicidas, sin embargo, métodos diferentes tienen mayor aceptación pública (e.g. remoción manual, trituración y empleo de controladores biológicos entre ellos, gorgojos (*Neochetina* spp) y carpa forrajera (*Ctenopharyngodon idella*)). No obstante, sus características, mencionadas como negativas, (p.e. gran capacidad de adaptación, crecimiento en ambientes contaminados, etc) actualmente están siendo muy estudiadas como herramientas en fitorremediación *ex situ*, principalmente como herramienta para la limpieza efectiva de efluentes contaminados con metales pesados, plaguicidas y colorantes vertidos por varias industrias, abriendo la puerta para la investigación a profundidad de esta macrofitas.

Palabras clave: *Eichhornia crassipes*, jacinto de agua, invasividad, métodos de control, fitorremediación.

Abstract

The water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) is a perennial aquatic plant, it has been used as an ornamental species for ponds. Native from Brazil, it has high reproductive and adaptive capacities. These factors have allowed *E. crassipes* to be among the 10 most invasive plants in the world propagating in more fifty countries on five continents, causing adverse effects on the native flora and fauna. It forms dense floating colonies that decrease the water flow in reservoirs, reducing the amount of light and dissolved oxygen concentration. Several methods have been applied to control this weed and other introduced aquatic plants. The main one is, is the herbicides application. However, different methods have greater public acceptance (e.g. manual removal, grinding and use of biological controls including weevils (*Neochetina* spp) and herbivorous carp (*Ctenopharyngodon idella*)). Moreover, their characteristics, mentioned as negative (high adaptive capacity, growth in contaminated environments, etc.), are being deeply studied as tools in *ex situ* phytoremediation, principally as a tool for effective cleaning of effluents contaminated with heavy metals, pesticides and dyes discharged by various industries, opening new applications for this macrophyte.

Keywords: *Eichhornia crassipes*, water hyacinth, fitoremediation, control methods, invasivity.

Forma sugerida de citar: Guevara, M. F. y Ramírez, L. 2015. *Eichhornia crassipes*, su invasividad y potencial fitorremediador. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 5-11. ISSNp: 1390-3799, ISSNr: 1390-8596.

1. Introducción

El jacinto de agua o lechuguín (*Eichhornia crassipes*) es una planta acuática perenne, originaria de la cuenca del Amazonas y otros cuerpos de agua de la región amazónica (Barrett y Forno, 1982), así como de lagos y pantanos del Gran Pantanal del oeste de Brasil. Sus llamativas y grandes flores de color púrpura o violeta hacen que sea una popular planta ornamental para los estanques, que flota libremente en la superficie de aguas tropicales (Seema, 2012). Fue descubierta en 1823 por el naturalista C. Von Martius, estudioso de la flora de Brasil. En la actualidad, *Eichhornia crassipes* está distribuido en el trópico y subtropical entre los 39°N y 39°S (Arteaga Carrera *et al.*, 2010).

La importancia de estudiar *E. crassipes*, consiste en que esta maleza invasiva plantea múltiples peligros que van desde ecológicos hasta sociales incluyendo temas económicos, poniendo en peligro la biodiversidad de múltiples ecosistemas a nivel mundial (Seema, 2012; Mironga, 2006), convirtiéndose en una de las plantas acuáticas más extendidas (Barrett y Forno, 1982), ya que ha sido introducida como plata ornamental para jardines acuáticos en diferentes regiones del mundo.

En la actualidad su reproducción principalmente se da en forma vegetativa por medio de la producción de estolones, no obstante también se puede dar a través de semillas, con un bajo porcentaje de germinación. El crecimiento de *E. crassipes* se ve favorecido por aguas ricas en nutrientes, especialmente por nitrógeno, fósforo y potasio. Además se nutre de calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, aluminio, boro, cobre, molibdeno y cinc. Como se mencionó, su capacidad reproductiva es alta, la biomasa de *E. crassipes* es capaz de duplicarse en un mes a través de reproducción vegetativa, lo que provoca la formación de densas colonias flotadoras, con el consecuente descenso del flujo de agua en los embalses, y reducción en la cantidad de luz. Existe una relación negativa entre la abundancia de *E. crassipes* y las concentraciones de oxígeno disuelto (D.O.), es así que el contenido del oxígeno es menor debajo del manto de *E. crassipes* y puede descender a cero, causando efectos catastróficos sobre peces y otros animales (Labrada *et al.*, 1996). En los hábitats de aguas poco profundas, diferentes especies vasculares acuáticas invasoras son ingenieras del eco-

sistema con una amplia gama de efectos que incluyen reducciones en la abundancia y diversidad de las plantas nativas, así como también modificaciones de hábitats y disminución de disponibilidad de presas para los peces propios del ecosistema invadido (Greco y Freitas, 2002; Greenfield *et al.*, 2007).

Así, cuando una especie invasiva ha estado en un ecosistema lo suficiente como para convertirse en dominante, pueden alterar el funcionamiento del mismo. En efecto, esta degradación del funcionamiento de los ecosistemas es cada vez más común para los ecosistemas acuáticos, especialmente en aguas poco profundas, lagunas y lagos tropicales (Khanna *et al.*, 2012). *E. crassipes* también suprime el crecimiento del fitoplancton y otras plantas sumergidas en los ecosistemas acuáticos (Lung' Ayia *et al.*, 2000; Gopalakrishnan *et al.*, 2011). La eutrofización es uno de los mayores inconvenientes que causa *E. crassipes*, en Sudamérica cerca del 41 % de los lagos sufren este problema (Arteaga Carrera *et al.*, 2010). Es evidente la necesidad de control para reducir el impacto en los cuerpos de agua, causado por la invasión de especies agresivas.

Otro de los problemas (de tipo socio-ambiental) que acarrea esta especie acuática es que sirve como hospedero de larvas de mosquito (Epstein, 1998), lo que ocasiona además de problemas ecológicos, afectaciones económicas y sociales (Khanna, 2010; Greenfield *et al.*, 2007). *E. crassipes* forma densas alfombras impenetrables a través de los cursos de agua y de cuerpos de agua estancada, que ocasiona la obstrucción de los canales de riego que puede generar interferencia con proyectos de energía hidroeléctrica y con la producción de diversos cultivos (Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Milne *et al.*, 2006). Importantes recursos económicos, que ahondan los problemas económicos ya mencionados, son gastados en el control de estas plantas acuáticas, predominantemente a través de la aplicación de herbicidas directamente a las aguas superficiales (Greenfield *et al.*, 2007; Gopalakrishnan *et al.*, 2011) que no necesariamente permanecen estáticos. Por citar un ejemplo, el costo anual de la gestión de *E. crassipes* en el estado de la Florida en Estados Unidos asciende a \$ 5 millones (Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Lo mencionado muestra que la invasividad de esta macrofitas no solo acarrea problemas, ecológicos, ambientales y econó-

micos, sino que, estos se pueden extender a una dimensión social provocando reducción de: fuente de alimentos, trabajo, y por ende calidad de vida.

Las infestaciones de *E. crassipes* pueden incrementar su velocidad de propagación, ayudadas por las corrientes de agua, y por la falta de conciencia pública, ya que las invasiones son frecuentemente causadas por su comercialización en acuarios, por venta en viveros y por las actividades náuticas recreativas (Toft *et al.*, 2003; Greenfield *et al.*, 2007).

Así, *E. crassipes*, ocupa el puesto número ocho entre las diez malezas más invasivas del mundo (Artega Carrera *et al.*, 2010) y es considerada la maleza acuática que acarrea mayores problemas ambientales (Gopalakrishnan *et al.*, 2011).

2. Métodos de control

Los ecosistemas modificados por zonas urbanas o por el desarrollo rural pueden sufrir cambios permanentes en sus condiciones abióticas, afectando negativamente a las especies nativas (Khanna *et al.*, 2012). Por ejemplo, el incremento de nutrientes en aguas ha hecho que ecosistemas alterados sean susceptibles a invasiones, es así que, al eliminar la ventaja competitiva de los bajos nutrientes a los que las especies nativas se encontraban adaptadas, la elevada concentración de nutrientes es aprovechada por especies oportunistas, en particular, *E. crassipes* se beneficia de esta condición (Khanna, 2010). La modificación de ecosistemas, en casos tan sencillos como un jardín o tan complejos como una represa multifuncional, son ambientes propicios para la colonización de esta especie y su consecuente propagación.

Al igual que otras especies invasoras, *E. crassipes*, una vez bien instalada en el ecosistema degradado, promueven la estabilidad, en función de sus necesidades. La eutrofización permite que esta especie expanda su área de cobertura, mientras que su creciente sombra reduce la proliferación de otras plantas acuáticas, puesto que frecuentemente la disponibilidad de luz es uno de los factores limitantes para el crecimiento de plantas macrófitas (Fleming y Dibble, 2015). La descomposición de material vegetal por debajo de la colchoneta flotante crea condiciones de bajo D.O. que favorecen procesos anaerobios, al igual que la movilización de fósforo y otros nutrientes en los sedimentos, fomentando la carga de nutrientes lo que dificulta el restablecimiento de

las plantas acuáticas. Estas plantas pueden reducir la velocidad del agua en un 40 % lo que disminuye la resuspensión de sedimentos y la modificación en la concentración de micro-elementos en el agua. Esto, a su vez ralentiza el reciclaje de nutrientes, impulsando así la supervivencia y persistencia de esta especie (Khanna *et al.*, 2012; Toft *et al.*, 2003) y la muerte de especies sensibles a estos cambios.

Es indispensable establecer métodos eficaces de control, en ese sentido, el método primario de control para *E. crassipes* ha sido la aplicación de herbicidas. Durante décadas se han controlado sustancialmente las infestaciones de la especie invasora mediante su aplicación, sin dejar de lado los problemas que conlleva este tipo de tratamiento. Estos programas de control preventivo se basan en productos químicos para mantener las poblaciones de malezas en niveles aceptables y así evitar la migración de éstas. Sin embargo, cuando el control no se requiere urgentemente o no es viable económicamente debido a varios factores, entre ellos la ubicación de la maleza y los fuertes costos ambientales; lo recomendable es una combinación de agentes de control (Den Breeÿen y Charudattan, 2009; Greenfield *et al.*, 2007). Las alternativas de remoción de *E. crassipes* permiten seleccionar entre métodos físicos, mecánicos y químicos, o combinaciones entre ellos, mismos que presentan efectos prolongados, no obstante son costosos (Gopalakrishnan *et al.*, 2011) y algunos acarrear problemas para el ambiente y sus ecosistemas.

Es importante considerar que, en el Oeste de Estados Unidos los permisos y los requisitos de control exigidos para la aplicación de herbicidas acuáticos han provocado la búsqueda de controles alternativos, adicionalmente, la opinión pública suele ser favorable a procedimientos de control no químicos, de tal forma que la recolección de plantas mecánica es una alternativa utilizada frecuentemente; sin embargo, la cosecha es relativamente costosa y lleva mucho tiempo. En respuesta a esto, el estudio diseñado por Greenfield *et al.* (2007), propone la trituración de brotes de *Eichhornia crassipes*, y dejarlos en el agua para envejecer y morir, de tal forma que este método tiene menor costo que cosechar. Tanto la trituración mecánica como la aplicación del herbicida químico pueden provocar la transferencia de nutrientes a la columna de agua, el agotamiento del oxígeno, y los efectos asociados a la calidad del agua (Fleming y Dibble, 2015). De hecho, puesto que *E. crassipes* es una especie flotante que absorbe e inmo-

viliza nutrientes, su trituración perturba la calidad del agua. Las consecuencias específicas de esta acción varían en función del sitio de trituración y la estación. Las operaciones de trituración podrían causar entre 0,1 % y 9,6 % del aumento de la abundancia global de carbono, nitrógeno, y fósforo, como lo indican los estudios realizados por Greenfield *et al.* (2007).

Asimismo, dado que *E. crassipes* bioconcentra y secuestra mercurio en sus tejidos (Chigbo *et al.*, 1982), la trituración de esta macrófita causaría la liberación del metal junto con diversos nutrientes que estarían biodisponibles en la columna de agua de ríos y lagunas.

Por otro lado, se han empleado métodos de control biológico para tratar las invasiones de *E. crassipes*. El impacto de los gorgojos (*Neochetina* spp) sobre *E. crassipes* ha sido exitoso y sostenible en todo el mundo. Se han realizado ensayos a diferentes escalas. En África se efectúan tratamientos a grandes extensiones, con buenos resultados (Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Greenfield *et al.*, 2007). La carpa herbívora o carpa forrajera (*Ctenopharyngodon idella*) también se ha utilizado como un método de control biológico contra plantas acuáticas sumergidas, ya que pueden consumir hasta 18 % - 40 % de su propio peso en un día. Sin embargo, su uso contra plantas flotantes como *E. crassipes* ha recibido poca atención. (Vera Herrera *et al.*, 1980; Gopalakrishnan *et al.*, 2011). En ocasiones se ha usado picudo (*Neochetina* spp.) como método de control biológico, pero tampoco es una práctica extendida para su control (Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Mironga, 2006).

El estudio realizado por Gopalakrishnan *et al.* (2011), en India, recomienda el uso combinado de carpa herbívora y gorgojo, puesto que en sus ensayos se logró controlar la maleza. La biomasa de *E. crassipes* se redujo de 5 kg en el día 1 del tratamiento, a 0,33 kg en el día 110, por lo que recomiendan este tratamiento combinado siendo más eficiente y sostenible para la remoción de *E. crassipes* que el uso de estos organismos de forma individual.

3. Ventajas de su invasividad

Como se ha expuesto, la evidencia muestra que el *E. crassipes* es una especie que causa varios problemas a los ecosistemas, sobre todo a los que han sufrido modificaciones. Sin embargo, la utilización de esta

planta como fitorremediador actualmente está siendo estudiada por varios grupos a nivel mundial (Salamanca *et al.*, 2015). Trabajos experimentales muestran que *E. crassipes* puede ser utilizado en la remoción de organofosforados, en un caso particular el clorpirifos (insecticida) fue removido con gran facilidad (Anudechakul *et al.*, 2015), probando que esta especie invasora puede ser utilizada en beneficio de los ambientes contaminados.

En el caso de técnicas particulares, como la construcción de humedales artificiales, es evidente que *E. crassipes* puede ser de gran interés debido sus características (Salamanca *et al.*, 2015), en varios estudios se indica que esta macrófita se puede desarrollar en humedales y ríos con grandes concentraciones de metales pesados, entre ellos cadmio, cromo y zinc (Salamanca *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Vitória *et al.*, 2015). Cabe recalcar que únicamente se recomienda el uso de *E. crassipes* en ecosistemas artificiales, debido a su gran capacidad invasiva es un peligro contraproducente utilizarla en sistemas naturales. La evidencia muestra una gran versatilidad de *E. crassipes* en aplicaciones relacionadas con la biotecnología ambiental.

Sin embargo, el aumento de la actividad industrial y agrícola ha acelerado la contaminación del medio ambiente y la consecuente modificación de los ecosistemas. En un intento de mitigar este impacto se mira hacia la fitorremediación, como herramienta para la limpieza efectiva de los sitios contaminados con metales como cinc, cromo, cobre, cadmio, plomo, mercurio y níquel; además de colorantes sintéticos, hidrocarburos, plaguicidas y solventes clorados (Agami y Reddy, 1990; Paris *et al.*, 2000).

Citando las características principales que deben tener las macrófitas que pueden ser usadas para un proceso de fitorremediación se cuentan: tener una rápida tasa de crecimiento, alta productividad, de preferencia ser especies locales, ser de fácil manejo, entre otras (Poveda y Velasteguí, 2013). Mientras, que como se ha mencionado, las características relevantes de *E. crassipes* son: i) alta densidad de las plantas y su rápido desarrollo en una gran variedad de ambientes acuáticos (Hidalgo *et al.*, 2005; Salamanca *et al.*, 2015); ii) remoción de metales pesados (As, Cd, Hg, Pb) a través de la raíces y la subsecuente acumulación en las estructuras de la planta (Chigbo *et al.*, 1982; Vitória *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2005; Schnack *et al.*, 2000); iii) capacidad para sobrevivir en ambientes acuáticos saturados de fósforo,

nitrógeno, pesticidas y varios contaminantes de origen industrial, principalmente de la industria textil, colorantes y metalúrgica (Anudechakul *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2005)

La utilización de macrófitas, y por extensión *E. crassipes*, para la remoción de contaminantes de aguas tiene la ventaja de requerir menores recursos económicos y tecnológicos por lo cual podrían ser empleadas inclusive en países en vías de desarrollo, algunos estudios apuntan a una utilidad de *E. crassipes* como un agente biorremediante, bajo condiciones particulares (Maine *et al.*, 1999; Paris *et al.*, 2000). Es necesario realizar mayores estudios con el fin de llevar su utilización a gran escala en procesos de biorremediación, de una manera responsable y causando la menor alteración posible en los ecosistemas. .

4. Conclusiones y recomendaciones

La invasividad de *Eichhornia crassipes* pone en peligro diversos ecosistemas aprovechando aguas ricas en nutrientes, las densas colonias flotadoras causan que el contenido de oxígeno (D.O.) descienda hasta cero debajo de su manto afectando enormemente la cadena trófica. Sin embargo la aplicación de controladores biológicos resulta exitosa y tienen gran aceptación a nivel público como es el uso de gorgojos (*Neochetina* spp.) y carpa forrajera (*Ctenopharyngodon idella*).

Las diferentes características de *Eichhornia crassipes* posibilitan su uso en fitorremediación, puesto que, puede depurar y acumular metales pesados. Sin embargo, debido a los efectos adversos que ocasiona en ecosistemas naturales, se recomienda su uso únicamente en humedales artificiales, de manera que se pueda controlar su reproducción y evitar la invasión en los ecosistemas.

Lo expuesto muestra sin lugar a dudas que la planta presenta un fuerte potencial en recuperación de sistemas acuáticos contaminados por fuentes de tipo antropogénico. No obstante, aún se requiere profundizar la investigación de tipo preindustrial para delimitar los parámetros de trabajo, diseño del proceso y sobre todo los métodos de disposición final de la biomasa en los procesos de fitorremediación.

Referencias

- Agami, M. y K. Reddy. 1990. **Competition for space between *Eichhornia crassipes* (mart.) solms and *Pistia stratiotes* l. cultured in nutrient-enriched water.** Aquatic Botany, 38: 195–208.
- Anudechakul, C., A. Vangnai y N. Ariyakanon. 2015. **Removal of chlorpyrifos by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and the role of a plant-associated bacterium.** International Journal of Phytoremediation, 17(7): 678–685.
- Arteaga Carrera, J., W. Cuéllar, D. Ramírez, S. Ríos y S. Giraldo. 2010. **Manejo de plantas acuáticas invasoras en embalses de epm. caso: buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) en el embalse porce ii, antioquia-colombia.** Revista EMP, 3: 22–35.
- Barrett, S. y I. Forno. 1982. **Style morph distribution in new world populations of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms-laubach (water hyacinth).** Aquatic Botany, 13: 299–306.
- Chigbo, F., R. Smith y F. Shore. 1982. **Uptake of arsenic, cadmium, lead and mercury from polluted waters by the water hyacinth *Eichhornia crassipes*.** Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 27(1): 31–36, doi:http://doi.org/10.1016/0143-1471(82)90060-5.
- Den Breeÿen, A. y R. Charudattan. 2009. **Biological control of invasive weeds in forests and natural areas by using microbial agents.** En: **Management of Invasive Weeds**, capítulo 10, Inderjit, USA.
- Epstein, P. 1998. **Weeds bring disease to the east african waterways.** Lancet, 351(9102): 577.
- Fleming, J. y E. Dibble. 2015. **Ecological mechanisms of invasion success in aquatic macrophytes.** Hydrobiologia, 746: 23–37.
- Gopalakrishnan, A., M. Rajkumar, J. Sun, A. Parida y B. Venmathi. 2011. **Integrated biological control of water hyacinths, *Eichhornia crassipes* by a novel combination of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (valenciennes, 1844), and the weevil, *Neochetina* spp.** Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 29(1): 162–166.
- Greco, M. y J. Freitas. 2002. **On two methods to estimate production of *Eichhornia crassipes* in the**

- eutrophic pampulha reservoir (mg, brazil).** Brazilian Journal of Biology, 62(3): 463–471.
- Greenfield, B., S. Geoffrey, J. Andrews, M. Rajan, S. Andrews y S. D.F. 2007. **Mechanical shredding of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): Effects on water quality in the sacramento-san joaquin river delta, california.** Estuaries and Coasts, 30(4): 627–640.
- Hidalgo, J., J. Montano y M. Sandoval. 2005. **Re-cientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas.** Theoria, 14(1): 17–25, URL <http://www.ubiobio.cl/theoria/v/v14/a2.pdf>.
- Khanna, S. 2010. **Development and use of remote sensing tools to study the impact of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) invasion in an estuarine ecosystem.** Tesis Doctoral, University of California, Davis.
- Khanna, S., M. Santos, E. Hestir y S. Ustin. 2012. **Plant community dynamics relative to the changing distribution of a highly invasive species, *Eichhornia crassipes*: a remote sensing perspective.** Biological Invasions, 14(3): 717–733.
- Labrada, R., J. Caseley y C. Parker (editores). 1996. **Manejo de malezas para países en desarrollo.** Estudios FAO Producción y Protección Vegetal, FAO, Roma, pp. 137.
- Li, X., Y. Zhou, Y. Yang, S. Yang, X. Sun y Y. Yang. 2015. **Physiological and proteomics analyses reveal the mechanism of *Eichhornia crassipes* tolerance to high-concentration cadmium stress compared with *Pistia stratiotes*.** PLoS ONE, 10(4): e0124304, doi:10.1371/journal.pone.0124304.
- Lung'Ayia, H. B. O., A. M'Harzi, M. Tackx, J. Gichuki y J. J. Symoens. 2000. **Phytoplankton community structure and environment in the kenyan waters of lake victoria.** Freshwater Biology, 43(4): 529–543.
- Maine, M. A., N. Suñe y M. Duarte. 1999. **Eliminación de cadmio y cromo desde aguas utilizando macrófitos.** Información Tecnológica, 10(6): 11–18.
- Milne, J. M., K. J. Murphy y S. M. Thomaz. 2006. **Morphological variation in *Eichhornia azurea* (kunth) and *Eichhornia crassipes* (mart.) solms in relation to aquatic vegetation type and the environment in the floodplain of the rio paraná, brazil.** En: Caffrey, J., A. Dutarte, J. Haurry, K. Murphy y P. Wade (editores), **Macrophytes in Aquatic Ecosystems: From Biology to Management**, tomo 190 de **Developments in Hydrobiology**, pp. 19–25, Springer Netherlands, URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-5390-0_3.
- Mironga, J. M. 2006. **The effect of water hyacinth, *Eichhornia Crassipes*, infestation on phytoplankton productivity in lake naivasha and the status of control.** En: Odada, E. O., D. O. Olago, W. Ochola, M. Ntiba, S. Wandiga, N. Gichuki y H. Oyieke (editores), **Proceedings of the 11th World Lakes Conference**, tomo 2, pp. 573–579, Ministry of Water and Irrigation, International Lake Environment Committee, Nairobi, Kenya.
- Paris, C., H. Hadad y M. Maine. 2000. **Selección de macrófitas para la absorción de plomo.** En: **Actas IV Encuentro Nacional de Jóvenes Investigadores**, pp. 45–46, U. N. L., Santa Fe, Argentina.
- Poveda, R. y R. Velasteguí. 2013. **Evaluación de especies acuáticas flotantes para la fitorremediación de aguas residuales industrial y de uso agrícola previamente caracterizadas en el cantón ambato, provincia de tungurahua.** Carrera ingeniería bioquímica, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador, URL <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/8455>.
- Salamanca, E., A. Rengifo-Gallego, C. Madera-Parra, D. Ríos y C. Avila-Williams. 2015. **Phytoremediation using terrestrial plants.** En: Ansari, A., S. Gill, R. Gill, G. Lanza y L. Newman (editores), **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants**, tomo 2, capítulo 25, pp. 305–319, Springer International Publishing, Switzerland, 1 edición, doi:<http://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5>.
- Schnack, J. A., F. O. DeFrancesco, U. R. Colado, M. L. Novoa y E. J. Schnack. 2000. **Humedales antrópicos: Su contribución para la conservación de la biodiversidad en los dominios subtropical y pampásico de la argentina.** Ecología Austral, 10(1): 63–80.
- Seema, P. 2012. **Threats, management and envisaged utilizations of aquatic weed *Eichhornia***

- crassipes*: an overview. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 11: 249–259.
- Toft, J., C. Simenstad y J. Cordell. 2003. **The effects of introduced water hyacinth on habitat structure, invertebrate assemblages, and fish diets.** Estuaries, 26: 746–758.
- Vera Herrera, F. R., J. Medina Gandara, A. Flores Román y J. Rojas Galaviz. 1980. **Control biológico del lirio acuático *Eichhornia crassipes* mediante la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* (pisces: *Cyprinidae*) en estanques controlados.** Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 7(2): 259–274.
- Vitória, A. P., J. L. da Silva Santos, M. S. M. Barros Salomão, T. de Oliveira Vieira, M. Da Cunha, S. F. Pireda y G. Rodrigues Rabelo. 2015. **Influence of ecologic type, seasonality, and origin of macrophyte in metal accumulation, anatomy and ecophysiology of *Eichhornia crassipes* and *Eichhornia azurea*.** Aquatic Botany, 125: 9–16.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DE CONCENTRACIÓN DE CAPSAICINA EN CINCO ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO *Capsicum* CULTIVADAS EN ECUADOR

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND CONCENTRATION OF CAPSAICIN IN
FIVE NATIVE SPECIES OF *Capsicum* CULTIVATED IN ECUADOR

Patricio Yáñez^{1,2,3}, Diana Balseca¹, Lorena Rivadeneira¹ y Christian Larenas¹

¹Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad. CIVABI-Universidad Politécnica Salesiana, Av. 12 de Octubre y Wilson, Quito. Telf.: +593-2236869.

²Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Iberoamericana del Ecuador. Av. 9 de Octubre 1178 y Santa María, Quito.

³Escuelas de Biología Aplicada y de Gestión Turística. Universidad Internacional del Ecuador. Av. Simón Bolívar s/n y Jorge Fernández, Quito.

Autor para correspondencia: clarenas@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 8 de mayo de 2015. Aceptado, tras revisión, el 12 de noviembre de 2015.

Resumen

Los recursos genéticos del género *Capsicum* (ajíes), familia: (Solanaceae), son importantes por ser fuente natural de Capsaicina. Los reportes sobre esta característica en los ajíes nativos de Ecuador son escasos. En el presente estudio se analizaron variables morfológicas de plantas, frutos y semillas de cinco especies de este género: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. annuum* y *C. frutescens*, procedentes de las provincias de Loja, Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas, Los Ríos y Morona Santiago. Igualmente se identificó y cuantificó la Capsaicina presente en la oleorresina de los frutos de estas especies. La identificación de Capsaicina fue efectuada mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC) comparando las oleorresinas con el estándar de Capsaicina USP (98,9%), obteniendo un Rf de 0,184; la Capsaicina presentó una leve fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm. La cuantificación del metabolito fue realizada mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). *Capsicum chinense* presentó el rendimiento más alto con un promedio de 11340 mg/kg; se concluyó que esta especie posee un alto potencial para la extracción de Capsaicina, la misma que puede ser utilizada a nivel comercial en la industria farmacológica y/o alimenticia.

Palabras clave: Ecuador, *Capsicum*, características morfológicas vegetales, Capsaicina, Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

Abstract

Genetic resources in the genus *Capsicum* (chili), family (Solanaceae), are important for being a natural source of capsaicin. The information about this feature is scarce in native chili species in Ecuador. The aim of this study was to analyze main morphological characteristics in plants, fruits and seeds of five species of the genus *Capsicum*: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. annuum* y *C. frutescens*, collected in the provinces of Loja, Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas, Los Ríos and Morona Santiago. We also identified and quantified the capsaicin present in the oleoresin coming from fruits of these species. Identification of capsaicin was performed by Thin Layer Chromatography (TLC), comparing the oleoresins with the standard USP capsaicin (98.9%), getting an Rf value of 0.184; capsaicin denotes a low fluorescence at a wavelength of 254nm. Capsaicin was quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Capsicum chinense* presented the highest yield with an average of 11340 mg/kg, it was concluded that this species has a high potential for Capsaicin extraction, which can be used commercially in food and/or pharmaceutical industry.

Keywords: Ecuador, *Capsicum*, plant morphological characteristics, Capsaicin, Thin Layer Chromatography, High Performance Liquid Chromatography.

Forma sugerida de citar: Yáñez, P., D. Balseca, L. Rivadeneira y C. Larenas. 2015. **Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador**. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 12-32. ISSNp: 1390-3799, ISSNe: 1390-8596.

1. Introducción

Todas las formas de ají, pimiento o chile pertenecen al género *Capsicum*, familia Solanaceae. Además de *Capsicum*, en la familia existen otros géneros con especies cultivadas importantes tales como: *Solanum*, *Lycopersicon*, *Cyphomandra*, *Physalis*, entre otros (Núñez *et al.*, 2003).

En Ecuador, se reporta la existencia de 9 a 10 especies de ajíes (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. dimorphum*, *C. galapagoense*, *C. hookerianum*, *C. lycianthoides*, *C. pubescens*, *C. rhomboideum*, *C. frutescens*; siendo esta última considerada por algunos autores como perteneciente a *C. annuum*) y más de 60 variedades tradicionales en cultivo. Las especies nativas de Ecuador y que en la actualidad todavía están cultivándose son cinco: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. frutescens*) que se utilizan tradicionalmente como agregados naturales en diferentes platos. La única especie endémica es *C. galapagoense*, que crece de manera silvestre en las Islas Galápagos (de Investigaciones Agropecuarias, 2008).

Se sabe que el añadir ají o chile a diferentes comidas le confiere una identidad única (Bruneton, 2001).

Estudios recientes señalan que el ají tiene origen ecuatoriano según lo estableció un equipo internacional de investigadores de la Universidad de Calgary, en Canadá, y de la Universidad de Missouri de Estados Unidos. Según este estudio, los rastros más antiguos de ají fueron hallados en Loma Alta y Real Alto, Península de Santa Elena, y datan de hace 6100 años, mientras que los encontrados en otras zonas del continente tienen entre 5.600 y 500 años de antigüedad (Perry *et al.*, 2007).

Además de su importancia como alimento, se ha reportado que la especie es utilizada como medicamento entre las comunidades indígenas de México, Centro y Sudamérica (Chávez *et al.*, 2004). Cabe señalar que la medicina tradicional le atribuye propiedades irritantes, laxantes, rubefacientes y expectorantes. Se utiliza para tratar ciertas enfermedades culturales como "mal de aire y mal de ojo" y enfermedades de la piel como: la erisipela, erupciones, heridas externas, llagas infectadas, vesicante (Wai- zel y Camacho, 2011).

La Capsaicina es el componente responsable de la sensación picante de los ajíes, la cual incluso llega

a ser utilizada como analgésico tópico. Igualmente, en estudios como el de Athanasiou *et al.* (2007) se ha demostrado que los vaniloides, familia de moléculas a la que pertenece la Capsaicina, se unen a las proteínas en la mitocondria de la célula cancerosa y genera la apoptosis o muerte celular, sin dañar a las células sanas circundantes. La bioquímica de las mitocondrias en células cancerosas es muy diferente a la de las células normales, de ahí la gran selectividad de la Capsaicina en el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer.

1.1 Importancia farmacológica del género *Capsicum*

La aplicación de Capsaicina sobre la piel o mucosas produce ardor e hiperalgesia, pero la aplicación repetida da lugar a pérdida de sensibilidad a la Capsaicina; la aplicación de dosis más elevadas causa un bloqueo de las fibras C que conducen a un déficit sensorial de larga duración. Esta propiedad ha sido utilizada terapéuticamente en el dolor neuropático como una opción cuando los otros fármacos son ineficaces. Así, la Capsaicina ha demostrado su eficacia después de la administración repetida en el dolor postmastectomía, el dolor del muñón, la distrofia simpática refleja, el dolor neuropático oral, la fibromialgia y sobre todo en la neuropatía diabética y la neuralgia postherpética. En consecuencia existe un elevado interés en encontrar nuevos medicamentos análogos a la Capsaicina (Muriel, 2007).

Se ha verificado también que el consumo moderado de frutos de *Capsicum* spp. ayuda a bajar el índice de colesterol lipoproteínico de baja densidad (LDL), cuya presencia va de la mano con derrames cerebrales, hipertensión y enfermedades cardíacas. Además, aunque parezca inverosímil hay indicios de que el consumo de ají no agrava las úlceras estomacales, sino que las previene; al parecer la Capsaicina estimula la producción de jugos digestivos que protegen las paredes estomacales de los ácidos y del alcohol que causan las úlceras. Esta circunstancia ha llevado a especular que la Capsaicina podría servir como agente protector del estómago (Yeager, 2002).

Los ajíes al parecer también sirven para hacer menos espesa la sangre. Los mismos investigadores del Instituto Max Planck en Alemania descubrieron que aumentan el tiempo necesario para que se coagule la sangre, impidiendo de esta manera la forma-

ción de coágulos que desemboquen en ataques cardíacos y derrames cerebrales (Yeager, 2002).

Investigaciones dirigidas por Joo *et al.* (2010) sugieren que la Capsaicina puede causar pérdida de peso e impedir la acumulación de grasa mediante la estimulación de la expresión de ciertas proteínas degradantes de grasa, y estableciendo una regulación a la baja de otras proteínas que trabajan en la síntesis de grasa.

1.2 Composición fitoquímica de los frutos del género *Capsicum*

Los ajíes son ricos en ácido ascórbico, contienen igualmente heterósidos diterpénicos (capsianósidos) y un heterósido del furostanal (capsicósido). Su coloración se debe a la presencia de carotenoides con terminación ciclopenténica cuyo contenido aumenta a lo largo de la maduración: la capsantina es una 3,3'' -dihidroxi- β , κ -caroten-6,6'-ona- se en-

cuentra acompañado de capsorubina, capsantinona, criptocapsina, violaxantina, α -caroteno. El sabor picante de los pimientos fuertes y picantes se debe al contenido muy variable en amidas: los capsaicinoides. El compuesto mayoritario de esta serie es la Capsaicina, vainillamida del ácido 8-metil-non-6-enoico. El contenido en capsaicinoides, muy bajo en los pimientos morrones, puede sobrepasar el 1 % en las especies muy picantes (Bruneton, 2001).

1.3 La Capsaicina ((6E)-N-(4-Hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonanamida)

Es una sustancia de naturaleza alcaloide, concretamente un protoalcaloide (Figura 1), cuya fórmula empírica es $C_{18}H_{27}NO_3$. En la actualidad se sabe que la Capsaicina no es un compuesto simple, si no que se trata de una mezcla de varias amidas, que son comúnmente conocidas como capsaicinoides, siendo la Capsaicina la más importante entre ellas (Núñez *et al.*, 2003).

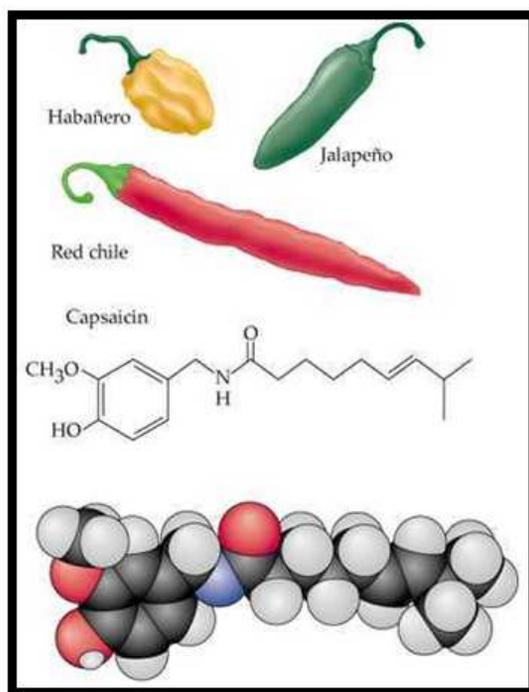


Figura 1. Molécula de la Capsaicina (8-metil-N-vainil-6-nonenamida). Fuente: (López, 2012).

Es el capsaicinoide mayoritario presente en las variedades picantes del género *Capsicum*, son aminas simples con nitrógeno extra cíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos; es un alcaloide oxigenado, en cuyo caso de manera pura se encuentra como un sólido cristalizable, incoloro y blanco (Navarro y Costa, 2000).

El contenido de Capsaicina es mayor en la placenta y en el septo del fruto, en donde representa un 2,5% de la materia seca, mientras que en el contenido general del fruto es del 0,6%, el de las semillas del 0,7% y del pericarpio del 0,03%. La formación de la Capsaicina se incrementa a temperaturas mayores de 30°C que a temperaturas menores (Núñez *et al.*, 2003). El contenido en Capsaicina de los frutos varía notablemente, en una magnitud del 1,5%

y está influido por las condiciones ambientales y la edad del fruto (Trease, 1998).

2. Materiales y métodos

2.1 Localización geográfica de los especímenes estudiados

Los frutos de los especímenes analizados fueron recolectados entre julio y septiembre de 2012. La muestra recolectada de cada una de las especies fue de aproximadamente 1 kilo de frutos maduros, utilizando un muestreo aleatorio estratificado, en plantaciones de diversas regiones del país (Tabla 1).

Tabla 1. Sitios de recolección de los frutos maduros de ajíes para la extracción de Capsaicina.

Fecha de Recolección	Nombre Común	Nombre Científico	Localidad	Ubicación Geográfica	Altitud (msnm)
12 ago 2012	Ají Cereza	<i>Capsicum baccatum</i>	km 19 vía a Quevedo, Recinto Mirador del Baba, Prov. Los Ríos.	01°02'00"S, 79°27'00"W.	370
25 ago 2012	Ají Habanero	<i>Capsicum chinense</i>	km 16 vía a Chone, San Jacinto del Búa, Prov. Santo Domingo de los Tsáchilas.	00°25'39"S, 79°17'42"W.	320
24 sep 2012	Ají Rocoto	<i>Capsicum pubescens</i>	km 6 vía a Cariamanga, cantón Gonzanamá, Prov. Loja.	03°59'35"S, 79°12'15"W.	2200
17 ago 2012	Ají Ratón	<i>Capsicum annuum</i>	km 3 vía a Esmeraldas, cantón San Lorenzo, Prov. Esmeraldas	01°17'18"N, 78°50'13"W.	20
25 sep 2012	Ají Gallinazo, Tabasco	<i>Capsicum frutescens</i>	Gualaquiza, prov. Morona Santiago.	02°02'10"S, 78°13'30"W.	514

2.2 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó tomando en cuenta el procedimiento propuesto por Miranda (2002), mediante la extracción sucesiva de la droga vegetal para la aplicación del análisis y el establecimiento de los principales grupos de constituyentes químicos presentes en los frutos de las cinco especies de *Capsicum*.

2.3 Extracción de la oleorresina

Se colocó la materia prima seca, previamente sometida al proceso de control de calidad, en el equipo

de destilación básico y mediante maceración dinámica a reflujo con etanol durante 5 horas, tomando en cuenta el punto de ebullición del solvente utilizado, a 78°C, y con agitación constante. A continuación se realizó la filtración del extracto obtenido, con papel filtro. Se concentró en un factor de 10 a los extractos obtenidos en el proceso anterior con un equipo de Rotavapor para obtener la oleorresina correspondiente (Figura 2). Para cada especie vegetal se realizaron tres repeticiones para la obtención de la oleorresina, completando un total de 15 unidades experimentales (5 especies x 3 repeticiones). Esta oleorresina fue parcialmente seca, hasta obtener una consistencia cremosa.

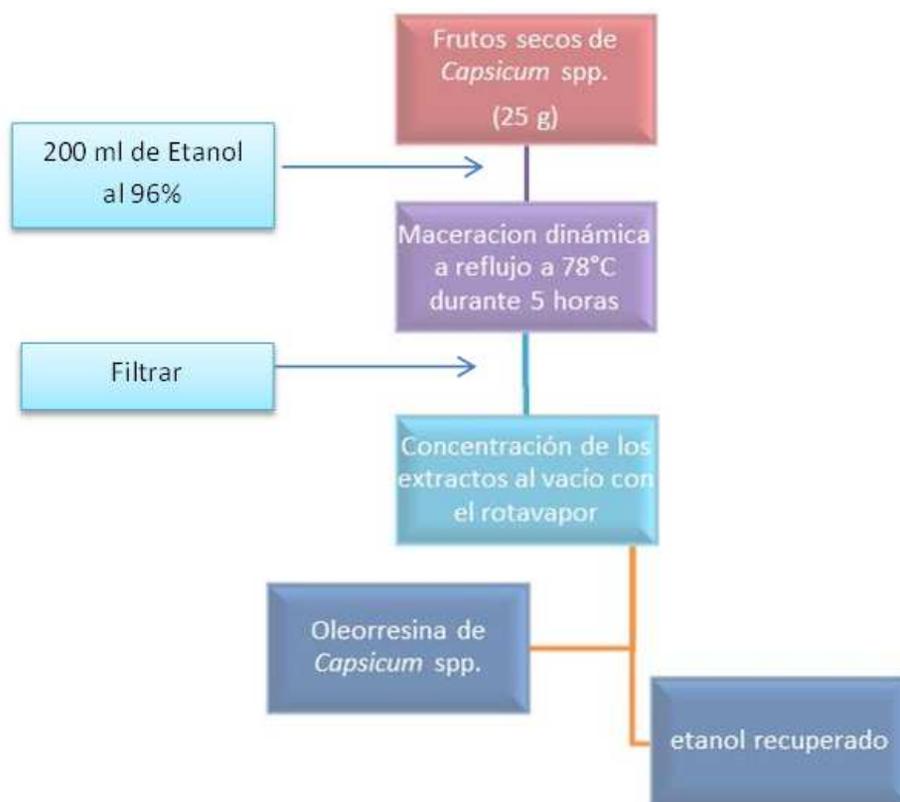


Figura 2. Procedimiento de extracción de la oleorresina de los frutos de *Capsicum* spp.

2.4 Identificación de la Capsaicina de las oleorresinas por TLC

Se trabajó con 50 mg de oleorresina, los cuales fueron disueltos en 1 ml de metanol según lo recomendado por Sein *et al.* (1998). Dicha solución de oleorresina se realizó para cada especie de *Capsicum* analizada. El estándar de Capsaicina USP (98,9% de pureza) se preparó a una concentración de 2,5 mg/ml de metanol. Se colocó sobre las placas de sílica gel 30 μ l de la solución preparada y 10 μ l de cada una de las muestras. La placa se colocó verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente, de tal forma que la parte inferior de la placa que contenía la muestra entró en contacto con la fase móvil éter etílico y hexano (3:1). Se secó la placa cromatográfica a temperatura baja para evitar la degradación de los principios activos. Se esperó a que evapore el eluyente de la placa y se analizó utilizando luz UV a 254 nm.

2.5 Cuantificación de Capsaicina mediante HPLC

El análisis HPLC cuantitativo de las 15 muestras de oleorresina de *Capsicum* spp., se realizó en un cromatógrafo de alto rendimiento marca WATERS con una bomba binaria 1525, un detector 2998 PDA Fotodiodo UV/vis de longitud de onda programable y una columna C18 *Spherisorb* ODS2, 80A°, fase reversa 5 μ m, 4.6 mm * 150 mm, 1pkg [PSS831913], Silanol. USP L1 para la fase estacionaria. El sistema HPLC se encontraba equipado con el software *Empower*.

Se pesaron 12,64 mg de estándar de Capsaicina USP \geq 98,9% HPLC en un balón de 25 ml y se llevó a aforo con Metanol grado HPLC. La solución resultante tuvo una concentración de 500 ppm. A partir de la solución Stock se realizaron las diluciones pertinentes para obtener soluciones más diluidas. Para obtener la curva de calibración se inyectó 20 μ l de

cada uno de los estándares y se efectuó una regresión lineal comparando la concentración de Capsaicina y el área de pico obtenido en el cromatograma, teniendo así las referencias necesarias para las mediciones de las muestras posteriores.

Siguiendo la metodología establecida para la cuantificación de Capsaicina de la AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), en 1998, se pesaron 200 mg de oleoresina en un matraz aforado de 10 ml evitando que la oleoresina forme una capa a los costados del balón. Se añadió 1 ml de acetona y se agitó hasta que la porción de muestra estuviera completamente dispersa. Se añadió 1 ml de etanol puro, agitando durante cada adición, finalmente se aforó con etanol hasta los 10 ml y se mezcló bien.

Se calentó la muestra a baño maría a una temperatura menor a 60°C, para evitar la degradación de la Capsaicina. Las muestras fueron colocadas en ultrasonido durante 15 minutos. Se tomó una alícuota de 5 ml y se filtró con aerodisk de 0,45 μm de 1-4 ml de solución en un vial de vidrio. Las soluciones se envasaron y etiquetaron en viales de 2 ml, se colocaron en el automuestreador del equipo HPLC Waters que fue previamente programado con el protocolo para cuantificación de Capsaicina (Tabla 2). Una vez conocida el área del pico que se requiere cuantificar, es posible obtener la concentración, interpolando los datos con la curva de calibración del estándar, ya que relaciona la respuesta del detector con la cantidad de compuesto inyectado, con los parámetros propuestos por Harris (2007) y Skoog *et al.* (2007).

Tabla 2. Sitios de recolección de los frutos maduros de ajíes para la extracción de Capsaicina.

FASE ESTACIONARIA	Columna Spherisorb de acero Inoxidable C18 fase reversa, ODS2 de 4,6 mm * 150 mm
FASE MÓVIL	Metanol 60 %, Acetonitrilo 20 %, Agua 20 %, grado HPLC, elución isocrática
FLUJO	0,8 ml/min durante 5 minutos
LONGITUD DE ONDA	280 nm
TEMPERATURA DE LA COLUMNA	29°C
VOLUMEN DE INYECCIÓN	20 μl

2.6 Método Scoville

También conocido como el método *Estándar Internacional ISO 3513-1977* para la aplicación en extractos o productos de ají para evaluar su grado de pungencia (Núñez *et al.*, 2003).

Según este método, se debe convertir a Unidades Scoville para determinar el grado de pungencia de las muestras analizadas, para ello se considera que una parte por millón (1 ppm) de Capsaicina equivale a 15 Unidades Scoville (US) (Batchelor y Jones, 2000).

2.6.1 Determinación de unidades de pungencia Scoville (SHU)

Para determinar el Valor de Pungencia en Unidades Scoville (SHU), en cada muestra es necesario multiplicar la concentración de Capsaicina presente (g/g) por el SHU del compuesto puro, al añadir este valor se obtiene un valor total de SHU (Núñez *et al.*, 2003).

En este sentido una ecuación referencial es:

$$1 \text{ ppm Capsaicina} = 15 \text{ unidades Scoville} = 1 \text{ unidad ASTA}$$

El rango de unidades Scoville (SHU) aceptado internacionalmente para chiles frescos de buen grado es de 2500 a 5000 SHU (Peralta, 2007) (Tabla 3), utilizando la equivalencia para convertir unidades Scoville en $\mu\text{g CAPS/g}$ chile (1 $\mu\text{g CAPS/g}$ chile fresco=15 SHU) se tiene que 2500 SHU equivalen a 0,1667 mg CAPS/g de chile, mientras que 5000 SHU son equivalentes a 0,3333 mg CAPS/g de chile.

2.7 Determinación diferencial del contenido de Capsaicina entre las cinco especies de *Capsicum*

Una vez obtenidos los valores de concentración de Capsaicina se procedió a aplicar un Análisis de Varianza, así como la prueba a posteriori de Tukey, para determinar si existe una diferencia significativa

entre el contenido de Capsaicina de las cinco especies.

De manera previa, se confirmó la normalidad en los datos a través de la prueba de Shapiro Wilks. En ambos casos el valor de alfa fue de 0,05.

2.8 Análisis Multivariado de las cinco especies de *Capsicum* utilizando características morfológicas y de contenido de Capsaicina

En las zonas de recolección de frutos de *Capsicum* (plantaciones artesanales), se estableció un muestreo aleatorio estratificado, tomando 20 plantas por especie.

En cada individuo vegetal se evaluaron *in situ* varios caracteres morfológicos en planta, flor y fruto, los cuales fueron diferenciados en descriptores cualitativos y cuantitativos (Tablas 4 y 5). Estas observaciones se efectuaron de acuerdo al manual de descriptores morfológicos para *Capsicum* propuesto por IPGRI-AVRDC-CATIE (1995).

En la matriz construida para el Análisis Multivariado, además de los datos de las Tablas 4 y 5, también se incluyeron los datos de control de calidad de la oleorresina y la concentración de Capsaicina en las cinco especies (Tablas 7 y 9).

El Análisis Multivariado incluyó un Análisis Clúster (de tipo Aglomerativo, utilizando como método la Unión Promedio y como medidas de similitud Distancias Euclidianas) y un Análisis de Ordenamiento (Análisis de Componentes Principales basado en una matriz de correlación).

3. Resultados y discusión

3.1 Descriptores morfológicos de las plantas y frutos de *Capsicum* spp.

En las Tablas 4 y 5 se presenta la información morfológica cualitativa y cuantitativa obtenida a partir del análisis de plantas y frutos de las 5 especies del género *Capsicum*.

Obsérvese como los colores predominantes en las semillas son el crema y el amarillo. Los colores de frutos maduros tienden a encontrarse entre el naranja-rojo y el rojo brillante, dependiendo de la especie. Las formas más comunes de los frutos son elongada y redonda. Los aromas van desde el suave al fuerte acre. En cuanto a la firmeza del fruto, predominan la suave y la intermedia. Finalmente, el follaje de la planta tiende a encontrarse entre denso a semidenso (Tabla 4).

Tabla 3. Escala Scoville y las principales especies/variedades de *Capsicum* spp. Fuente: (Peralta, 2007).

Unidad Scoville	Variedad/Chile
850 000 – 1 001 304	Bhut Jolokia (India, Sri Lanka)
350 000 – 570 000	Red Savina Habanero (California, Usa)
100 000 – 350 000	Chile Habanero
100 000 – 325 000	Scotch Habanero
100 000 – 200 000	Chile Jamaicano
50 000 – 100 000	Chilpete, Piquín, Chile Thai
30 000 – 50 000	Pimienta Cayanna, Chile Tabasco
10 000 – 30 000	Chile Serrano, Chile de árbol
2 500 – 8 000	Chile Jalapeño
2 500 – 5 000	Salsa Tabasco
1 000 – 1 500	Chile Poblano
0	Chile Dulce (Pimiento dulce, Chile Verde)

Tabla 4. Descriptores morfológicos cualitativos evaluados en las plantas y frutos de *Capsicum* spp.

	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. annuum</i>	<i>C. frutescens</i>
Color semillas ⁽¹⁾	1	2	3	1	2
Color fruto maduro ⁽²⁾	8	5	7	6	8
Forma fruto ⁽³⁾	2	5	2	1	1
Aroma fruto ⁽⁴⁾	2	4	3	3	4
Factibilidad de separación del fruto ⁽⁵⁾	1	1	3	2	2
Firmeza del fruto ⁽⁶⁾	2	2	3	1	1
Densidad del follaje ⁽⁷⁾	1	2	2	2	1

NOTAS:

(1) 1= crema, 2= amarilla, 3= morada

(2) 1=amarillo-limón, 2=amarillo, 3=amarillo-naranja, 4=naranja-pálido, 5=naranja-rojo, 6=rojo claro, 7=rojo oscuro, 8=rojo brillante, 9=morado, 10=marrón

(3) 1=elongado, 2=redondo, 3=triangular, 4=acampanado, 5=acorazonado, 6=cónico

(4) 1=sin aroma, 2=aroma suave, 3=aroma fuerte, 4=aroma fuerte acre

(5) 1=fácil, 2=medio, 3=difícil

(6) 1=suave, 2=intermedio, 3=duro

(7) 1=densa, 2=semidensa, 3=rala

La altura promedio de la planta fluctuó entre 0,85 m (*Capsicum annuum*) hasta 2,05 m (*C. chinense*); la longitud promedio del fruto maduro entre 1,24 cm (*C. baccatum*) hasta 4,65 cm (*C. chinense*); el diámetro promedio del fruto maduro entre 0,61 (*C. annuum*) hasta 3,40 (*C. pubescens*); mientras que su peso promedio entre 1,20 g (*C. baccatum*) y 8,30 g (*C. pubescens*) (Tabla 5).

Tabla 5. Descriptores morfológicos cuantitativos medidos en plantas y frutos de *Capsicum* spp. (*)

	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. annuum</i>	<i>C. frutescens</i>
Altura promedio de la planta (m)	1,37	2,05	1,49	0,85	1,24
Longitud promedio del fruto maduro (cm)	1,24	4,65	4,07	2,17	2,71
Diámetro promedio del fruto maduro (cm)	1,79	3,10	3,40	0,61	0,76
Peso promedio del fruto maduro (g)	1,20	7,80	8,30	2,60	3,70

NOTA:

(*) n = 20, en cada descriptor.

3.2 Control de calidad de los frutos analizados para contenido de Capsaicina

Se realizó un estudio farmacognóstico de los frutos secos de las cinco especies representativas del género *Capsicum* (*C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. annuum*, *C. frutescens*), determinando las caracte-

rísticas macromorfológicas y los parámetros físico químicos de control de calidad de la droga, considerando la Norma NTE INEN 2532 (de Normalización, 2010).

Las características macroscópicas más llamativas de los frutos de las cinco especies se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Características macroscópicas de los frutos de las especies analizadas de *Capsicum*.

Imagen	Especie	Color del fruto maduro	Forma de la base del fruto	Forma del ápice del fruto	Forma del fruto en corte transversal	Forma del fruto en corte longitudinal	Aroma	Textura	Uniformidad del fruto	Color de la semilla
	Aji Cerezo <i>Capsicum baccatum</i> DBLR1	NARANJA-ROJO	Redondo obtuso	Acuminada	Redonda	Elíptica	Suave	Lisa	Uniforme	Anaranjada
	Aji Habanero <i>Capsicum chinense</i> DBLR2	ROJO CLARO	Truncada	Aguda	Lobada	Lanceolada	Dulce	Semi-rugosa	Uniforme	Blanquecina
	Aji Rocoto <i>Capsicum pubescens</i> DBLR3	ROJO OSCURO VINO	Prolongada	Redonda	Lobada	Elíptica	Sin aroma	Lisa	No uniforme	Negra
	Aji Ratón <i>Capsicum annuum</i> DBLR4	NARANJA-ROJO	Truncada	Aguda	Redonda	Elíptica alargada	Fuerte	Lisa	No uniforme	Blanquecina verdosa
	Gallinazo, tabasco <i>Capsicum frutescens</i> DBLR5	NARANJA CLARO	Prolongada	Aguda	Lobada suave	Ovado	Suave	Lisa	Uniforme	Amarilla

Se determinó el contenido de elementos extraños en los frutos, procedentes de la planta originaria (partes no usadas), así como también, sustancias externas de procedencia vegetal (de otras especies vegetales), animal (plumas, pelos, heces) o mineral (tierra, arena piedras). La cantidad de materias extrañas contenidas en las muestras analizadas se encontró en un rango de entre el 1,40-2,05 %, valores aceptables, ya que según la Farmacopea Europea el nivel de materias extrañas no debe ser mayor al 2 %. En su mayoría estos elementos estuvieron conformados por polvo y piedrecillas finas que fueron separados de manera previa a los ensayos químicos cuantitativos de control de calidad.

Los valores de control de calidad nunca sobrepasaron los límites máximos recomendados por la normativa referencial pertinente (Tabla 7).

3.3 Tamizaje fitoquímico

Se determinó en el extracto etéreo una importante cantidad de alcaloides; en el ensayo para aceites y grasas se registraron cantidades altas en *C. chinense* y *C. pubescens*, moderadas en *C. annuum* y *C. frutescens* y bajas en *C. baccatum*; mostrando una reacción negativa para triterpenos y esteroides (Tabla 8).

En el análisis del extracto etanólico se encontró la presencia significativa de resinas, grasas y aceites; compuestos fenólicos/taninos y aminas en cantidades moderadas. También, una cantidad moderada de saponinas en todos los extractos menos en *C. pubescens* que no mostró ninguna reacción al ensayo.

No se encontraron lactonas y cumarinas, glicósidos cardiotónicos, ni flavonoides. En el extracto acuoso se obtuvo la presencia de azúcares reductores, principios amargos y astringentes y no se encontraron ni mucílagos ni antocianidinas (Tabla 8).

3.4 Identificación de Capsaicina en las oleorresinas por TLC

La Capsaicina presenta una leve fluorescencia al exponerla a una longitud de onda UV de 254 nm, lo cual permitió su identificación. Al comparar el estándar USP con las muestras analizadas se observan las bandas ubicadas a la misma altura como se puede observar en la Figura 3.

Se obtuvo un Rf de 0,184 (1,52/8,28) tanto para el estándar de Capsaicina como para las muestras de Capsicum a 254 nm, lo cual evidenció la presencia de este principio activo en las muestras analizadas. La mancha más pronunciada pertenece a *Capsicum chinense* lo que indica que esta especie posee una mayor cantidad de Capsaicina frente a las otras muestras, lo que también se evidenció posteriormente con el análisis HPLC.

3.5 Cuantificación de Capsaicina

Los niveles de rendimiento de oleorresina en los extractos fluctuaron entre 5,6 a 16,5 %, con una concentración de Capsaicina de entre 600,3 a 11339,9 mg/kg, dependiendo de la especie (Tabla 9).

Tabla 7. Valores en ensayos físico-químicos cuantitativos de control de calidad comparados con la normativa pertinente.

Especie	Cenizas totales (%)	NTE INEN 1117 (Máx. %)	Cenizas solubles en agua (%)	NMX-F-260-1978 (Máx. %)	Cenizas insolubles en HCl (%)	NTE CON-VENIN 1539-80 (Máx. %)	Humedad (%)	NTE INEN 1114 (Máx. %)
<i>C. baccatum</i>	4,99	8,5	1,83	2,0	0,94	2,0	7,55	10,0
<i>C. chinense</i>	3,62	8,5	1,20	2,0	0,38	2,0	7,90	10,0
<i>C. pubescens</i>	3,53	8,5	1,39	2,0	0,55	2,0	13,99	10,0
<i>C. annuum</i>	4,66	8,5	0,68	2,0	0,55	2,0	7,40	10,0
<i>C. frutescens</i>	4,14	8,5	1,33	2,0	0,58	2,0	6,55	10,0

Tabla 8. Resultados del Tamizaje fitoquímico de las especies de *Capsicum*.

METABOLITO	ENSAYO	EXTRACTO	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. annuum</i>	<i>C. frutescens</i>
Aceites y grasas	Sudan	Etéreo	+	+++	+++	++	++
Alcaloides	Dragendorff Wagner	Etéreo	+++	+++	+++	+++	+++
		Alcohólico	+++	+++	+++	+++	+++
		Acuoso	-	-	-	-	-
Triterpenos esteroides	Lieberman- Burchard	Etéreo	-	-	-	-	-
Lactonas y coumarinas	Baljet	Etanólico	-	-	-	-	-
Resinas	Resinas	Etanólico	+	+++	+++	++	++
Compuestos fenólicos y taninos	Cloruro férrico	Etanólico	+	+	+	+	+
Azúcares reductores	Fehling	Acuoso	+	+	+	+	+
Saponinas	Espuma	Etanólico	+	+	-	+	+
Glicosidos cardiotónicos	Kedde	Etanólico	-	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	Etanólico	-	-	-	-	-
Aminoácidos libres o aminas en general	Ninhidrina	Etanólico	+	+	+	+	+
Antocianidinas	Antocianidinas	Acuoso	-	-	-	-	-
Mucílagos	Mucílagos	Acuoso	-	-	-	-	-
Principios astringentes y amargos		Acuoso	+	+	+	+	+

(+) Respuesta positiva de poca cantidad para este metabolito en el extracto.

(++) Respuesta positiva de mediana cantidad para este metabolito en el extracto.

(+++) Respuesta positiva de mayor cantidad para este metabolito en el extracto.

(-) Respuesta negativa para este metabolito en el extracto

Fuente: González *et al.* (2013)

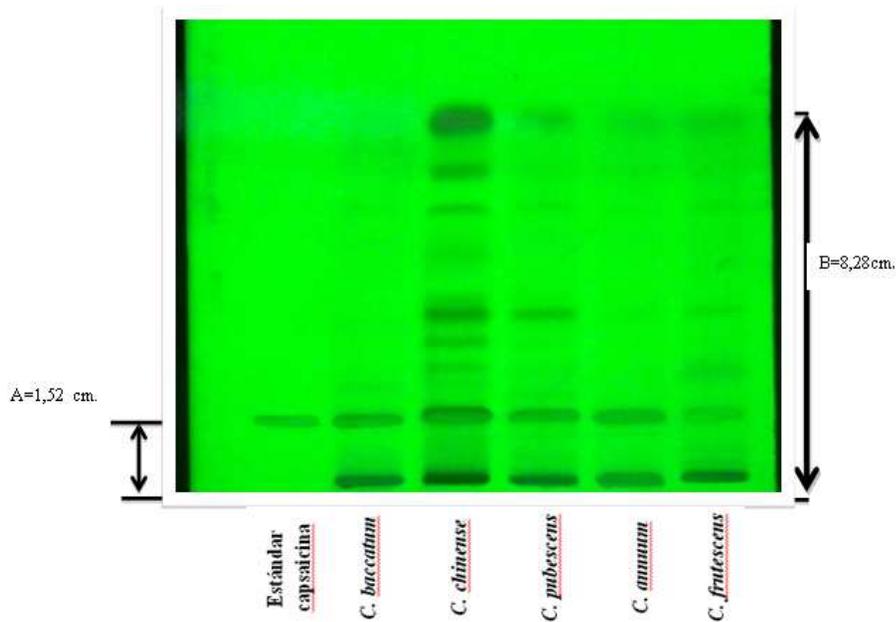


Figura 3. Determinación del Rf. para Capsaicina en placa cromatográfica observada a 254 nm. Notas: A=recorrido del estándar de Capsaicina. B=recorrido total de las muestras. Fase móvil: éter etílico-hexano (3:1). Fase estacionaria: cromatoplaca HPTLC Nano-Sil C18-100.

Tabla 9. Parámetros relacionados con la cuantificación de Capsaicina en cinco especies de *Capsicum*.

	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. annum</i>	<i>C. frutescens</i>
Rendimiento promedio de la oleorresina (%)	5,60	16,50	14,90	11,30	12,10
Densidad de la oleorresina (mg/ml)	0,75	0,79	0,84	0,94	0,71
pH de la oleorresina	9,05	8,28	9,41	7,80	8,59
Concentración Capsaicina (mg/kg)	1164,69	11339,94	600,27	2992,01	2046,66

Las oleorresinas obtenidas poseen cierta variación en sus características organolépticas como en el color, pasando desde el vino oscuro de *C. chinense* y *C. baccatum* y el anaranjado para *C. frutescens*, *C. annum* y *C. baccatum*.

3.5.1 Cuantificación de Capsaicina mediante HPLC

Sensibilidad del método. Se efectuó el proceso de calibración para el estándar de Capsaicina con diluciones de 5, 10, 20, 40, 100 y 500 ppm en metanol grado HPLC, para cada uno de los cuales se obtuvo su respectiva área del pico y tiempo de retención (Tabla 10).

A partir de los valores de concentración y área del pico se obtuvo la correspondiente relación de linealidad ($y = 13410x + 7919,8$), con un coeficiente de determinación de $r^2 = 1$, corroborando una muy buena sensibilidad del método para cuantificación de Capsaicina.

Cuantificación de Capsaicina. Los cromatogramas permitieron identificar los picos de absorción con tiempos de retención promedio de 2,675 minutos para la Capsaicina (Figura 4) al usar como fase móvil una solución de metanol 60%: agua 20%: acetonitrilo 20%.

Hubo una serie de picos adicionales no identificados (Figura 4), los cuales probablemente corresponderían a otros capsaicinoides presentes en la oleoresina, los cuales se podrían identificar utilizando estándares externos.

En la Figura 5, en cambio, se pueden observar los cromatogramas correspondientes a las muestras provenientes de frutos de las 5 especies de *Capsicum* analizadas.

Tabla 10. Área de los picos de las diluciones del estándar de Capsaicina.

CONCENTRACION (ppm)	ÁREA DEL PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos)
5	81646	2,675
10	144551	2,677
20	280733	2,675
40	544336	2,675
100	1332003	2,674
500	6716001	2,675

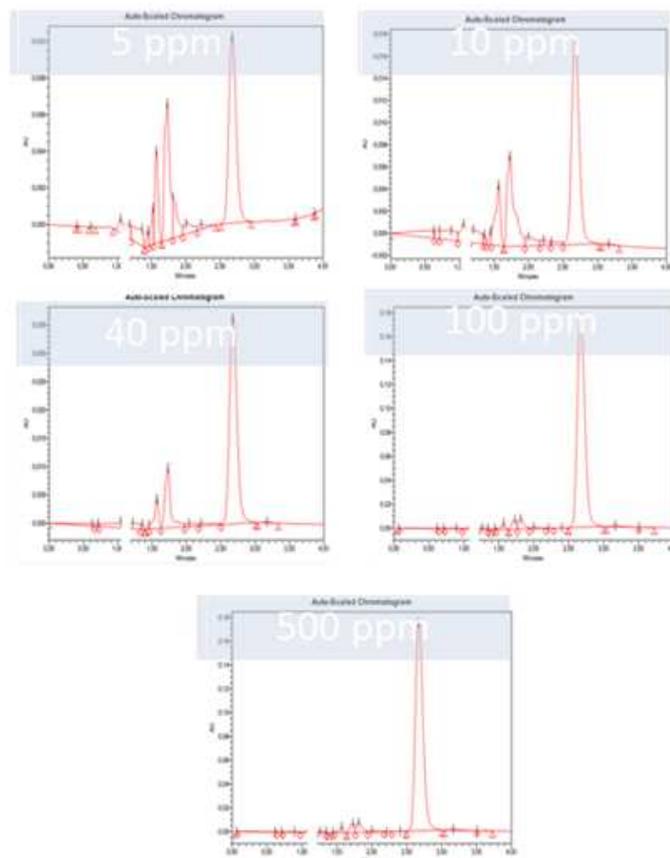


Figura 4. Cromatogramas de los estándares de Capsaicina.

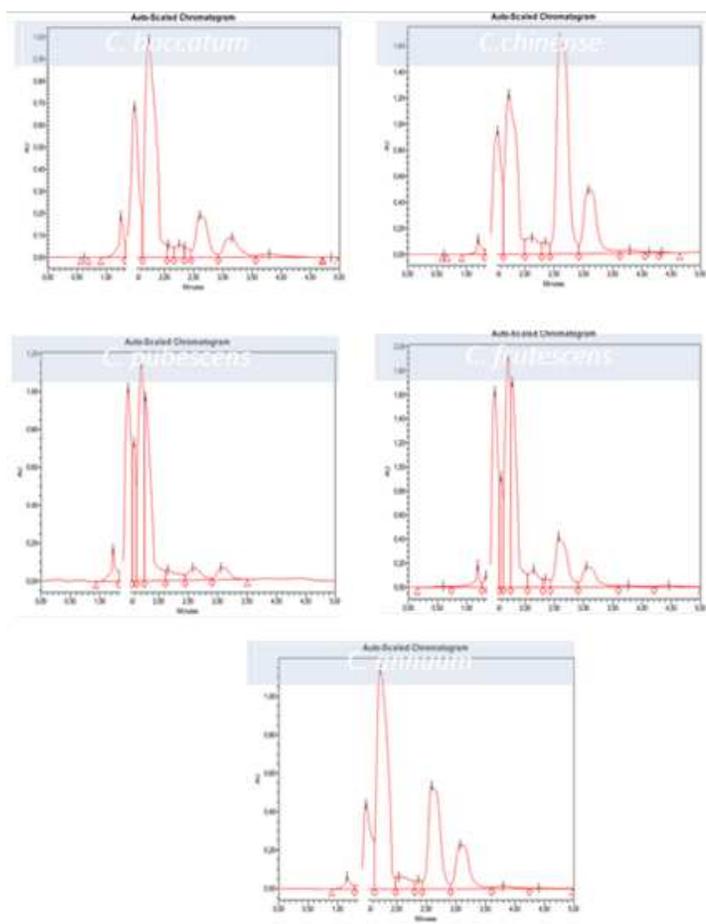


Figura 5. Cromatogramas de las muestras de las cinco especies de *Capsicum*.

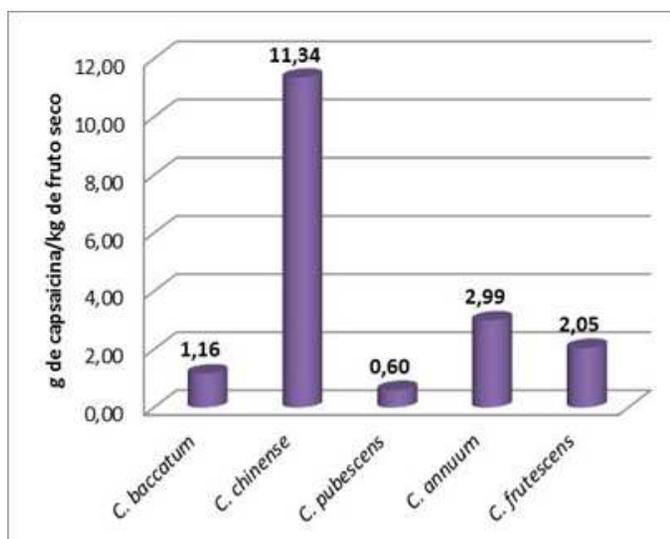


Figura 6. Concentración de Capsaicina (g/kg) en frutos secos de *Capsicum* spp.

La concentración de Capsaicina fue de 0,60-11,34 g/kg de fruto seco en las cinco especies de *Capsicum* (Figura 6), siendo *Capsicum chinense* la de mayor concentración 11,34 g/kg de fruto seco sobrepasando contenidos reportados de 7,27 g/kg y 8,47 g/kg de fruto seco en habaneros naranja Cisneros *et al.* (2007).

Considerando a su vez el porcentaje promedio de Capsaicina a partir del análisis de la oleoresina, éste fue en *Capsicum baccatum* 0,12%; en *C. chinense* 1,13%; en *C. pubescens* 0,06%; en *C. annum* 0,3% y en *C. frutescens* 0,2%.

3.6 Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville (SHU)

El nivel del pungencia es un parámetro de calidad en los frutos de *Capsicum* spp. En la Tabla 11 se puede apreciar la correspondencia entre la concentración de Capsaicina (en ppm) y las unidades Scoville para cada especie analizada.

Las concentraciones de Capsaicina en las cinco especies estudiadas deben ser consideradas como una medida del grado de picor de cada especie, encontrándose *Capsicum baccatum* y *C. pubescens* en un grado de picor medio (5000-20000 SHU); *C. annum*

y *C. frutescens* mostraron niveles de picor elevado; destacándose, por sobre todos, *C. chinense* superando las 170 000 SHU.

3.7 Determinación diferencial del contenido de Capsaicina

En la Tabla 12 se pueden observar los valores del contenido de Capsaicina de las nueve muestras analizadas en las cinco especies de *Capsicum*.

El estadístico *F* producto de la comparación de los valores de Capsaicina entre especies fue de 1053, con un *p* asociado $\ll 0,05$. Con lo cual se logró determinar que existe al menos una especie de *Capsicum* que presenta una concentración de Capsaicina diferente a la de las demás especies.

Buscando determinar cuál especie es la que posee tal concentración diferente, el Test a posteriori de Tukey permitió determinar que la concentración de Capsaicina de TODAS las especies comparadas es diferente entre sí, perteneciendo cada especie a un grupo estadístico significativamente diferente; corroborando además, el orden en torno al cual *Capsicum chinense* es la especie con mayor contenido de Capsaicina, seguida de *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens*, respectivamente.

Tabla 11. Concentración de Capsaicina en Unidades ppm y en Unidades Scoville (SHU) para los frutos de las cinco especies del estudio.

ESPECIE	CONCENTRACION (ppm)	SHU
<i>Capsicum baccatum</i>	1164,69	17470,40
<i>Capsicum chinense</i>	11339,94	170099,05
<i>Capsicum pubescens</i>	600,27	9004,09
<i>Capsicum annum</i>	2992,01	44880,14
<i>Capsicum frutescens</i>	2046,66	30699,90

Tabla 12. Concentración de Capsaicina (mg/kg) en las cinco especies de *Capsicum*.

Muestra	<i>Capsicum baccatum</i>	<i>Capsicum chinense</i>	<i>Capsicum pubescens</i>	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Capsicum frutescens</i>
1	963,77	12074,00	647,35	2930,57	2434,26
2	898,11	12180,82	635,11	2672,00	2633,75
3	827,13	12473,44	638,23	2741,70	2662,55
4	1451,96	11252,30	532,85	2887,29	1530,74
5	1454,66	10541,88	546,07	2931,83	1574,88
6	1409,02	11014,15	545,00	2942,74	1558,16
7	1211,56	10796,81	633,86	3259,18	1779,65
8	1121,02	10888,52	627,85	3289,16	2214,94
9	1145,01	10837,52	596,13	3273,61	2031,01
Sumatoria	10482,24	102059,43	5402,46	26928,08	18419,94
Media	1164,69	11339,94	600,27	2992,01	2046,66
Desviación Estándar	238,79	709,99	46,52	230,44	461,18

3.8 Análisis Multivariado

En el dendrograma resultante (Figura 7) queda reflejada la formación de dos conglomerados bien definidos: el primero conformado por *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. baccatum*, debido a sus formas, tamaños, colores y contenidos medios de Capsaicina similares; el segundo grupo formado por *C. chinense* y *C. pubescens*, los cuales muestran características tanto químicas como morfológicas parecidas, principalmente en cuanto a forma y color del fruto, así como en cuanto al tamaño de la planta.

En cuanto al plano de ordenamiento generado (Figura 8) a través del Análisis de Componentes Principales (ACP) muestra como *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. baccatum* (sector izquierdo del plano) tienen contenidos de cenizas totales elevados, colores de frutos rojos a rojos brillantes, a la vez tienen valo-

res bajos de humedad en el fruto, concentración de Capsaicina, rendimiento de la oleorresina, frutos de poca longitud y peso, plantas más bien bajas y de poco follaje.

Lo contrario sucede con *C. chinense* y *C. pubescens* (sector derecho del plano), las cuales muestran mayor concentración de Capsaicina, con frutos más largos y pesados, con mayor firmeza y humedad, con pocas cenizas totales, con plantas más altas y de mayor follaje.

Finalmente, cabe destacar también que *C. chinense* es la especie que más concentración de Capsaicina presenta, muy por encima de las otras, lo cual la coloca en el plano de ordenamiento fuertemente correlacionada con esta variable (sector superior derecho del plano).

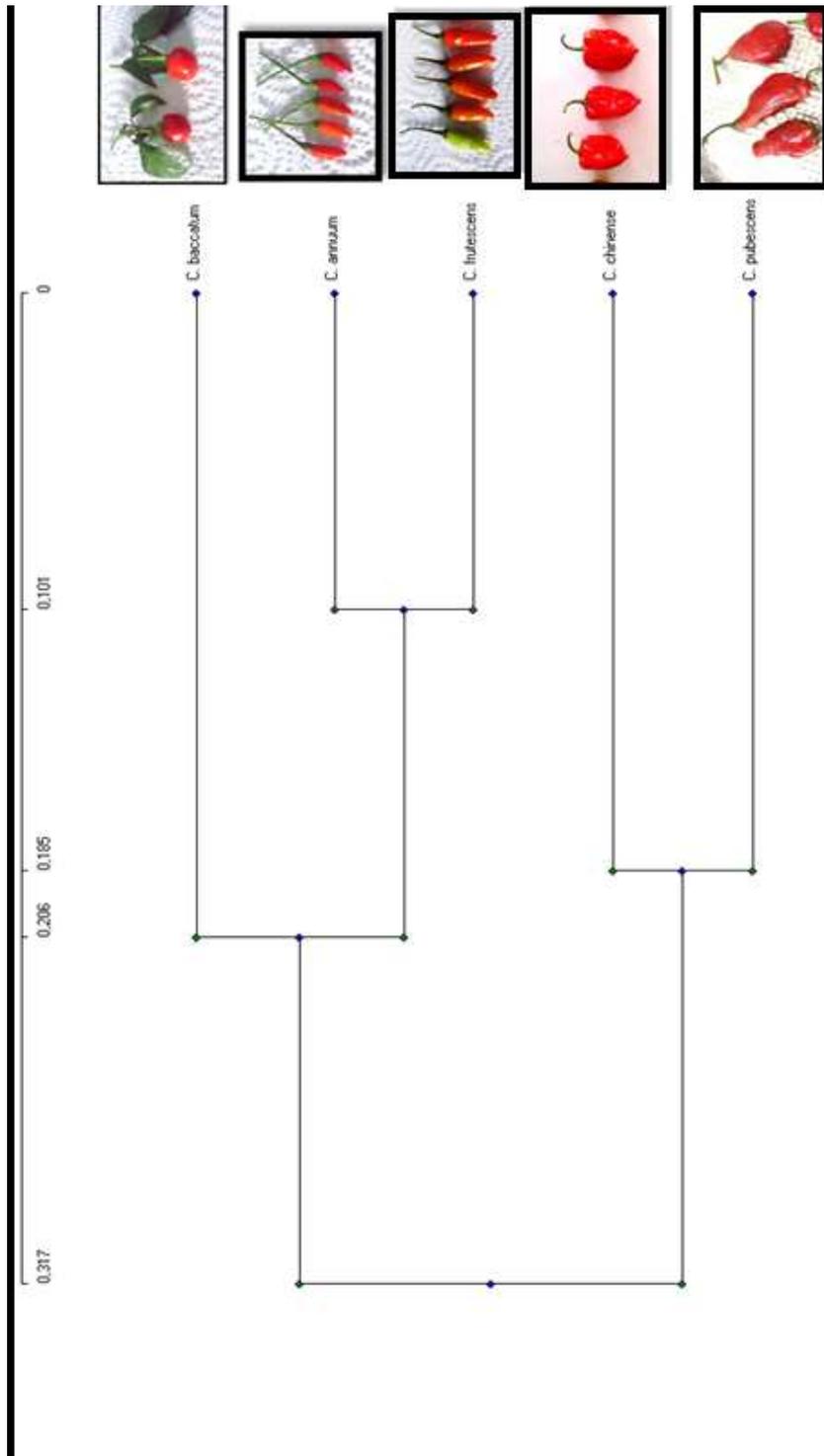


Figura 7. Dendrograma que muestra la similitud entre las cinco especies de *Capsicum* estudiadas; de tipo Aglomerativo, basado en el Método de la Unión Promedio y utilizando como medidas de disimilitud Distancias Euclidianas.

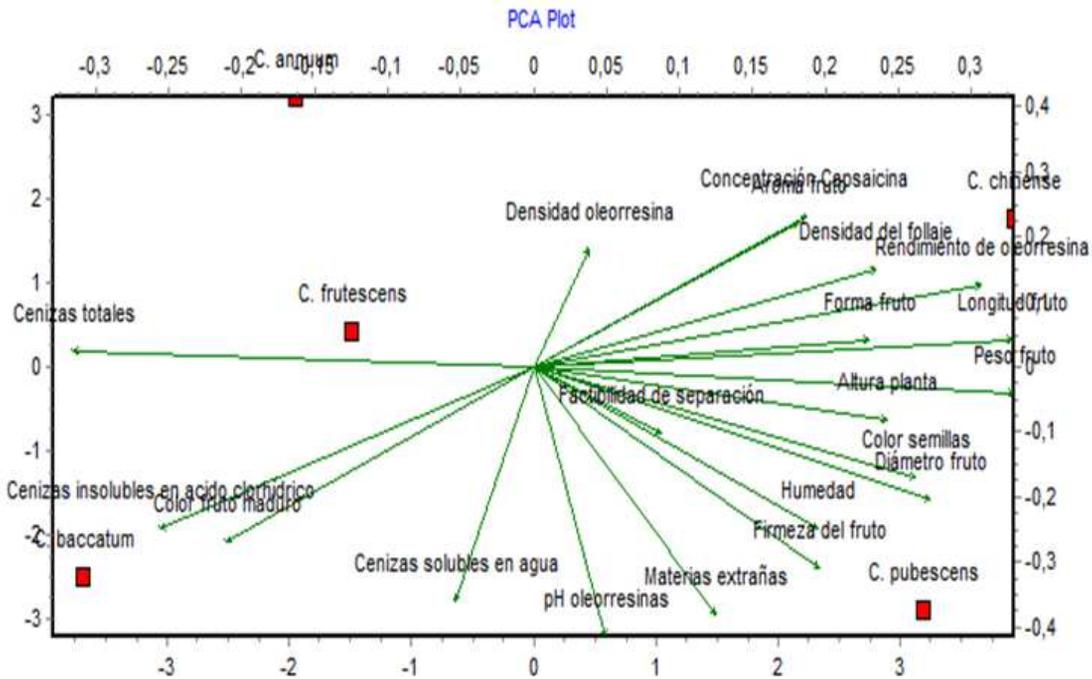


Figura 8. Plano de ordenamiento para cinco especies de *Capsicum* en relación a variables morfológicas y de la oleoresina de sus frutos; generado por un Análisis de Componentes Principales, basado en una Matriz de Correlación. La varianza observada por los ejes fue: en F1 (eje horizontal) 41 %, en F2 (eje vertical) 35 %.

4. Conclusiones

Los frutos de *Capsicum chinense* mostraron la mayor concentración de Capsaicina de entre las cinco especies estudiadas. El contenido promedio de Capsaicina en esta especie fue de 11,34 g/kg de fruto seco. En contraste, *C. pubescens* tuvo solo un contenido de 0,60 g/kg. Estos resultados son similares a lo propuesto por Núñez *et al.* (2003), quienes además señalan que el contenido de Capsaicina varía directamente con la temperatura ambiental de la zona de cultivo: los ejemplares de *C. chinense* del presente estudio provienen de sectores con temperaturas promedio de alrededor de 28°C, en tanto que los de *C. pubescens* se cultivan en zonas con promedios de temperatura menores (18-20°C).

En cuanto a la escala de pungencia de Scoville los resultados obtenidos señalan valores intermedios de unidades Scoville, similares a lo reportado en otros estudios para especies de ajíes afines a las analizadas; por ejemplo, *Capsicum chinense* presenta 170000 SHU en el presente estudio, mientras que

en otros reportes se señala que esta especie alcanza entre 100000-350000 SHU (Peralta, 2007).

Los resultados muestran que el método seguido para la extracción de la oleoresina ofrece una adecuada precisión; a pesar de ello, el contenido de Capsaicina, manifiesto en el área bajo la curva del cromatograma, tiene cierta variabilidad. Las causas de esta variación podrían deberse a que las muestras obtenidas para la extracción de la oleoresina provienen de plantas de edad no bien determinada, quizá muy variable, e igualmente provienen de frutos maduros, pero cuyo grado de maduración no pudo ser establecido/controlado; estos son factores determinantes en la biosíntesis de Capsaicina, como lo indican investigadores como Núñez *et al.* (2003).

Los resultados del análisis proximal para las cinco especies bajo estudio denotan en general concordancia con la información bibliográfica disponible, a excepción del contenido de humedad en *Capsicum pubescens* cuyo valor (14 %) sobrepasa el límite superior (8 %) establecido en la norma NTE INEN 2532 (2010) para condimentos y especies.

El conocimiento del contenido de Capsaicina de las especies bajo estudio indica que *Capsicum chinense*, conocido como ají habanero, es una especie con alto valor para la industria de los alimentos, especialmente en la elaboración de salsas y condimentos picantes. Además debido a su alto rendimiento es potencialmente interesante su utilización como materia prima para la extracción y purificación de Capsaicina utilizada con fines investigativos y/o aplicaciones farmacéuticas.

5. Recomendaciones

Resulta importante la realización de futuras investigaciones sobre las especies de *Capsicum* presentes en el país, principalmente sobre la concentración y rendimiento de oleoresina en los frutos maduros de diferentes poblaciones y cultivares, de diferentes condiciones ambientales y aplicando métodos comprobados de extracción y cuantificación.

Particularmente, un caso interesante de abordar sería el estudio de *Capsicum pubescens* buscando determinar la composición exacta de la oleoresina, dado que hay un alto rendimiento de la misma, pero con un bajo contenido de Capsaicina. El comportamiento de solubilidad de la oleoresina de esta especie así como el tamizaje fitoquímico y el análisis TLC hace presumir la existencia de otros componentes mayoritarios que podrían ser de interés farmacéutico o industrial.

Para estudios más rigurosos sobre la composición fitoquímica de los frutos de estas especies, es importante contar con un diseño experimental que tome en cuenta de manera controlada variables como la edad de las plantas, procedencia, tipo de suelo, temperatura ambiental del sitio y otros factores que pudieran estar afectando a la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular de los capsaicinoides.

En cuanto a las cinco especies analizadas, se podría complementar lo que conocemos de ellas efectuando otras investigaciones que evalúen el contenido de otros capsaicinoides, por ejemplo dihidro-capsaicina y homodihidro-capsaicina, reportados por González *et al.* (2013) que poseen igualmente un alto valor comercial por sus potenciales aplicaciones en el campo médico.

Igualmente, y tomando en cuenta la información

ya generada sobre el género *Capsicum* y la Capsaicina, se recomienda continuar con investigaciones que busquen impulsar, en nuestro país, el aprovechamiento del prometedor potencial terapéutico de la Capsaicina y otros compuestos similares.

Referencias

- Anónimo. 2014. **Escala scoville de pimientos picantes (537 variedades)**. URL <http://www.pimientospicantes.com/scoville/>.
- Athanasίου, A., P. Smith, S. Vakilpour, N. Kumaran, A. Turner y D. Bagiokou. 2007. **Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364: 50–55.
- Batchelor, J. y B. Jones. 2000. **Determination of the scoville heat value for hot sauces and chilies: An hplc experiment**. *Journal of Chemical Education*, 2(77): 266–267.
- Bruneton, J. 2001. **Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas Medicinales**. Acribia S.A., Zaragoza, 2 edición.
- Chávez, J., J. Tuxill y D. Jarvis. 2004. **Manejo de la diversidad de los cultivos en los agrosistemas tradicionales**. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali.
- Cisneros, O., L. Torres, L. Gutiérrez, F. Contreras, T. González y S. Peraza. 2007. **Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of yucatan, mexico**. *Food Chem*, 104: 1755–1760.
- de Investigaciones Agropecuarias, I. I. N. A. 2008. **Estado de los Recursos Fitogenéticos para la agricultura y la alimentación**. INIAP, Quito.
- de Normalización, I. S. E. 1984. **Norma Técnica NTE INEN 1117. Determinación de cenizas totales en el café soluble**. INEN, Quito.
- de Normalización, I. S. E. 2010. **Norma Técnica NTE INEN 2532. Requisitos para Especies y Condimentos**. INEN, Quito.

- González, A., E. Sierra, G. Luna, R. Pérez, J. Rodríguez y J. García. 2013. **Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature.** *Molecules*, 18: 13471–13486.
- Harris, D. 2007. **Quantitative chemical analysis.** W. H. Freeman, New York, 7 edición.
- International, A. 1998. **Capsaicinoids in capsicums and their extractives. liquid chromatographic method.** *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 2(43): 13–15.
- IPGRI-AVRDC-CATIE. 1995. **Descriptores para Capsicum (Capsicum spp.).** Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación relativos a los Vegetales, Taipei, Taiwán y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Joo, J., D. Kim, J. Choi y J. Yun. 2010. **Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats.** *PubMed*, 9(6): 2977–2987.
- López, E. 2012. **Biochemistry2013. esperanza sobre el fin del dolor.** URL (<http://biochemistry2013.wordpress.com>).
- Miranda, M. 2002. **Métodos de análisis de drogas y extractos.** Universidad de la Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos, Habana.
- Muriel, C. 2007. **Dolor crónico.** Arán, España.
- Navarro, F. y J. Costa. 2000. **La oleoresina del pimentón.** Secretariado de Publicaciones, Murcia.
- Núñez, F., R. Gil y J. Costa. 2003. **Cultivo de pimientos, chiles y ajíes.** Mundi-Prensa, Madrid.
- Peralta, G. 2007. **Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville para Capsicum annum var. aviculare procedente de Regiones Productoras de Guatemala.** Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Perry, L., R. Dickau, S. Zarrillo, I. Holst, D. Pearsall y M. Berman. 2007. **Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (capsicum spp. l.) in the americas.** *Science*, pp. 986–988.
- Sein, G., C. Gardinali, E. Mandrile y L. Cafferata. 1998. **Cuantificación de capsaicinoides en capsicum chacoense a.t. hunziker (solanaceae).** *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 17: 5–10.
- Skoog, D., F. Holler y S. Crouch. 2007. **Principles of instrumental analysis.** Brooks Cole, Australia, 6 edición.
- Trease, G. 1998. **Farmacognosia.** McGraw-Hill, Madrid.
- Waizel, J. y R. Camacho. 2011. **El género capsicum spp.** *Aleph Zero*, 60: 67–79.
- Yeager, S. 2002. **La guía médica de remedios alimenticios.** Rodale, EEUU.

PREVALENCIA DE LEUCOSIS BOVINA EN LA COMUNIDAD SANTO DOMINGO N° 1, CAYAMBE-ECUADOR 2012

PREVALENCE OF BOVINE LEUCOSIS IN THE SANTO DOMINGO COMMUNITY

NO. 1, CAYAMBE-ECUADOR 2012

Nancy Bonifaz¹ y Fernando Ulcuango²

¹Grupo de Investigación NUNKUI WAKAN, Universidad Politécnica Salesiana, Campus El Girón: Av. Isabel la Católica N. 23-52 y Madrid

²Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Universidad Politécnica Salesiana, Centro de Apoyo Cayambe, Av. Natalia Jarrín y 9 de Octubre, Telf. (593-2) 3962885, Ecuador

Autor para correspondencia: nbonifaz@ups.edu.ec, fernando_bley@hotmail.com

Manuscrito recibido el 19 de marzo de 2015. Aceptado, tras revisión, el 12 de noviembre de 2015.

Resumen

En la Parroquia de Ayora, comunidad Santo Domingo N° 1 se realizó el diagnóstico serológico para la detección de Leucosis bovina mediante la prueba de ELISA. Los objetivos de la investigación fueron, estimar la prevalencia de la enfermedad y su relación con los factores de riesgo, determinar el número de casos positivos que ingresaron al camal del Cantón Cayambe mediante el examen clínico patológico posmortem. Según medidas epidemiológicas, se determinó una prevalencia de 5,6 % de un total de 250 muestras. La probabilidad de contagio en el Riesgo Relativo a la enfermedad es de 16,86 veces más en el grupo de los expuestos y de 0,059 veces menor en los no expuestos. Asimismo, se identificaron inadecuadas prácticas de manejo en los ámbitos: sanitario, reproductivo, de alimentación y convivencia con animales positivos y reemplazos provenientes de ferias y haciendas que no constan con certificado sanitarios. De esta manera, se diagnosticaron lesiones anatomopatológicas posmortem en los animales faenados, presentando signos clínicos aparentes a la enfermedad en varios órganos, lo que corresponde a una prevalencia de 46,38 %, de un total de 511 bovinos, y se confirma así la presencia de Leucosis bovina en hatos lecheros en la comunidad Santo Domingo N° 1, y lesiones anatomopatológicas en animales faenados en camal.

Palabras clave: Leucosis bovina, linfocitos, linfa, retrovirus, prevalencia, Cayambe.

Abstract

In the parish of Ayora, Santo Domingo community N° 1 was carried out a serological diagnosis for the detection of Bovine Leucosis by means of the ELISA test. The objectives of the research were to determine the prevalence of the disease, the related risk factors, and estimate the number of positive cases occurring in the slaughterhouse of the Canton Cayambe; through a postmortem anatomopathological clinical examination. According to the epidemiological research a prevalence of 5.6 % of a total of 250 samples was determined. The probability of infection in the relative risk of the disease is 16.86 times more in the exposed group and 0.059 times less than in the unexposed group due to inadequate sanitary practices, reproductive management, nutrition, contact with positive animals and replacements from farms that do not hold health certificates. Postmortem pathological lesions were diagnosed, clinical signs of the disease were observed in various organs. A prevalence of 46.38 %, from a total of 511 animals confirmed the presence of bovine Leucosis in dairy herds in the community N° 1 of Santo Domingo, and pathologic lesions in slaughtered animals in the slaughterhouse.

Keywords: Bovine leucosis, lymphocytes, lymph, retrovirus, prevalence, Cayambe.

Forma sugerida de citar: Bonifaz, N. y F. Ulcuango. 2015. **Prevalencia de Leucosis Bovina en la comunidad Santo Domingo N° 1, Cayambe-Ecuador 2012**. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 33-39. ISSNp: 1390-3799, ISSNc: 1390-8596.

1. Introducción

La Leucosis Bovina LB es una enfermedad de distribución mundial y de largo periodo de incubación, que se presenta especialmente en ganado adulto y que tiene su mayor incidencia en los sistemas de producción de leche (Blood *et al.*, 1986). La infección se transmite en forma horizontal o por vía iatrogénica (Merck, 2007). Es una enfermedad infecciosa y contagiosa producida por un retrovirus tipo C, de alta morbilidad y baja mortalidad, que se caracteriza por la aparición de acumulaciones de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos, afectando principalmente el sistema linfático de los hatos lecheros (Olivia, 1990).

La ganadería es una de las principales actividades de un gran número de familias campesinas en la zona norte del cantón Cayambe. En este contexto fue necesario realizar un diagnóstico epidemiológico, para estimar la prevalencia de Leucosis Bovina y determinar los factores de riesgo que contribuyen a diseminar esta enfermedad en animales susceptibles en la zona de estudio; conjuntamente con la aplicabilidad de un plan preventivo y profiláctico de vigilancia epidemiológica.

De esta manera, se obtuvo información a nivel de camal y animales posmortem, mediante la identificación de lesiones anatomopatológicas como tumores, ganglios infartados, etc. causadas por esta enfermedad, y en órganos donde puede localizarse el retrovirus (VLB) ojos, ganglios mesentéricos e intercostales, corazón, pulmones, riñones, intestinos e hígado.

Asimismo, cabe indicar, que esta investigación se diseñó para obtener datos de prevalencia de la enfermedad en hatos lecheros de pequeños y medianos productores de las comunidades campesinas de la zona.

2. Materiales y Métodos

2.1 Población y muestreo

La población de referencia estuvo conformada por 1665 bovinos de diferentes edades y sexo pertene-

cientes a las 130 unidades productivas bovinas que conforman los 4 sectores lecheros de la Comunidad de Santo Domingo N° 1: III de Noviembre, El Bosque, Los Laureles y Central. Se tomaron 250 muestras serológicas, distribuidas en barrios, que representaron aproximadamente el 15 % de la población bovina.

2.2 Técnicas y herramientas

Se elaboró una encuesta epidemiológica para obtener información general y específica del manejo productivo y reproductivo de los bovinos de las unidades productoras. Una vez tabulada la información se analizaron los datos. A partir esta base, se estableció la cantidad de bovinos muestreados por categoría; y los factores de riesgos presentes visualizados en mapas temáticos detallados por sector (Figura 1). La información obtenida de las encuestas permitió establecer los factores de riesgo y su relación con la presencia de la enfermedad y los distintos indicadores epidemiológicos planteados en la investigación.

De cada animal seleccionado para el muestreo serológico, se extrajeron 9 mL de sangre, muestras que fueron enviadas al laboratorio de diagnóstico veterinario LIVEXLAB, donde sometieron las muestras a la prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), con la variante del test ELISA competitiva que se utiliza para la cuantificación de anticuerpos o de antígenos (Gomez, 2007). En este caso se establece una competencia por el antígeno entre los anticuerpos del suero problema y otros anticuerpos, de la misma especificidad, fijados a los pocillos de la placa. De esta forma, cuantas más inmunoglobulinas haya en la muestra menos antígeno habrá disponible para unirse a los anticuerpos adsorbidos a la placa. La adición de anticuerpo específico para el antígeno conocido, marcado enzimáticamente, y su reacción con el sustrato adecuado, revelan la existencia o no de antígeno libre, en una relación inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en el suero problema (Hernandez, 2010). Menor intensidad de color (DO) indica menos antígeno libre y, por tanto, mayor presencia de anticuerpos.

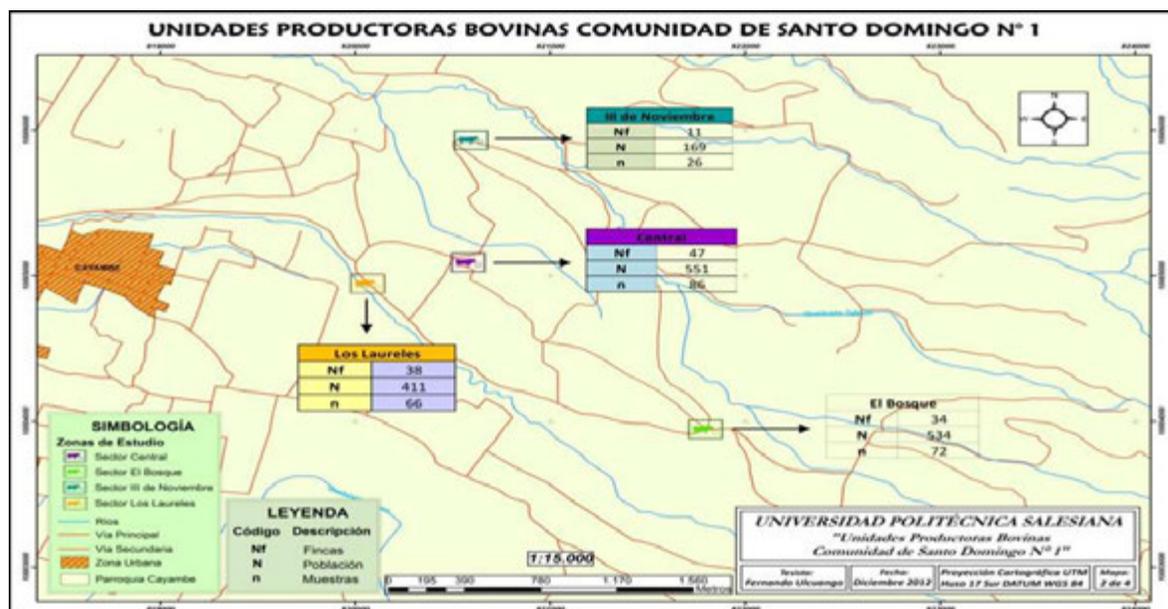


Figura 1. Ubicación de las unidades productoras bovinas (UPB), Número de fincas (Nf), población bovina (N) y número de muestras (n) recolectadas en los 4 sectores.

3. Resultados

3.1 Población muestreada, prevalencia aparente y riesgo relativo de la enfermedad

La población bovina por categorías que se muestreó en la comunidad de Santo Domingo N°1 fue la siguiente: 59 % fueron vacas (983 cabezas) en sus distintas etapas de producción o secado, el 21 % vaconas (348 cabezas), el 15 % terneras (259 cabezas), el 3 % terneros machos (43 cabezas), y un 2 % toros (32 cabezas), estos últimos utilizados para la monta con-

trolada en las fincas, distribuidos en los 4 sectores de la zona en estudio.

En la investigación, los casos positivos a Leucosis bovina se confirmaron mediante los análisis serológicos con el test de ELISA competitiva, prueba de laboratorio de alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos a LB. De 250 muestras 14 casos fueron confirmados positivos al retrovirus en los cuatro sectores (Tabla 1). La prevalencia aparente porcentual fue de: III de Noviembre $p = 3.85\%$, Central $p = 6.98\%$, Los Laureles $p = 7.58\%$, y El Bosque $p = 2.78\%$, ratificando que la infección en la población muestral de la comunidad es de 5.60% , aproximadamente el 15% del universo poblacional.

Tabla 1. Resultados de las muestras al test de ELISA competitiva en los cuatro sectores de la comunidad.

Santo Domingo N°1		Resultados			
Sector	N° de animales	N° de muestras	% de muestreo	Casos negativos	Casos positivos
III de Noviembre	169	26	15,38	25	1
Central	551	86	15,61	80	6
Los Laureles	411	66	16,06	61	5
El Bosque	534	72	13,48	70	2
TOTAL	1665	250	15,02	236	14

Tabla 2. Determinación del Riesgo Relativo (RR), Tasa reproductiva de base (Ro) en los sectores de la comunidad.

Sector	Riesgo relativo (RR)	Tasa Reproductiva de Base (Ro)
III de Noviembre	25	1,04
Central	13,33	1,08
Los Laureles	12,2	1,08
El Bosque	35	1,03

RR < 1 factor protector, RR = 1 Ausencia de riesgo, RR > 1 factor de riesgo
 Ro < 1 factor protector, Ro = 1 Ausencia de riesgo, Ro > 1 factor de riesgo

El indicador epidemiológico de riesgo relativo (RR) mide la fuerza de la asociación entre la exposición y la enfermedad; la tasa reproductiva base (Ro) determina el número de nuevos casos infectados que un individuo puede producir. Estos parámetros definen si en una enfermedad introducida a una población tendría proporciones epidémicas a futuro (Ron, 2011).

Cuando el resultado de estos indicadores es menor que 1 existe un factor protector en la población, si es igual a 1 la enfermedad tendrá un estado de equilibrio y si es superior a 1 se puede esperar el riesgo en proporciones epidémicas dentro de una determinada zona.

Los cuatro sectores de la comunidad presentaron RR > 1 y Ro > 1 (Tabla 2) debido a factores de riesgo como la utilización de agujas no desechables, inadecuada utilización de instrumentos quirúrgicos para las prácticas sanitarias, reproducción mediante monta directa, la procedencia de animales de reemplazo desde ferias o haciendas sin certificado sanitario, y la permanencia de animales positivos dentro del hato, contribuyendo a la probabilidad de que la enfermedad llegue a tener proporciones epidémicas a futuro en la comunidad, si no se toman medidas sanitarias apropiadas para su erradicación.

Debido a que la enfermedad no es prevenible mediante vacunación, la eliminación de casos positivos protege a la población susceptible, y disminuye la probabilidad de contagio de la enfermedad de forma eficiente y rápida (Giraudó *et al.*, 2010).

3.2 Manejo productivo, reproductivo y sanitario de los hatos bovinos

Del estudio realizado a nivel comunitario en las UPA's encuestadas, como resultado tenemos: a nivel de fincas productoras, un 89 % desconoce la en-

fermedad de la Leucosis Bovina su patología, sintomatología e etiología, y un 11 % tienen conocimientos básicos de la morbilidad y mortalidad, además de las manifestaciones clínicas que se producen en los animales, y las medidas higiénicas sanitarias que deberían tomarse para erradicar o mantener baja la prevalencia de la enfermedad.

Dentro de las prácticas sanitarias realizadas en la comunidad, es común la utilización de medicamentos para controlar enfermedades bacterianas y virales como: Fiebre Aftosa, Septicemia, Brucelosis, Mastitis, Neospora y Carunco Sintomático. Según encuestas realizadas en las UPAs de la comunidad, se detectó que los productores de leche utilizan agujas hipodérmicas para la aplicación de, vacunas en un 100 %, antibióticos 78 %, antiparasitarios 100 %, desinflamatorios 53 % y vitaminas 100 %.

El factor de riesgo más importante para la diseminación de la enfermedad dentro de la comunidad es que, el 14 % de los productores utilizan agujas reusables (metálicas) las cuales aumentan el riesgo de contagio a los animales susceptibles, mientras que el 86 % de los productores dentro de sus fincas productoras utilizan una aguja desechable por animal para los tratamientos. La utilización de una aguja desechable por cada animal para aplicar los medicamentos, es indispensable para reducir la probabilidad de transmisión de enfermedades contagiosas dentro de la población bovina (Giraudó *et al.*, 2010).

El origen de los animales de reemplazo para las UPA's es otro factor de riesgo. La mayoría de productores, crían sus propias terneras para el futuro reemplazo de las vacas productoras, mientras otros productores adquieren los animales de, ferias, fincas vecinas y otras haciendas (Figura 2). El riesgo de contagio de la enfermedad incrementa por la adquisición de animales sin los registros sanitarios correspondientes (Edifarm, 2009).



Figura 2. Procedencia de animales de reemplazo en la comunidad estudiada.

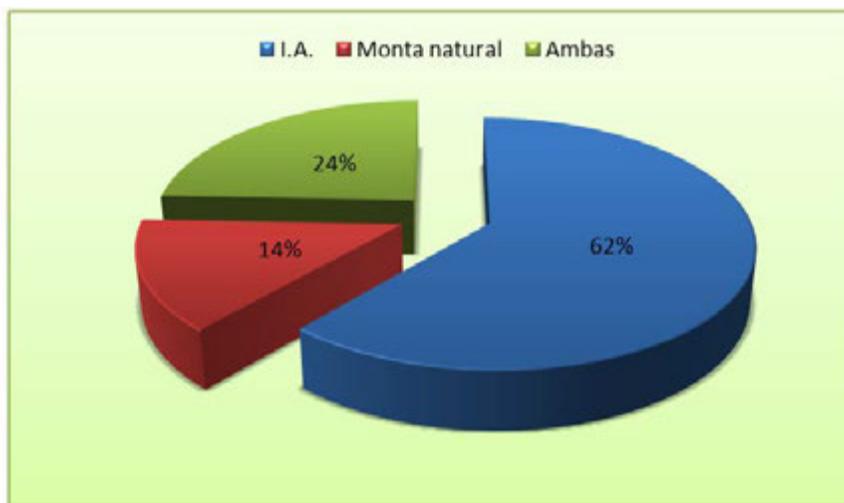


Figura 3. Manejo reproductivo determinado en las comunidades estudiadas.

En relación al manejo reproductivo de la UPA's se observó que la mayoría de productores realizan inseminación artificial IA, mientras otros combinan la IA con monta directa, y unos pocos recurren exclusivamente a monta directa (Figura 3). Este último manejo contribuye a la propagación de la infección por la utilización de toros positivos a LB. La confirmación de un macho de 2 años positivo a LB de la zona puede aumentar el riesgo a que la enfermedad se instale o sea recurrente en las fincas que emplean este modo de reproducción.

3.3 Prevalencia de Leucosis bovina a nivel de camal

De la investigación en las instalaciones del camal del Cantón Cayambe, se obtuvieron los siguientes resultados de prevalencia: de 511 bovinos que ingresaron a las instalaciones, 237 presentaron signos aparentes de la enfermedad entre machos y hembras, 274 casos no mostraron signos evidentes y la prevalencia real fue de 46,38 %.

Las lesiones anatomopatológicas posmortem encontradas en animales que ingresaron al camal (347 hembras y 164 machos) demostraron que 153 hembras y 84 machos presentaron signos patológicos de LB en distintos órganos.

Las lesiones anatomopatológicas en los órganos de los bovinos tuvieron la siguiente distribución: ganglios linfáticos adheridos al aparato digestivo (mesentéricos superiores e inferiores) con 69,6 % de presencia; en el hígado 15,2 % de tumores de tamaños variados desde 2 hasta 23 cm de diámetro, en pulmones 9,7 % de casos, en ganglios intercostales 2,4 % con la presencia de tumoraciones de 3 a 7 cm de diámetro, en riñón con presencia de 2,1 % de lesiones, en el corazón con el 0,7 %, y en los ojos 0,3 %. Según (Dubarry *et al.*, 1999) en un estudio realizado en Argentina, las lesiones por Leucosis Bovina se presentan en un 77 % en los ganglios linfáticos, 46 % en los riñones, 40 % en músculos, 33 % en estómago e hígado, 27 % en bazo, 17 % en corazón y tracto intestinal, 10 % en útero, 7 % en glándula mamaria y aproximadamente 3 % en la lengua.

Los resultados mostraron una mayor ocurrencia de las lesiones anatomopatológicas en hembras (153) en comparación con los machos (84). Se observó también que en 36 hembras y 8 machos se presentaron lesiones anatomopatológicas en varios órganos en el mismo animal. Las hembras bovinas son más susceptibles a adquirir la enfermedad que los machos, por lo tanto, las pérdidas económicas resultan en la merma de leche, el descarte de animales a temprana edad por la muerte de individuos con linfoma y además de descartes de canales en los mataderos.

4. Conclusiones y recomendaciones

La salud animal es uno de los factores que afecta la producción lechera en el sector norte del Cantón Cayambe. Es necesaria la prevención de enfermedades virales para mantener una prevalencia baja en los hatos lecheros. Los resultados obtenidos en la investigación indican que los factores que influyen en la diseminación de la enfermedad son: la forma de reproducción por monta natural, el uso de agujas hipodérmicas reusables para la aplicación de medicamentos veterinarios, y la procedencia de animales de reemplazo de ferias y haciendas sin certificados sanitarios. Estos factores presentan un potencial

riesgo para el contagio a animales susceptibles. Se requiere un mayor control sanitario a nivel de fincas por la alta prevalencia de signos anatomopatológicos encontrados en la fase de camal. La recomendación más importante es implementar un plan preventivo y profiláctico con vigilancia epidemiológica en los hatos ganaderos del sector.

5. Agradecimientos

Agradecemos a los pequeños y medianos productores de leche de la zona norte del cantón Cayambe, quienes prestaron sus animales y compartieron la información de sus UPAs desinteresadamente para realizar esta investigación.

Nuestro reconocimiento y gratitud a la Dra. Pamela Jaramillo del PROYECTO PROMETEO por su aporte científico en esta investigación.

Referencias

- Blood, D., J. Henderson y O. Radostits. 1986. **Medicina Veterinaria**. Nueva Editorial Interamericana, México D.F., 6 edición.
- Dubarry, J., A. Alvarez, A. Errea, O. Vera y V. Vespoli Pucheu. 1999. **Leucosis bovina enzootica: Situación de la enfermedad en el norte de la provincia de la pampa**. Anuario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, URL (<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n1999a40dubarry.pdf>).
- Edifarm. 2009. **Vademécum Veterinario**. Edifarm y Compañía, Quito, Ecuador, 10 edición.
- Giraudó, J., E. Bérnago, M. Schneider, G. Magnano, A. Macías, E. Sticotti y M. Mació. 2010. **Leucosis enzoótica bovina**. Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, URL (http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/24-leucosis_enzootica.pdf).
- Gomez, L. 2007. **Manual de inmunología veterinaria**. Prentice Hall, 1 edición.

- Hernandez, D. 2010. **Asociación de locus bola-drb 3.2 con el virus de la leucosis bovina en razas criollas y colombianas.** Proyecto Fin de Carrera, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia, an optional note.
- Merck. 2007. **El manual Merck de veterinaria.** Merck Manual, Océano, 6 edición.
- Olivia, G. 1990. **Leucosis bovina, un estudio sobre inmunidad humoral en vacas y terneras.** Revista Med. Vet, 75.
- Ron, J. 2011. **Modulo sanidad animal.** Informe técnico, ESPE, Maestría en Producción Animal, Quito.

ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO EN CEPAS DE *colletotrichum gloeosporioides* AISLADOS EN PLANTAS DE MANGO (*Mangifera Indica L.*)

STANDARDIZATION PROTOCOLS FOR EXTRACTING CHROMOSOMAL DNA OF *colletotrichum gloeosporioides* STRAINS ISOLATED IN MANGO PLANTS (*Mangifera indica L.*)

Luis Alberto Valdés¹, Adys Gómez², María Elena Carballo³, Maricela Capote²,
Ingrid González² y Rohde W.⁴

¹Universidad Politécnica Salesiana, Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid. Quito, Ecuador.

²Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Calle 7^{ma} número 5005 entre 30 y 32. Playa. La Habana, Cuba.

³Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 N°. 455 Vedado, Cuba

⁴Max Planck Institute for Plant Breeding Research (MPI). Carl-von-Linne-Weg 10, 50829 Köln, Alemania.

Autor para correspondencia: lvaldes@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 26 de enero de 2015. Aceptado, tras revisión, el 20 de noviembre de 2015.

Resumen

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc. es la especie responsable de la antracnosis en el mango; esta enfermedad afecta toda la parte aérea de la planta, produciendo pérdidas hasta de 12 % de la producción. La identificación y caracterización microbiana es importante para la toma de medidas de prevención y control del patógeno en plantaciones. Esta investigación tuvo como objetivo estandarizar protocolos de aislamiento de ADN genómico en cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., que garantice su calidad y concentración para futuros trabajos moleculares en diferentes representantes de esta especie fúngica. El aislamiento de ADN genómico se realizó por tres metodologías: CTAB Doyle y Doyle (1990); Kuramane-Izioka (1997), con modificaciones y CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) conjugadas con juegos de reactivos comerciales NucleoSpin. La calidad del ADN obtenido fue comprobada por absorbancia medida a 260 y 280nm. El primero de los métodos no resultó efectivo mientras que con los otros se obtuvo ADN genómico con la calidad y concentraciones adecuadas para investigaciones moleculares con la especie. Las modificaciones realizadas al método Kuramane-Izioka (1997), contribuyeron a la efectividad del mismo. El método CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) constituye el primer informe de su uso para representantes del reino Fungi.

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, ADN cromosómico, CTAB Doyle y Doyle; Kuramane-Izioka y CTAB California modificado por Ramirez *et al.*

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc. is responsible for anthracnose in mango, a disease that affects all aerial parts of the plant, causing losses of up to 12% of production. Microbial identification and characterization is important for determining prevention and pathogen control measure in plantations. This research aimed to standardize protocols for isolation of genomic DNA in strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., to ensure quality and concentration for future molecular studies in different representatives of this fungal species. Isolation of genomic DNA was performed by three methods: CTAB Doyle y Doyle (1990); Kuramane-Izioka (1997) with modifications and CTAB California modified by Ramirez et al., (2004) combined with NucleoSpin commercial reagent kits. The quality of the DNA obtained was tested by absorbance measurement at 260 and 280nm. The first method was not effective while the other methods yielded were obtained with genomic DNA with the appropriate concentrations for molecular research on the species. Modifications to the Kuramane-Izioka (1997) method, contributed to its effectiveness. The California CTAB method modified by Ramirez et al. (2004) constitutes the first report of its use for representatives of the Fungi kingdom.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, DNA chromosomal, CTAB Doyle y Doyle; Kuramane-Izioka and CTAB California modified by Ramirez et al.

Forma sugerida de citar: Valdés, L., A. Gómez, M. Carballo, M. Capote, I. González y W. Rohde. 2015. **Estandarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de *colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango (*Mangifera Indica L.*)**. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 40-49. ISSNp: 1390-3799, ISSNe: 1390-8596.

1. Introducción

Los hongos filamentosos del género *Colletotrichum* y su teleomorfo *Glomerella* son considerados los patógenos de plantas más ampliamente distribuidos a nivel mundial, causantes de la antracnosis. Esta enfermedad es común a numerosos cultivos económicos y plantas ornamentales, fundamentalmente en zonas húmedas y semihúmedas de la región comprendida entre los Trópicos (Araúz, 2000; Sangeetha y Rawal, 2008; Thaug, 2008).

La especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc. fase perfecta *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenk es la responsable de la antracnosis en el mango. Esta enfermedad en las plantaciones se manifiesta por la caída de la inflorescencia y la afectación de los frutos, hojas y ramas jóvenes. También aparece como una enfermedad poscosecha de los frutos maduros durante el almacenamiento (Sangeetha y Rawal, 2008).

El control de las enfermedades producidas por las especies del género *Colletotrichum*, representa un reto para el agricultor, donde la estrategia de protección preventiva, conjugada con las atenciones agronómicas a las plantaciones, son elementos indispensables para la obtención de más productividad en las cosechas. Por tanto, se hace necesario integrar medidas de manejo con el uso de alternativas ecológicamente sustentables para todos en general (Prusky *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2005; Lemus, 2009).

La caracterización de la diversidad microbiana y su utilidad para el diagnóstico, prevención y control de la antracnosis, han sido de los temas más importantes a debatir en la interacción planta-patógeno. El desarrollo de sistemas basados en marcadores moleculares constituye un campo de particular interés, al considerar que los métodos tradicionales microbiológicos relacionados con los estudios de patogenicidad y de detección en huéspedes son lentos y costosos (Alvarez *et al.*, 2006; Whitelaw *et al.*, 2007).

Debido a las problemáticas presentes en las investigaciones para la caracterización microbiológica adecuada, este trabajo tuvo como objetivo estandarizar protocolos de aislamiento de ADN genómico que permitan la obtención de esta molécula con la calidad y concentración requeridas para la caracterización de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc.

2. Materiales y Métodos

Se emplearon 25 cepas de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., pertenecientes a la micoteca del grupo de Micología del Departamento de Fitopatología del Instituto en Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), La Habana, Cuba.

El crecimiento de los aislados en Agar Papa Dextrosa (PDA) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante siete días, constituyó la base para la recolecta de la masa micelial cada 24 horas. Este procedimiento se realizó por centrifugación a $10\,000\ r \cdot \text{min}^{-1}$ (Cerón *et al.*, 2007) y secado en estufa. Las muestras se conservaron en frío a -20°C para el proceso de extracción del ADN genómico. Se colectaron tres repeticiones por cepa.

El aislamiento de ADN genómico se realizó por tres siguientes metodologías. La primera fue el método CTAB (hexadeciltrimetilamonio) Doyle y Doyle (1990); la segunda la propuesta por Kuramane-Izioka (1997) con las siguientes modificaciones: buffer de extracción sin adición de proteinasa K, la adición de PVP (Polivinilpirrolidona) al buffer, la incubación con isopropanol durante 24 horas a -20°C después del empleo de la mezcla de cloroformo isoamilalcohol (24:1) y el pellet resuspendido en buffer TE 1x y RNasa ($200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Incubación a 37°C durante una hora. Conservación del ADN extraído a -20°C . La tercera de las metodologías fue CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004).

Para la purificación se emplearon juegos de reactivos comerciales NucleoSpin (Macherey-Nagel, 2002) donde se mezclaron $50\ \mu\text{L}$ de ADN crudo con $300\ \mu\text{L}$ de Binding Buffer (NT) y se pasó por columnas de purificación. Se centrifugó a $10\,000\ r \cdot \text{min}^{-1}$ durante 2 min. Se lavó con $300\ \mu\text{L}$ Wash buffer (NT3) y se centrifugó a $10\,000\ r \cdot \text{min}^{-1}$ durante 2 min, lavado que se repitió dos veces. Se secaron las columnas en papel de filtro durante 15-20 minutos para eliminar cualquier resto de alcohol que pudo quedar en el interior. Se diluyeron en $30\ \mu\text{L}$ Elution Buffer (NE), previamente calentado a 60°C y se centrifugó a $10\,000\ r \cdot \text{min}^{-1}$ durante 1 min. Este paso se repitió tres veces hasta obtener un volumen final de $90\ \mu\text{L}$.

La calidad del ADN obtenido se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio, marcador de peso molecular GIBCO-BRL (1 Kb) y transiluminador ultravioleta. Las concentraciones C(ADN) se determinaron a partir de lec-

turas de absorbancia a 260 y 280 nm, mediante la fórmula:

$$C(ADN) = A \times 50 \times F.D$$

Donde la $C(ADN)$: Concentración de ADN; A : Lectura de absorbancia medida en espectrofotómetro y $F.D$: Factor de dilución (Ausubel *et al.*, 2005).

3. Resultados y Discusión

3.1 CTAB de Doyle y Doyle (1990)

En la Figura 1 se muestran los resultados del aislamiento de ADN de las 25 cepas donde se pudo apreciar que no resultó efectivo, ya que en ninguna de las muestras evaluadas se detectó la presencia de ácido nucleico en el gel de agarosa al 0,7 %. Estos

resultados no se corresponden con lo informado en la literatura, la que refiere el amplio uso de esta metodología en diferentes sistemas biológicos (Brusés *et al.*, 2012; Ausubel *et al.*, 2005; Rodríguez, 2010).

La ineffectividad de este método, puede estar dada por varios factores: la digestión no exitosa de la pared celular y membranas celulares de las hifas; la formación de complejos insolubles entre componentes estructurales y metabolitos celulares con los ácidos nucleicos a consecuencia de la lisis por maceración en frío, durante el proceso de aislamiento; la poca conjugación y/o interacción entre la estructura química de las células fúngicas y las sustancias que conforman el buffer de extracción (CTAB, PVP, β -mercaptoetanol, etc.) y concentración de los compuestos químicos activos dentro del buffer de extracción y su ineffectividad en las funciones que realizan (Suenaga, 2005).

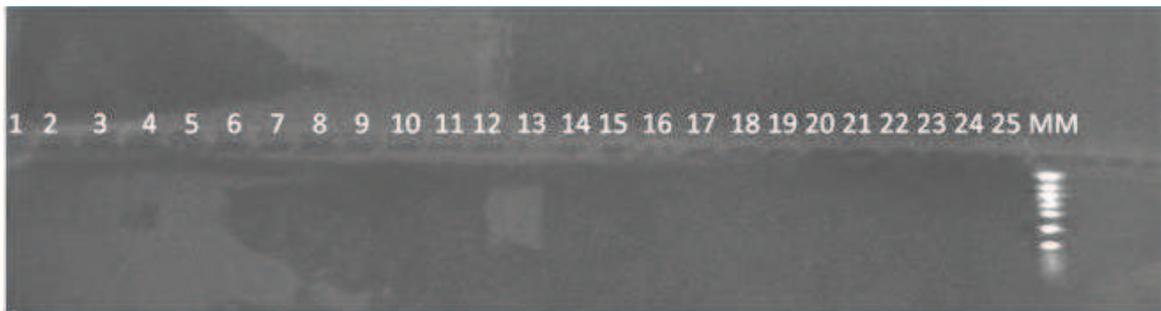


Figura 1. Imagen del gel de electroforesis de las muestras de ADN de los aislados fúngicos extraído por el método CTAB de Doyle y Doyle (1990). (MM= marcador de peso molecular 1Kb GIBCO-BRL).

Vale destacar que la ineffectividad de este método, por la incidencia de los factores anteriormente planteados, puede estar fundamentada, entre otras causas, en la composición química de la pared celular de los miembros de este género. Esta estructura está formada por capas o estratos, constituido por diferentes polímeros de polisacáridos fibrilares, como la quitina (polímero β -1,4 de N-acetilglucosamina), la celulosa (polímero β -1,4 de glucosa), glucanos (polímero β -1,6 ramificados de glucosa) y mananos (polímero β -1,6 ramificados de manosa) además, de proteínas asociadas a los poli-

sacáridos y lípidos (Prusky *et al.*, 2001; Wharton y Diéguez, 2004; Peres *et al.*, 2005), componentes que pudieran limitar diferentes etapas del método.

3.2 Kuramane-Izioka (1997) modificado

Los resultados obtenidos por este método se muestran en la Figura 2, donde se aprecian bandas fluorescentes correspondientes al ADN genómico de los aislados con una talla molecular en correspondencia con el marcador molecular.

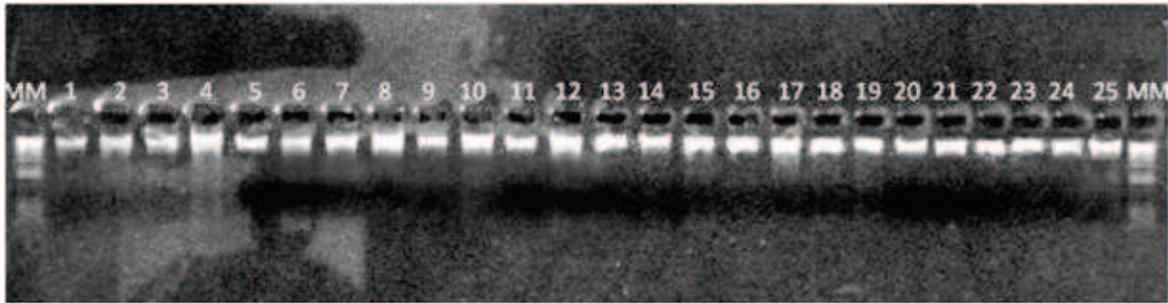


Figura 2. Imagen del gel de electroforesis de las muestras de ADN de los aislados fúngicos extraído por el método Kuramane-Izioka (1997) modificado en combinación con el juego de reactivos NucleoSpin. MM= marcador de peso molecular 1Kb GIBCO-BRL).

La acción de los componentes del tampón de extracción tributó favorablemente a los resultados. El uso de PVP (Polivinilpirrolidona) en el buffer pudo prevenir la actividad de polifenoloxidasas presentes en algunos tejidos de los organismos (Rogers y Bendich, 1988; Ramirez *et al.*, 2004). Esto se sustenta en la no detección de cambio de coloración en el sobrenadante que contenía el ADN por la acción de estas enzimas.

Otra de las modificaciones aportadas en esta investigación fue la incubación a bajas temperaturas (-20°C) con isopropanol, por 12 h. Estas condiciones pudieron posibilitar la separación de las moléculas proteicas, lo que permite la obtención de un pellet más libre de impurezas. Además, el uso de RNasa permite sugerir su contribución en la degradación de ARN, molécula frecuentemente contaminante del ADN. De esta manera no resultó necesario

la adición de proteinasa K (Weir *et al.*, 1996; Suárez, 2005; Campa *et al.*, 2010).

3.3 CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004)

Los resultados que se muestran en la Figura 3 permitieron detectar bandas fluorescentes de ADN, correspondientes a las muestras de los 25 aislados fúngicos, con una talla molecular superior a 12 (216 pb). A partir de estos resultados fue posible corroborar la efectividad de este método en comparación con el método Kuramane-Izioka (1997) modificado. Consecuentemente, se sustenta la aplicación del método CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) para la extracción del ADN genómico en especies de hongos, lo que anteriormente no ha sido informado en la literatura especializada.

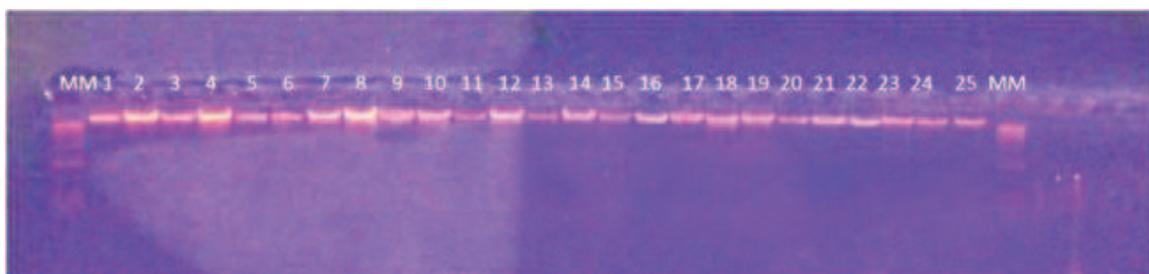


Figura 3. Imagen del gel de electroforesis de las muestras de ADN de los aislados fúngicos extraído por el método CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) en combinación con el juego de reactivos NucleoSpin. MM= marcador de peso molecular 1kb GIBCO-BRL).

A la eficiencia tributó la composición del tampón de extracción, rico en compuestos como: el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); el ácido dietilditiocarbámico (DIECA), ascorbato de sodio y bisulfito de sodio, que reaccionan con los polifenoles, oxidándolos y formando un precipitado que por centrifugación puede eliminarse del sobrenadante. Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, por lo que son muy reactivos (Rogstad *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; Gutiérrez, 2002).

La eficiencia de la extracción del ADN por el método CTAB California ha sido confirmada en el reino *Plantae*, en el aislamiento de ADN de calidad a partir del aguacatero y del guayabo, con las aplicaciones de las modificaciones realizadas por Ramirez *et al.* (2004). Este mismo año fue empleado en muestras de diferentes miembros del género *Pouteria* (Carrara *et al.*, 2004).

Los resultados positivos del aislamiento del ADN genómico de cepas fúngicas de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., presentados en este trabajo pueden ser atribuidos a los componentes del tampón de extracción, tales como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); el ácido dietilditiocarbámico (DIECA), el ascorbato de sodio, así como el bisulfito de sodio. Estos compuestos provocan la oxidación de los polifenoles y la formación de un precipitado, que puede ser eliminado por centrifugación. Los grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas que contienen el conjunto heterogéneo de moléculas que conforman los polifenoles, son los que permiten la interacción de estos con los componentes del tampón (Rogstad *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; Gutiérrez, 2002).

En adición a lo anterior, es importante considerar que la acción del CTAB como detergente propicia la destrucción de las membranas celulares, durante la maceración del material. Además, se enlaza fuertemente al ADN y lo protege de la degradación. Otras funciones del CTAB están relacionadas con el desplazamiento de proteínas y la solubilización de polisacáridos (Csai *et al.*, 1998; Huescas, 2004).

Otro componente del tampón de extracción es el compuesto Polivinilpirrolidona (PVP) que formar complejos con los polifenoles, a través de enlaces por puente de hidrógeno. Estos complejos son separados del ADN por centrifugación en presencia

de cloroformo, lo que permite la obtención de un producto final con menos impurezas (Porebski *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 2002). Las potencialidades de la combinación de CTAB y PVP como agentes antioxidante para la eliminación de compuestos fenólicos y polisacáridos, ha sido fundamentada en trabajos previos (Weir *et al.*, 1996; Gutiérrez, 2002).

En el análisis de la efectividad del CTAB y del PVP en la eliminación de polisacáridos celulares, es válido considerar que son los contaminantes mayoritarios del proceso de aislamiento y purificación del ADN (Huescas, 2004), por constituir componentes de pared celular de los hongos. Esta estructura puede estar conformada por quitina, celulosa, glucanos y mananos, lo que indica la variedad de polisacáridos en su composición. La separación de estos contaminantes de la muestra de ADN, es también favorecida por los lavados con cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y por las altas concentraciones de sales (NaCl) presentes en el tampón de extracción (Sharma *et al.*, 2000; Drábková *et al.*, 2002).

3.3.1 Calidad del ADN extraído

La Tabla 1 muestra la relación entre la absorbancia 260/280 nm para los métodos de extracción de ADN genómico de las cepas fúngicas, que resultaron efectivos. La selección del tiempo para colectar la biomasa se basó en insuficiente crecimiento micelial antes de los tres días de incubación.

Los valores extremos de la relación entre la absorbancia con el método California modificado por Ramírez *et al.*, (valor máximo: 1.9198 y valor mínimo: 1.6016), así como con el método Kuramane-Izioka (1997) modificado (valor máximo: 1.8947 y valor mínimo: 1.6510) fueron obtenidos al tercer día en aislados diferentes. No existieron diferencias significativas entre estos valores en ambos métodos conociendo que para el estudio siempre se contó con la misma biomasa desde el tercero hasta el séptimo día de trabajo, lo que puede ser explicado por las características de la biomasa que una vez alcanzada el estadio fisiológico de máxima síntesis de ADN, este se mantuvo constante a partir de los tres días durante el tiempo de incubación y de muestreo (7 días).

La relación de absorbancia, 260/280 nm establece una medida cualitativa de la pureza del ADN, cuando los valores están entre 1.6 y 2.0. Una relación menor indica contaminación con proteínas o fenoles y valores superiores a 2.0 significa que hay ARN

disperso (Doulis *et al.*, 2000; Brusés *et al.*, 2012). Al tener en cuenta que los valores mínimos y máximos de absorbancia, detectados en las muestras de ADN de los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*, se encuentran en este rango es posible inferir la cali-

dad del ADN extraído por los métodos Kuramane-Izioka (1997) modificado y CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004). De esto se deduce que ambos métodos son confiables y efectivos en diferentes cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tabla 1. Relación de las absorbancias a 260 y 280nm de las muestras de ADN extraídas por el método de CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) y Kuramane-Izioka (1997) modificado.

Aislados	Tiempo de colecta de la biomasa (días)									
	CTAB California					Kuramane-Izioka				
	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
LA 1	1.7744	1.7480	1.6720	1.7518	1.7448	1.8210	1.7832	1.8212	1.7518	1.7448
LA 2	1.9198	1.7810	1.7370	1.6880	1.6781	1.7900	1.7562	1.7215	1.6880	1.6781
LA 3	1.6821	1.7830	1.8210	1.7712	1.7183	1.6510	1.7745	1.7453	1.7712	1.7183
LA 4	1.7563	1.7680	1.7470	1.6660	1.8680	1.7610	1.8333	1.8236	1.6660	1.8680
LA 5	1.7518	1.8800	1.6932	1.6754	1.8238	1.7245	1.8235	1.8129	1.6754	1.8238
LA 6	1.6016	1.7580	1.7071	1.8021	1.7258	1.7777	1.8123	1.8745	1.8021	1.7258
LA 7	1.7875	1.8160	1.6977	1.7929	1.8116	1.8111	1.8003	1.8245	1.7929	1.8116
LA 8	1.7600	1.6880	1.7127	1.7591	1.6588	1.8456	1.8553	1.8001	1.7591	1.6588
LA 9	1.7739	1.8250	1.8005	1.7386	1.8025	1.7821	1.7893	1.8078	1.7386	1.8025
LA 10	1.7442	1.7780	1.8215	1.7553	1.7678	1.8561	1.7777	1.7856	1.7553	1.7678
LA 11	1.7621	1.7823	1.6988	1.8253	1.7812	1.7901	1.8343	1.8814	1.8253	1.7812
LA 12	1.7951	1.7832	1.7564	1.7680	1.7833	1.7864	1.8193	1.8675	1.7680	1.7833
LA 13	1.7392	1.7843	1.7712	1.7814	1.7844	1.6999	1.8813	1.8560	1.7814	1.7844
LA 14	1.7579	1.7756	1.7227	1.7923	1.7766	1.8451	1.8334	1.8234	1.7923	1.7766
LA 15	1.7600	1.6989	1.8102	1.7743	1.6919	1.8481	1.8457	1.7699	1.7743	1.6919
LA 16	1.7929	1.7882	1.8033	1.7766	1.7883	1.8135	1.8605	1.8281	1.7766	1.7883
LA 17	1.7591	1.7845	1.7740	1.6989	1.7346	1.8068	1.8564	1.8281	1.6989	1.7346
LA 18	1.7386	1.7825	1.7600	1.7882	1.7908	1.8947	1.8326	1.8453	1.7882	1.7908
LA 19	1.7553	1.7680	1.7770	1.7845	1.7568	1.7415	1.8490	1.8001	1.7845	1.7568
LA 20	1.7292	1.7830	1.7670	1.7825	1.7883	1.8208	1.8342	1.8417	1.7825	1.7883
LA 21	1.7832	1.7840	1.7670	1.7834	1.7864	1.8387	1.8407	1.8497	1.7834	1.7864
LA 22	1.7719	1.7680	1.7870	1.7854	1.7628	1.8117	1.8251	1.7807	1.7854	1.7628
LA 23	1.7930	1.7380	1.7270	1.6890	1.7368	1.8296	1.8495	1.8479	1.6890	1.7368
LA 24	1.7630	1.7865	1.7700	1.6989	1.7867	1.8403	1.8385	1.7956	1.6989	1.7867

3.3.2 Determinación de la concentración de ADN genómico

La Figura 4 muestra la media de las concentraciones calculadas para ambos métodos de extracción.

Desde el tercer día de incubación se contó con la cantidad suficiente de ADN para la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), la que requiere de concentraciones en el rango de los 20 a 25 ng.ml⁻¹ Esto coincide con investigaciones pre-

cedentes con *Colletotrichum* spp., aisladas de fresa (Denoyes-Rothan *et al.*, 2003), guanábana (Alvarez *et al.*, 2006) y mango (Gupta *et al.*, 2010).

Ausubel *et al.* (2005) refirió que la concentración de ADN en diferentes muestras puede variar de

acuerdo a tres factores fundamentales: pureza, características de la molécula (dimensión y/o espacialidad) y tipo de polimerasa a emplear en los procedimientos moleculares. Por lo que se hace necesario y aconsejable estandarizar la técnica siempre, que sea posible.

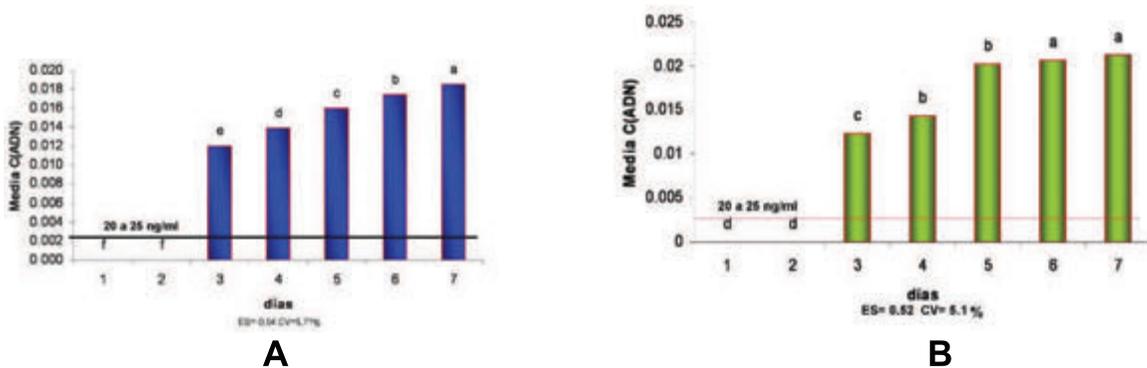


Figura 4. Medias de las concentraciones calculadas por la Ley de Beer, para ambos métodos (A- CTAB California y B- Kuramane-Izioka) (Letras indican diferencia significativa a $p \leq 0.01$).

4. Conclusiones

El método CTAB de Doyle y Doyle (1990) no fue efectivo para la extracción de ADN genómico en cepas del género *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, aisladas de mango por las características propias de las paredes celulares de los hongos filamentosos y la composición de la solución de extracción. Las modificaciones realizadas al método de extracción de ADN, Kuramane-Izioka (1997) y el método CTAB California, propuesto por Ramirez *et al.* (2004) constituyen herramientas confiables y eficientes en la obtención de material genético de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. con la calidad y concentración adecuada, por lo que pueden ser utilizados en la caracterización de esta especie fúngica.

Referencias

Alvarez, E., J. Mejía, G. Llano y J. Loke. 2006. **Characterization of colletotrichum gloeosporioides, causal agent of anthracnose in sour sop (annona muricata) in valle del cauca.** Poster: International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

Araúz, L. 2000. **Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management.** Plant Diseases, 84(6): 600–611.

Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith y K. Struhl (editores). 2005. **Current Protocols in Molecular Biology**, tomo 1-4. Greene & John Wiley, New York, E.E.U.U.

Brusés, B., H. Lucero, M. Aguirre y J. Gorodner. 2012. **Comparación de técnicas de extracción de dna para la detección de trypanosoma cruzi mediante la técnica de pcr.** URL <www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf>.

Campa, A., E. Pérez, C. Rodríguez, R. Giradles y J. Ferreira. 2010. **Diseción genética de la resistencia a antracnosis en las variedades diferenciales de judía común tu y mdrk.** HortScience, 39(6): 1196–1207.

Carrara, S., R. Campbell y R. Schnell. 2004. **Genetic variation among cultivated selections of mamey sapote (pouteria spp. [sapotaceae]).** Proc. Fla. State Hort. Soc., 117: 195–200.

Cerón, L., B. Higuera, J. Sánchez, S. Bustamante y G. Buitrago. 2007. **Crecimiento y desarrollo de**

- colletotrichum gloeosporioides f. alatae durante su cultivo en medios líquidos.** Acta Biológica Colombiana, 11(1): 99–109.
- Csaikl, U., H. Bastian, R. Brettschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, F. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam y B. Ziegenhagen. 1998. **Comparative analysis of different dna extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant dna for genetic evaluation and phylogenetic studies.** Plant Molecular Biology Reporter, 16(1): 69–86, doi:10.1023/A:1007428009556, URL (<http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1007428009556>).
- Denoyes-Rothan, B., G. Guérin, C. Délye, B. Smith, D. Minz, M. Maymon y S. Freeman. 2003. **Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of colletotrichum species from strawberry.** Phytopathology, 93(2): 219–228.
- Doulis, A., A. Harfouche y F. Aravanopoulos. 2000. **Rapid, high quality dna isolation from cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the rapid marker technique.** Plant Molecular Biology Reporter, 17: 1–14.
- Doyle, J. y J. Doyle. 1990. **Isolation of plant dna from fresh tissue.** Focus, 12(1): 13–15.
- Drábková, L., J. Kirschner y Ā. Vlĕk. 2002. **Comparison of seven dna extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of juncaceae.** Plant Molecular Biology Reporter, 20(2): 161–175, doi:10.1007/BF02799431, URL (<http://dx.doi.org/10.1007/BF02799431>).
- Gupta, V. K., A. Pandey, P. Kumar, B. K. Pandey, R. K. Gaur, V. Bajpai, N. Sharma y S. Sharma. 2010. **Genetic characterization of mango anthracnose pathogen colletotrichum gloeosporioides penz. by random amplified polymorphic dna analysis.** African Journal of Biotechnology, 9(26): 4009–4013, doi:10.5897/AJB2010.000-3278.
- Gutiérrez, A. 2002. **Vino, polifenoles y protección a la salud.** Revista Cubana Aliment Nutr, 16(2): 134–141.
- Huescas, M. 2004. **Comparación de diferentes técnicas de extracción de adn aplicadas a quercus eduardii trel.**
- Kuramane-Izioka, E. 1997. **A rapid, easy and high yield protocol for total genomic dna isolation from colletotrichum gloeosporioides and fusarium oxysporum for rapid.** UNIMAR, 19(3): 683–689.
- Lemus, Y. 2009. **Genética de la resistencia a las enfermedades en plantas hortícolas.** Temas de Ciencia y Tecnología, 13(39): 41–44.
- Macherey-Nagel. 2002. **NucleoSpin® Extract II Kits.** Clontech Laboratories Inc., Germany.
- Peres, N. A., L. W. Timmer, J. E. Adaskaveg y J. C. Correll. 2005. **Lifestyles of colletotrichum acutatum.** Plant Disease, 89(8): 784–796, doi:10.1094/PD-89-0784.
- Porebski, S., L. Bailey y B. Baum. 1997. **Modification of a ctab dna extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components.** Plant Molecular Biology Reporter, 15(1): 8–15, doi:10.1007/BF02772108.
- Prusky, D., J. McEvoy, B. Leverentz y W. Conway. 2001. **Local modulation of host ph by colletotrichum species as a mechanism to increase virulence.** Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(9): 1105–1113, doi:10.1094/MPMI.2001.14.9.1105.
- Ramirez, I., N. Rodríguez, J. Valdés-Infante, M. Capote, D. Becker y W. Rohde. 2004. **Isolation of genomic dnas from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for pcr-based dna marker application.** Cultivos Tropicales, 25(1): 33–38.
- Rodríguez, G. 2010. **Técnicas de extracción y análisis de ácidos nucleicos de patógenos de plantas.** Manual de la asignatura optativa especializada. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Rogers, S. y A. Bendich. 1988. **Extraction of dna from plant tissues.** En: Gelvin, S. y R. Schilperoort (editores), **Plant Molecular Biology Manual**, tomo A6, pp. 1–10, Kluwer Academic, Boston.
- Rogstad, S., B. Keane, C. Keiffer, F. Hebard y P. Sisco. 2001. **Dna extraction from plants: The use of pectinase.** Plant Molecular Biology Reporter, 19(4): 353–359, doi:10.1007/BF02772833.

- Sangeetha, C. y R. Rawal. 2008. **Nutritional studies of colletotrichum gloeosporioides (penz.) penz. and sacc. the incitant of mango anthracnose.** African Journal of Biotechnology, 9(21): 3086–3090.
- Sharma, A., P. Gill y P. Singh. 2002. **Dna isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants.** Plant Molecular Biology Reporter, 20(4): 415, doi:10.1007/BF02772129.
- Sharma, K., M. Lavanya y V. Anjaiah. 2000. **A method for isolation and purification of peanut genomic dna suitable for analytical applications.** Plant Molecular Biology Reporter, 18(4): 393, doi: 10.1007/BF02825068.
- Suenaga, H., E. y Nakamura. 2005. **Evaluation of three methods for effective extraction of dna from human hair.** Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the Biomedical and Life Science, 820: 137–141.
- Suárez, L. 2005. **Extracción y purificación del adn de moniliophthora roreri, hongo que ataca el cacao, en norte de santander.** Revista Respuestas Universidad Francisco de Paula Santander, 10(2): 4–8.
- Thaung, M. 2008. **Coelomycete systematics with special reference to colletotrichum.** Mycoscience, 49(6): 345–350, doi:10.1007/s10267-008-0432-6, URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-008-0432-6>.
- Weir, B., P. Pierre y N. Chibbar. 1996. **Isolation of dna for rapid analysis from leaves of the saskatoon (amelanchier alnifolia nutt) and other horticultural crops.** Canadian Journal of Plant Science, 76: 819–824.
- Wharton, P. y J. Diéguez. 2004. **The biology of colletotrichum acutatum.** Anales del Jardín Botánico de Madrid, 61(1): 3–22.
- Whitelaw, M., S. Curtin, R. Huang, C. Steel, C. Blanchard y P. Rofey. 2007. **Phylogenetic relationships and pathogenicity of colletotrichum acutatum isolates from grape in subtropical australia.** Plant Pathol, 56: 448–463.
- Xiang, Y., Z. Xian y F. Chen. 2002. **Rapid extraction of genomic dna from leaves and bracts of dove tree (davidia involucrata).** Plant Molecular Biology Reporter, 20: 185.

DESARROLLO DE LA PITAHAYA (*Cereus* SP.) EN ECUADOR

DEVELOPMENT OF PITAHAYA (*Cereus* SP.) IN ECUADOR

Laura Huachi, Elizabeth Yugsi, María Fernanda Paredes, Daniel Coronel, Karla Verdugo y Pablo Coba Santamaría

Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI. Universidad Politécnica Salesiana. Av. 12 de Octubre N24-22y Wilson. Bloque B. Tercer Piso. Telfs. 593 02 3962800.

Autor para correspondencia: lhuachi@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 12 de septiembre de 2014. Aceptado, tras revisión, el 7 de diciembre de 2015.

Resumen

La pitahaya (*Cereus* sp.) es una fruta exótica tropical, ampliamente distribuida en América e incluso presente en el continente Asiático. En Ecuador se encuentra en provincias como Pichincha, Morona Santiago y Loja. Es un arbusto trepador cuyo fruto es una baya de atractivo sabor. Se conoce que esta planta ha sido empleada como cerca viva o de forma ornamental por sus características morfológicas, sin embargo sus características nutricionales han tomado más realce en la última década ya que le atribuyen la propiedad de ser un fruto alimenticio completo. Las más relevantes, su alto contenido en bioflavonoides y la concentración de ácidos grasos, además de fibra, minerales y vitaminas los mismos que presentan efectos cardiotónicos y coadyuvantes en problemas gastrointestinales. Lamentablemente en el país se han generado escasos estudios acerca de los beneficios de esta fruta, debido a la competencia comercial con otros frutos aparentemente de mayor interés como el banano, tomate de árbol y cacao.

Palabras clave: pitahaya, *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C Weber) Buxb, ácidos grasos, bioflavonoides.

Abstract

The pitahaya (*Cereus* sp.) is an exotic tropical fruit, widely distributed in America and even present in the Asian continent. In Ecuador is located in the provinces of Pichincha, Morona Santiago and Loja. It is a climbing shrub whose fruit is a berry with a taste appeal. It is known that this plant has been used as a living fence or ornamental form by their morphological characteristics, however the nutritional characteristics have taken more prominence in the last decade because has been found that the fruit shows the property of being a complete nutritional food. The most important characteristic is its high content in bioflavonoids and concentration of fatty acid plus fiber, minerals and vitamins showing adjuvant effects on cardiac and gastrointestinal problems. Unfortunately few studies about the benefits of this fruit have been carried out in the country. In fact, the lack of research study by national researchers is due to the commercial competition with other fruits apparently more interesting such as banana, tree tomato and cacao.

Keywords:

Forma sugerida de citar: Huachi, L., E. Yugsi, M.F. Paredes, D. Coronel, K. Verdugo y P. Coba Santamaría. 2015. **Desarrollo de la pitahaya (*Cereus* sp.) en Ecuador.** La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 50-58. ISSNp: 1390-3799, ISSNc: 1390-8596.

1. Introducción

América Latina cuenta un sin número de recursos endémicos, que han sido empleados frecuentemente en el último siglo con la finalidad de mejorar la calidad de vida, y se han clasificado según la utilidad que podrían generar en maderables, medicinales o comestibles.

Dentro de los productos comestibles se encuentran los productos hortofrutícolas que en la última década han sufrido transformaciones y cambios en el mercado internacional, estos se atribuyen a las dinámicas que se han presentado a nivel del consumo, de tal manera los mercados externos se han caracterizado por su creciente diversidad, ampliando con esto las oportunidades comerciales para los países exportadores y generando alternativas de trabajo en las áreas rurales (Sánchez *et al.*, 2006; Tafur *et al.*, 2006).

Son pocas las frutas que se conoce, forman parte la dieta diaria, sin embargo la variedad de estos alimentos es muy amplia, entre los frutos que han tomado realce en la última década se nombra a la pitahaya. El origen de esta fruta es incierto ya que varios autores mencionan los diferentes lugares en los que está distribuida, principalmente en países como México, Guatemala, Costa Rica, Ecuador y Colombia. Según el país de origen esta adopta varios nombres como: reina de noche, flor de cáliz (Fuentes, 2012), pitaya, pithalla, pitajalla, las mismas que derivan de la lengua Antillana que significa fruta "escamosa" (González, 2006).

En el Ecuador originalmente se han cultivado varias especies de pitahayas introducidas desde Colombia, pero hace algunos años se identificó la especie *Cereus sp.* (Cactaceae) registrada por el Banco Central del Ecuador (Banco Central del Ecuador, 2012) nativa en el sector del Cantón de Palora, Provincia Morona Santiago (Cobos, 2007); de acuerdo a la recolección botánica realizada en el cantón Nane-gal provincia de Pichincha, las muestras de pitahaya recolectadas fueron identificadas y certificadas por el Herbario de la Universidad Católica del Ecuador (PUCE), determinando que la especie corresponde a *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C Weber) Buxb, misma que es un sinónimo de la especie *Cereus queretaroensis* F.A.C. Weber ex Mathes, (The Plants List, 2013). Actualmente este cultivo se produce en un promedio de 50 hectáreas a nivel nacional (El Comercio, 2012).

El cultivo de la pitahaya requiere de factores ambientales especiales, esta se puede desarrollar en sectores específicos de Ecuador ya que le proporcionan características edáficas y climáticas ideales que inciden directamente en la calidad de la fruta. Este cultivo exige un clima sub cálido húmedo, temperatura ambiente, una humedad relativa que supere el 50 % y una formación ecológica de bosque húmedo montano bajo (ECOFINSA, 2008).

Por medio de estudios realizados en varios países, se han logrado conocer algunas de las propiedades que presenta la pitahaya para el organismo, mismas que le confieren características de ser una fruta completa por sus cualidades alimenticias y su composición nutricional, en los que se destaca la presencia de antioxidantes especialmente las betacianinas y betaxantina (Esquivel y Araya, 2012; Jamilan *et al.*, 2011), además de su aporte protéico y fundamentalmente por su contenido de fibra y un conjunto de ácidos grasos poli-insaturados.

Con el fin de desarrollar una apertura más amplia y diversificación en el mercado internacional, entidades públicas como PRO ECUADOR y el Ministerio de Comercio Exterior han implementado alternativas como ferias y boletines en Países de Asia y la Unión Europea, para dar a conocer la pitahaya como una fruta con alto potencial de comercialización e industrialización.

2. Origen

A nivel mundial la familia de la Pitahaya está constituida por cerca de 2000 especies las mismas que se encuentran distribuidas en el continente Americano y Asiático (Jiménez, 2011), en Asia la pitahaya se presenta en países como Vietnam, Malaysia, Tailandia y Taiwán principalmente. Esta familia originaria de América Latina posee gran diversidad y endemismo, está presente en países como México, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Brazil, Colombia y Ecuador (Mandujano *et al.*, 2002; Delgado, 2010; FAO-PRODAR, 2006) (Ver Figura 1).

Solo en México se han registrado 55 géneros y 850 especies. Debido a la gran importancia que ha generado la producción de esta fruta en dicho país, se han realizado estudios que han demostrado que la variabilidad entre especies es relativamente baja y la presencia de esta fruta en otros países se debe a la distribución del germoplasma por grupos humanos y aves (Mandujano *et al.*, 2002).



Figura 1. Distribución de Pitahaya en América y Asia. Elaborado por las autoras sobre mapa base (IBGE, 23 de Junio de 2013).

Muchas especies de esta familia se han denominado genéricamente como “Pitahaya” debido a la similitud en sus características morfológicas, lo que ha hecho que su clasificación botánica sea mucho más compleja. Se destacan dentro de esta especie cuatro géneros representativos *Stenocereus* sp., *Selenicereus* sp., *Hylocereus* sp., *Cereus* sp. (Le Bellec *et al.*, 2006).

En Ecuador no se ha dado mucha importancia a esta Cactácea, motivo por el cual la información acerca de su origen es muy limitada, sin embargo se conoce la presencia de la pitahaya amarilla (*Cereus* sp.) con una variante que presenta las mismas características conocida también como pitahaya amarilla (*Hylocereus* sp.) en provincias como: Pichincha, Morona Santiago y Loja (Rios y Borgtoft Pedersen, 1997) (Ver Figura 2).

3. Descripción Botánica

La pitahaya (*Cereus* sp.) pertenece al Reino Plantae, Clase Angiospermae, Subclase Dicotyledoneae, Or-

den Opuntiales, Familia Cactaceae, Nombre Científico *Cereus* sp. Con su variante *Hylocereus* sp. La altitud óptima para este tipo de plantas se encuentra entre los 800 - 1850 msnm, con temperaturas que fluctúan entre 18°C y 25°C, se adapta a suelos bien drenados con pH ligeramente ácido de 5.5 - 6.5, se desarrolla en ambientes cálidos húmedos y reacciona positivamente a la intensidad lumínica (ECORAE *et al.*, 2001).

Es una cactácea trepadora, perenne, de tipo arbustivo puede llegar a medir 2 m, la misma que se presenta en aureolas y sus cladodios se extienden entre 0.50 y 1.50 m de largo y de ancho 0.03 - 0.06 m, su margen es dentado y en sus terminales se disponen coronas de espinas que miden 0.01 metros (ECORAE *et al.*, 2001).

Los cladodios de la pitahaya presentan entre tres a cinco aristas lo que le confiere un aspecto triangular. Crece de forma silvestre sobre árboles, roca, piedras, troncos y muros; para cultivo se la establece sobre guías que ayudan como estructura para su crecimiento (Ver figura 3).



Figura 2. Distribución de Pitahaya en Ecuador. Elaborado por las autoras sobre mapa base CODESCO.



Figura 3. De izquierda a derecha: A. Flor de pitahaya vista lateral; B. Flor de pitahaya vista frontal; C. Tallos aureolados con cladodio suculentos; D. Fruto de pitahaya. Elaborado por Elizabeth Yugsi y Ma. Fernanda Paredes.

La flores son hermafroditas grandes, de color entre blanco y amarillo sobre todo aterciopeladas, aparecen bajo las aureolas y, presentan forma de embudo,

miden entre 0.20 y 0.25 m. El ovario está ubicado en la base de un largo tubo llevando las escamas foliares hacia el exterior. Hay numerosos estambres

sobre un tallo de anteras esbeltas. El estilo inusualmente largo y tubular tiene un largo de 0.20 m y 0.50 m de diámetro.

El fruto es una baya de forma ovoidea, tiene un largo de 10-12 cm, 7 cm de ancho, amarillo, con brácteas, pulpa jugosa blanca. Antes de madurar es de color verde. Al avanzar en la madurez la cáscara y la pulpa de algunas variedades cambian a color rojo púrpura, mientras que en otras variedades la cáscara es amarilla y la pulpa es blanca. El fruto pesa 200-350 g y contiene muchas semillas, aproximadamente 650 semillas por fruto (Le Bellec *et al.*, 2006). En la pitahaya amarilla la longitud de la semilla varía entre 2 a 4 mm (OIRSA, 2001).

4. Usos, composición nutricional y propiedades físicoquímicas de la pitahaya

La pitahaya tiene diversas aplicaciones de acuerdo a su país de procedencia es así que se la emplea de forma ancestral, ornamental, comercial e industrial. En México este fruto era de gran importancia especialmente en zonas semi áridas tropicales u subtropicales; las comunidades prehispánicas la han empleado ancestralmente como regalo u ofrenda para comunidades vecinas o se realizaban bebidas de este fruto para ofrecérselas a los participantes de las mismas (López, 1999). Sin embargo su explotación comercial se inició a finales del siglo XIX, pero este no alcanzo la comercialización esperada comparada con otras cactáceas productoras de fruto (Calderón y Figueroa, 1994).

En Ecuador no se ha registrado información sobre el empleo ancestral que ha tenido este fruto y lo que se conoce de sus aplicaciones se debe a los estudios realizados por Sánchez *et al.* (2006) en su artículo "Bosques secos en Ecuador y sus plantas útiles" y Rios y Borgtoft Pedersen (1997) en su libro "Usos y manejo de los Recursos Naturales" en el que mencionan su empleo como cercas vivas, uso ornamental y en lugares que presentan bosques secos se la emplea como fruta especial para Navidad.

Hoy en día la importancia de este fruto obliga a países como Ecuador a generar proyectos de diversa índole ya que basados en la composición nutricional se la utiliza principalmente, de la siguiente forma: de manera fresca en trozos o acompañada de

otra frutas; de otra manera la pulpa de la pitahaya es sometida a un proceso IQF (Individual Quick Freezing) convirtiéndola así en materia prima para la elaboración de gelatinas, refrescos, helados, yogurt, dulces, mermeladas, jaleas, cocteles y otros productos industrializados como esencias extraídas de las flores y formando parte de suplementos digestivos (FAO-PRODAR, 2006).

Se trata de una fruta muy especial en cuanto a cualidades medicinales con una serie de aplicaciones que van desde el alivio a problemas estomacales hasta problemas endocrinógenos y mejora el funcionamiento del tracto digestivo.

El beneficio más conocido de esta fruta es la capacidad antioxidante que se atribuye a sus semillas por a su alto contenido de ácidos grasos naturales así como ácido linoléico 64.5 %, ácido oleico 13.9 % y ácido palmítico 14.4 % (Chemah *et al.*, 2010), siendo el más importante el ácido linoléico ya que este funciona en el organismo como buffer capturando el colesterol generando un efecto cardiotónico (Omidzadeh *et al.*, 2011).

En 100 g de la parte comestible de pitahaya fresca se encuentra: Agua 83 g, Proteína 0.159 - 0.29 g, Grasa 0.21 - 0.61 g, Fibra 0.7 - 0.9 g, Cenizas 0,64 - 0.68 g, además de la presencia de minerales como Calcio 6.3 - 8.8 mg, Fósforo 30.2 - 36.1 mg, Hierro 0.55 - 0.65 mg; pigmentos como el caroteno 0.005 - 0.012 mg; vitaminas como Tiamina (Vitamina B1) 0.28 - 0.43 mg, Riboflavina (Vitamina B2) 0.043 - 0.045 mg, Niacina (vitamina B3) 0.97 - 0.430 mg, Vitamina C 8 - 9 mg (Morton, 1987).

Otro compuesto importante presente en la cáscara y pulpa son las betalainas que pertenecen a los bioflavonoides derivados de la quercetina, se presentan como una clase pigmento rojo y amarillo indol, la diversidad estructural de estos pigmentos permiten la solubilidad en agua formando dos grupos estructurales: el rojo violeta (betacianinas) y amarillo naranja (betaxantinas), son sustancias similares a las vitaminas que trabajan junto con antioxidantes como la vitamina C evitando la muerte celular prematura (Esquivel y Araya, 2012).

Las betalainas ayudan a producir colágeno que permite que la piel luzca joven, fortalece los vasos sanguíneos y ayuda a resistir las alergias e infecciones de virus y bacterias (Minschew, 2009).

Las propiedades físico químicas más importantes corresponden al contenido en el jugo de azúcares

reductores como la glucosa 30 - 55 g/L y fructosa 4 - 20 g/L, la acidez de la pulpa generalmente baja 2.4 - 3.4 g/L; los ácidos orgánicos principales presentes en el zumo son ácido cítrico, ácido láctico que se presentan en rango de 0.3 - 1.5%. El principal aminoácido presente en el jugo de pitahaya es la Prolina 1.1 - 1.6 g/L (Jamilan *et al.*, 2011).

5. Situación de la pitahaya en el Ecuador y el Mundo

Hoy en día la pitahaya se considera como fruta tropical rentable para exportación por sus cualidades morfológicas y nutricionales, por ello se la está promocionando a través del mundo mediante ferias internacionales en países tales como: China, Malasia, París, Brasil y Argentina.

Según el Señor Diego Vizcaíno Director de Agrolidad (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, del Ecuador, 2013), la comercialización de esta fruta crece lentamente, ya que compete con otras frutas como maracuyá, mango, piña, banano, entre otros que por ser más conocidas tienen un mercado con mayor aceptación.

La limitante más importante que presenta es la baja y sectorizada producción que tiene la pitahaya, ya que no se han aprovechado zonas específicas para su cultivo, además de la falta de conocimiento por parte de los agricultores. No ha sido un impedimento la falta de estudios y sustento bibliográfico referente a esta fruta, a pesar de esta situación se están planteando alternativas que promuevan su interés comercial.

Según los Boletines emitidos por PRO ECUADOR (Instituto de Exportaciones e Inversiones del Estado Ecuatoriano) la pitahaya se muestra como oferta exportable, la cual despierta gran interés dentro de los importadores y autoridades de control de calidad de otros países (PRO ECUADOR, 2013).

En el 2011, el Consulado General de la República del Ecuador en conjunto con la Comisión Municipal y Agrícola de Shanghai, organizaron la Primera Exposición de Comida ecuatoriana con el fin de promover la oferta exportable del Ecuador, en el evento se presentaron productos agrícolas que fueron reconocidos por su calidad en la feria, entre ellos el cacao fino de aroma, la pitahaya y el maracuyá.

Otra muestra de trabajo para promocionar esta fruta es la que se realizó en la feria de alimentos SIAL, en París (2012) en donde se mostró en el stand ecuatoriano una degustación de platos típicos con productos como el camarón, el palmito, atún y chifles y se aprovechó esta vitrina para dar a conocer otras frutas ecuatorianas como la uvilla, pitahaya, papaya, orito, tomate de árbol, maracuyá y taxo a los más de 150.000 visitantes que se dieron cita (PRO ECUADOR, 2013).

El Banco Central del Ecuador a través de su fuente de información virtual y su sub partida NANDINA 0810904000 correspondiente a Pitahaya (*Cereus sp.*) en el periodo 2009 - 2012 indica el flujo de las exportaciones lo que determina la presencia e importancia de este fruto en otros países (Ver Tabla 1).

6. Conclusiones

La pitahaya no tiene un origen establecido, debido a que los países en los cuales se presenta este cultivo se disputan su mención etnobotánica, sin embargo la proporción más amplia de esta familia se presenta en México del que se sugiere una migración de germoplasma especialmente hacia el sur.

El estudio que han generado los países que comercializan este fruto permite interpretar la importancia nutricional que implica. La presencia de bioflavonoides como las betalainas otorgan características antioxidantes ya que capturan los radicales libres de las células evitando así el proceso degenerativo y la muerte celular; además del beneficio que brinda el conjunto de ácidos grasos como el linoleico u omega 3 y que genera un efecto cardiotónico; sin restar importancia al contenido en minerales como Calcio 6.3 - 8.8 mg, Hierro 0.55 - 0.65 mg, Fósforo 30.2 - 36.1 mg; Vitaminas que son parte del complejo B.

El Ecuador está intentando promocionar esta fruta por las propiedades nutricionales que presenta, considerando que es un producto con alto potencial comercial, obligando así a entidades gubernamentales a generar proyectos para viabilizar el comercio a otros países, por tener amplias aplicaciones industriales considerando su uso en helados, mermeladas, sorbetes, bebidas y otras.

Tabla 1. Toneladas exportadas de pitahaya entre 2009 y 2012. Fuente: (Banco Central del Ecuador, 2012)

PAIS	TONELADAS
Francia	93.46
Singapur	46.85
Países Bajos	35.50
Holanda	29.29
Canadá	8.53
España	8.30
Hong Kong	6.02
Indonesia	4.13
Suecia	2.70
Alemania	1.56
Suiza	1.56
Bélgica	1.34
China	0.63
Chile	0.13
Emiratos Árabes Unidos	0.05
Antillas Holandesas	0.04
Italia	0.02
Reino Unido	0.01

Referencias

Banco Central del Ecuador. 2012. **Comercio exterior - bce.** URL http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/seguridad/ComercioExteriorEst.jsp, consulta: 8 de Febrero 2013.

Calderón, S. y G. Figueroa. 1994. **Especies vegetales nativas de las zonas áridas y semiáridas de México con potencial para la domesticación.** Facultad de ciencias biológicas, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

Castillo, R. 2006. **Aprovechamiento de la pitahaya: Bondades y problemáticas.** *Caos Conciencia*, 1(1): 17-24.

Chemah, T., A. Aminah, A. Noriham y W. Aida. 2010. **Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids.** *International Food Research Journal*, 17: 1003-1010.

Cobos, J. 2007. **Proyecto de factibilidad para la exportación de pitahaya a Alemania.** Facultad: Ciencias económicas y negocios, Uni-

versidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador, URL <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/6479>.

CODESCO. **Energía solar fotovoltaica y térmica.** URL http://www.codeso.com/Mapa_Ecu01.html, 15 de Febrero de 2013.

Delgado, J. 2010. **Análisis general del mercado de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) con fines de su comercialización en la república popular de China (RPC).** Facultad de ciencias económicas y administrativas, Universidad Autónoma de Occidente, Santiago de Cali, Colombia, URL <http://bdigital.uao.edu.co/bitstream/10614/1457/1/TMD00599.pdf>.

ECOFINSA. 2008. **Paraíso frutas ecuatorianas de calidad, pitahaya.** URL <http://www.ecofinsa.com/pitahaya.html>, consulta: 15 de Diciembre 2012.

ECORAE, INIAP, OEA y GTZ. 2001. **Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la amazonía ecuatoriana.** ECORAE, Quito, Ecuador, 1 edición.

- El Comercio. 2012. **La producción de pitahaya germina**. URL (http://www.elcomercio.com.ec/agromar/produccion-pitahaya-germina_0_647935323.html), consulta: 10 de enero 2013.
- Esquivel, P. y Y. Araya. 2012. **Características del fruto de la pitahaya (*hylocereus sp.*) y su potencial de uso en la industria alimentaria**. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3(1): 113–129.
- FAO-PRODAR. 2006. **Productos frescos y procesados. Fichas técnicas**. URL (http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/PITAHAYA.HTM), consulta: 28 de Diciembre 2012.
- Fuentes, V. 2012. **Etnobotánica de cactaceae en cuba**, instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Ministerio de la Agricultura, C. Habana.
- González, I. 2006. **Desarrollo y aplicación de procesos tecnológicos para la elaboración de conservas a base de pitaya (*stenocereus* sp.) de la región mixteca**. Proyecto Fin de Carrera, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
- IBGE. 23 de Junio de 2013. **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. URL (http://brokediscount.com/tag-mapa-mundial++_+_+.html).
- Jamilan, B., C. Shu, M. Kharidah, M. Dzulkifly y A. Norinazan. 2011. **Physico-chemical characteristics of red pitaya (*hylocereus polirhizus*) peel**. International Food Research Journal, 18: 279–286.
- Jiménez, C. 2011. **Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan**. Revista Digital Universitaria, pp. 2–23.
- Le Bellec, F., F. Vaillant y E. Imbert. 2006. **Pitahaya (*hylocereus spp.*): a new fruit crop, a market with a future**. Fruits, 61(4): 237–250.
- López, L. 1999. **La pitaya: variedad de usos**. Gaceta Universitaria, 115: 5, URL (<http://www.gaceta.udg.mx/Hemeroteca/paginas/115/5-115.pdf>).
- Mandujano, M., J. Golubov y J. Reyes. 2002. **Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar**. CONABIO Biodiversitas, 40: 4–7.
- Minshew, B. 2009. **The secret of nopalea's amazing betalains**. TriVita: experience wellness VitaJournal, pp. 14, consulta: 25 de Noviembre 2012.
- Morton, J. 1987. **Strawberry pear**. En: **Fruits of Warm Climates**, pp. 347–348, Julia F. Morton, Miami, FL, URL (https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/strawberry_pear_ars.html).
- OIRSA. 2001. **Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria, nicaragua**. URL (<http://www.oirsa.org>), consulta: 15 de Diciembre 2012.
- Omidzadeh, A., R. Mohd, A. Ismael, S. Roohinejad, L. Nategui y M. Abu. 2011. **Cardioprotective compounds of red pitaya (*hylocereus polyrhizus*) fruit**. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9(3-4): 152–156.
- Paraiso. 2013. **Ecofinsa frutas ecuatorianas de calidad**. URL (<http://www.ecofinsa.com/pitahaya.html>), consulta: 2 de Enero 2013.
- PRO ECUADOR. 2013. **Ecuador expuso frutas exóticas en feria de alimentos sial parís 2012**. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, URL (<http://www.proecuador.gob.ec/2012/11/07/ecuador-expuso-frutas-exoticas-feria-de-alimentos-sial-paris-2012/>), consulta: 6 de Enero 2013.
- Rios, M. y H. Borgtoft Pedersen. 1997. **Uso y manejo de recursos vegetales: memorias del segundo simposio ecuatoriano de etnobotánica y botánica económica**. Ediciones Abya-Yala, Quito, 1 edición.
- Sánchez, O., L. P. Kvist y Z. Aguirre. 2006. **Bosques secos en Ecuador y sus plantas útiles**. En: Moraes R, M., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev (editores), **Botánica Económica de los Andes Centrales**, tomo 42 de **Ecología en Bolivia**, capítulo 2, pp. 188–204, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- Tafur, R., J. Toro, J. Perfetti, D. Ruiz y R. Morales. 2006. **Plan frutícola nacional pfn**. Informe técnico, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola, Asohofrucol, Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle del Cauca, Cali, URL (http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_14_FINALPFNCOMPLETO.pdf).

The Plants List. 2013. **Stenocereus queratoensis**
(f.a.c. weber ex mathes.) buxb. URL <<http://>

www.theplantlist.org/tpl/record/kew2486758},
consulta: 12 de Abril 2013.

ACTUALIZACIONES EN VACUNOLOGÍA CANINA: ¿CÓMO ADAPTAR EL PROTOCOLO VACUNAL A CADA ANIMAL?

UPDATES ON CANINE VACCINOLOGY: HOW TO ADAPT THE VACCINATION
PROTOCOL TO EACH ANIMAL?

Juliette Cadier

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Calle Jerónimo Leiton S/N y Gatto Sobral,
Teléfono: 0998328556, Quito, Ecuador.*

Autor para correspondencia: jcadier@uce.edu.ec

Manuscrito recibido el 8 de julio de 2015. Aceptado, tras revisión, el 5 de noviembre de 2015.

Resumen

En este artículo, se hace un breve recordatorio de las particularidades del sistema inmunitario del joven cachorro canino, explicando por qué la absorción de los anticuerpos de origen materno vía calostro es esencial para su sobrevivencia. Sin embargo, estos anticuerpos inhiben la capacidad del joven cachorro a empezar su propia respuesta inmunitaria. Se define así el periodo crítico inmunológico durante el cual el cachorro no tiene suficientes anticuerpos maternos para protegerlo contra una infección, pero demasiados de los mismos para responder correctamente a la vacunación. Durante este periodo, los animales son muy vulnerables a las infecciones. Es por eso que los protocolos de primovacunaación tienen que tomar en cuenta el momento y las variaciones de duración del periodo crítico para poder proteger a todos los cachorros. El protocolo vacunal tiene que adaptarse también al modo de vida de cada animal y por esta razón los intervalos entre cada refuerzo son específicos de la situación de cada animal.

Palabras clave: cachorro, enfermedad infecciosa, periodo crítico, vacuna.

Abstract

This article makes a quick recall of the puppy's particular immunological system, explaining why the absorption of the maternal antibodies of the colostrum is so essential for his survival. However, those antibodies inhibit the ability of the young puppy to start its own immune response. That's how we define the puppy's immunological gap: it's the period during which there is not enough maternally derived antibodies to protect it against infections, but too many to respond properly to vaccination. During this gap, the puppies are very susceptible to infectious diseases. This is why the vaccination protocols should consider the variation of the duration and moment of appearance of the immunological gap in order to protect every puppy. The vaccination protocol has to adapt also to the lifestyle of every animal, and that's why the intervals between the boosters are specific to the animal's situation.

Keywords: puppy, infectious disease, immunological gap, vaccine.

Forma sugerida de citar: Cadier, J. 2015. **Actualizaciones en vacunología canina: ¿cómo adaptar el protocolo vacunal a cada animal?**. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 59-65. ISSNp: 1390-3799, ISSNv: 1390-8596.

1. Introducción

Cuando un propietario adopta un cachorro, en general acude rápidamente al veterinario. La primera consulta es el momento para comenzar el protocolo vacunal y dar consejos de educación. El veterinario tiene que hacer las preguntas correctas para llegar a distinguir en qué ambiente va a vivir y qué modo de vida va a tener. El momento de la adopción, entre 2 y 3 meses de edad, es un periodo crítico para el cachorro que es muy susceptible a las enfermedades infecciosas, que pueden llegar a ser mortales. ¿Cómo proteger al cachorro durante este periodo crítico y garantizar una buena inmunidad duradera? En la primera parte de este artículo, se verán los puntos esenciales de la inmunidad del joven cachorro para entender por qué es más vulnerable que el adulto frente a las enfermedades infecciosas. En una segunda parte, se definirá el término de periodo crítico. Finalmente, se revisarán los protocolos vacunales clásicos y cómo adaptarlos al modo de vida de cada animal.

2. Particularidades del sistema inmunitario del joven canino

Cuando nace el cachorro pasa de un útero estéril a un ambiente en el cual está expuesto a todo tipo de microorganismos. Para poder sobrevivir a esta invasión bacteriana necesita la protección su sistema inmunitario. Este sistema inmunitario es funcional pero no es experimentado y por lo tanto es muy lento en reaccionar. Es por eso que la madre juega un papel esencial permitiendo el traslado pasivo de anticuerpos (Tizard, 2013).

La inmunidad específica del cachorro es asimétrica: la respuesta humoral vía los anticuerpos es más importante que la inmunidad a mediación celular. Este desequilibrio entre la respuesta humoral y respuesta de mediación celular fue demostrada en varias especies y permite la implantación del feto en la madre. Este desequilibrio se va a corregir en el cachorro por educación del sistema inmunitario, ya que la respuesta a mediación celular es más eficiente contra las enfermedades infecciosas (Person, 2003). Mientras tanto, el joven cachorro puede contar con una "ayuda inmunitaria" suplementaria: los anticuerpos transferidos por la madre a sus cachorros vía el calostro.

La transferencia de anticuerpos por el calostro es esencial en los caninos y felinos ya que el 90 a 95% de los anticuerpos pasan por esta vía (Tizard, 2013). La transferencia placentaria se ve reducida por el tipo de placentación endoteliocorial, en la cual las circulaciones maternas y fetales están separadas por 4 capas tisulares (Day y Schultz, 2011). El cachorro recién nacido empieza ingerir el calostro y los anticuerpos de origen materno (AOM) pasan en la circulación general gracias a mecanismos de protección que los protegen de la proteasas en el tracto digestivo durante pocas horas después del nacimiento. La cantidad de AOM presente en la circulación del cachorro disminuye 50 % cada 10 días aproximadamente. Por lo tanto, la duración de la protección de los AOM depende directamente de la cantidad de inmunoglobulinas G (IgG) ingeridas por el cachorro (Tizard, 2013). Esta cantidad depende de factores maternos (cantidad de IgG producidas, acceso a las tetillas), de factores dependientes del recién nacido (tiempo de ingestión de calostro, velocidad de crecimiento...) y del tamaño de la camada.

La transferencia pasiva de la inmunidad materna es un arma de doble filo. Si bien este proceso es esencial para la sobrevivencia de los cachorros frente a las infecciones que pueden ser mortales, la presencia de AOM inhibe el desarrollo de la inmunidad adquirida hasta que estas proteínas de origen materno se hayan degradado (Day, 2007). El sistema inmunitario del cachorro muy joven no es capaz de responder a una estimulación vacunal ya que los AOM neutralizan las vacunas vivas atenuadas. Se considera que la inmunidad pasiva de origen materno representa un obstáculo a la puesta en marcha de la inmunidad activa del joven (Person, 2003). La duración de la inhibición depende de la cantidad de anticuerpos transferidos y de la media vida de estos. Los protocolos vacunales tienen que tomar en cuenta varios factores y sobre todo las particularidades inmunológicas del cachorro (Boullier, 2003).

3. Problemática de la vacunación del joven cachorro: noción de periodo crítico

El título sérico de anticuerpos del joven depende de la cantidad de calostro absorbida por el cachorro. Estos anticuerpos disminuyen progresivamente du-

rante las primeras semanas de vida por 3 factores: el consumo de los anticuerpos por el microbismo ambiental, la dilución pasiva debida al crecimiento del cachorro y la destrucción de los anticuerpos. La disminución de los AOM se hace hasta 2 umbrales (Cassaleux y Fontaine, 2006): el umbral de protección; bajo el cual el cachorro no tiene suficientes AOM para poder defenderse contra una infección natural. Este umbral depende del estrés, del destete y de la presencia de enfermedades concomitantes. Y el umbral de neutralización vacunal: arriba del cual los AOM neutralizan las vacunas. Si se vacuna a un cachorro arriba de este umbral, la vacuna está neutralizada.

El umbral de neutralización vacunal se encuentra por debajo de umbral de protección. Estas dos nociones se encuentran descritas en la Figura 1.

Se denomina periodo crítico (o ventana de susceptibilidad) al tiempo durante el cual el cachorro no tiene suficientes AOM para combatir una infección natural, pero demasiados como para ser vacunado de manera eficiente (Ver la Figura 1). El momento en el cual el cachorro está sometido a este periodo crítico depende de: la inmunidad de la madre, de la cantidad de calostro tomada, del fenómeno de dilución, de la velocidad de crecimiento del cachorro y de la sensibilidad individual (Cassaleux, 2009; Boullier, 2003). En promedio, este periodo está ubicado entre las 6 y las 12 semanas de edad (Person, 2003), pero puede durar hasta las 16 semanas (Cassaleux, 2009). No se puede prever con exactitud el principio de la inmunocompetencia en el cachorro, y los protocolos vacunales tienen que tomar esto en cuenta (Day, 2007).

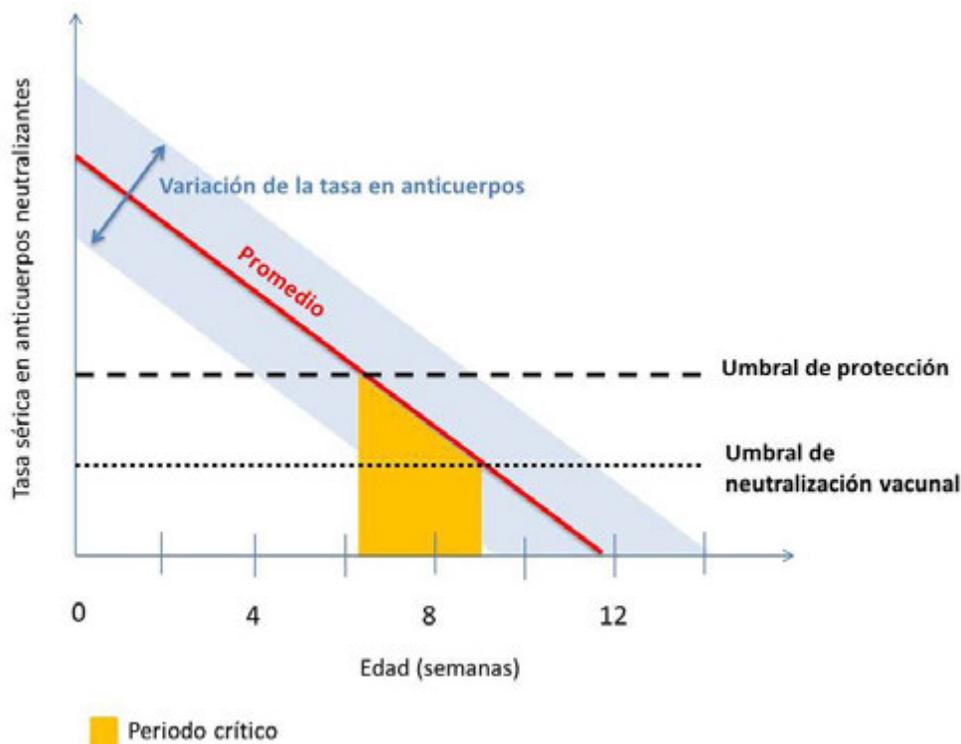


Figura 1. Curva que demuestra la disminución de la tasa sérica en anticuerpos neutralizantes o anticuerpos de origen materno en función de la edad del cachorro. El periodo crítico es el periodo de tiempo durante el cual la tasa de AOM se encuentra entre el umbral de protección y el de neutralización vacunal.

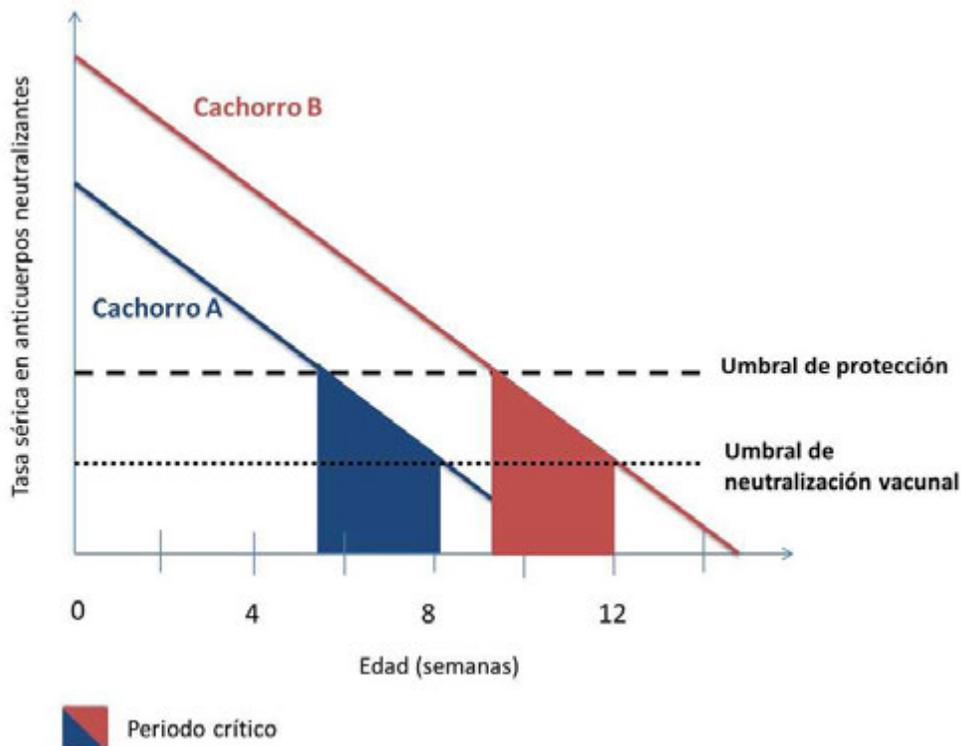


Figura 2. Esquema de la evolución de la tasa sérica en anticuerpos neutralizantes o anticuerpos de origen maternal en dos cachorros A y B en función de la edad. Los cachorros pertenecen a la misma camada pero que recibieron cantidades diferentes de calostro. Se observa que el periodo crítico interviene en dos momentos diferentes según la tasa sérica de anticuerpos del principio.

Se observa una variación entre individuos de la ventana de susceptibilidad. En la Figura 2, se toma el ejemplo de dos cachorros de una misma camada que no tomaron la misma cantidad de calostro, se nota que el periodo crítico no interviene en el mismo momento. El cachorro B, que recibió más calostro, tiene una cantidad de AOM más importante y su periodo crítico se encuentra entre 10 y 12 semanas de edad. En cambio, el cachorro A recibió menos calostro y los AOM desaparecen más temprano. Su periodo crítico está ubicado entre las 6 y las 8 semanas de edad.

Este ejemplo justifica el uso de varias dosis vacunales en primovacunación. En efecto, si estos dos cachorros recibieran una sola dosis vacunal a las 10 semanas, el cachorro B no podría responder a la estimulación vacunal. Por eso en primovacunación se recomienda al menos 2 inyecciones separadas por 3 a 4 semanas para asegurar una buena respuesta en todos los cachorros de la camada.

4. Actualizaciones en vacunología canina: adaptar el protocolo vacunal a cada animal

En los caninos y felinos, el objetivo de la vacunación es doble: proteger al individuo contra las infecciones más comunes y proteger a la población contra el riesgo de la aparición de una epizootia (Bergues y Bertagnoli, 2003). Para los caninos existen recomendaciones vacunales emitidas por dos grandes organizaciones internacionales: The World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) y la American Animal Hospital Association (AAHA) (Day *et al.*, 2010). Estas recomendaciones varían para la primovacunación según si el animal tiene más o menos de 4 meses. Si el animal tiene menos de 4 meses, se considera que todavía puede haber interferencia con los AOM y se aplican más vacunas. En cambio, un cachorro de más de 4 meses tiene niveles de AOM muy bajos que no pueden neutralizar a una

vacuna, por lo tanto se usan menos inyecciones en primovacunación. Al año, se vuelven a aplicar todas las vacunas para completar la primovacunación. Estas recomendaciones sugieren también que el animal está protegido por refuerzos cada 3 años para el

Distemper, la Hepatitis infecciosa y la Parvovirus. Para la Rabia, el Parainfluenza y la Leptospirosis, se necesitan todavía un refuerzo anual porque las vacunas son menos eficientes. Estas recomendaciones están resumidas en la Figura 3.

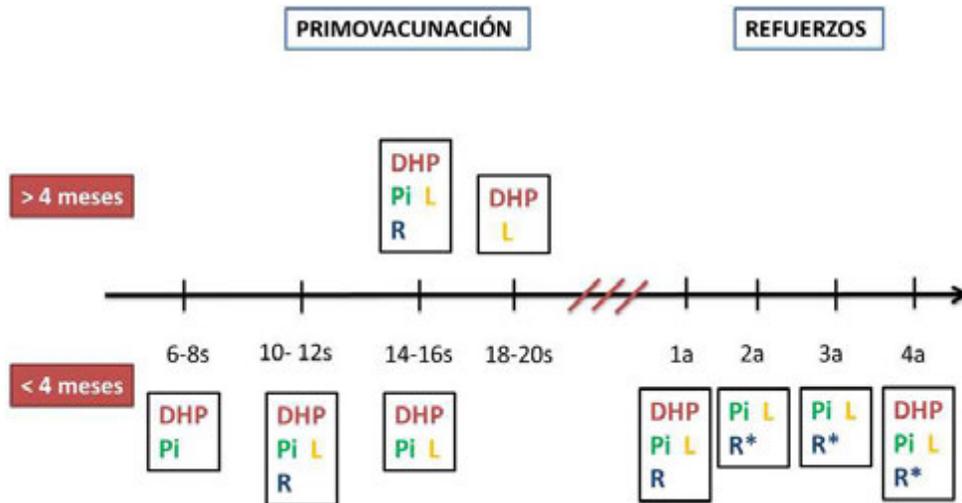


Figura 3. Esquema recapitulativo del protocolo vacunal recomendado por el WSAVA y la AAHA. Leyenda: D= Distemper, H= Hepatitis infecciosa, P= Parvovirus, Pi= Parainfluenza, L= Leptospirosis, R= Rabia, R*= Rabia según la legislación, s= semanas de edad, a= años de edad.

Estas recomendaciones conforman un protocolo clásico. Pero el mejor protocolo vacunal es el que está adaptado al individuo que vacunamos. Primero, se tienen que evaluar los riesgos específicos a la situación del animal. Estos riesgos dependen de parámetros propios de la enfermedad (mortalidad, prevalencia, incidencia), del riesgo de exposición al agente infeccioso y de la eficiencia de la vacuna.

Una de las preguntas al construir un protocolo vacunal es saber a partir de qué edad vacunar. Como vimos, se necesitan varias inyecciones en primovacunación para poder proteger a todos los animales independientemente de la edad en la que presenta el periodo crítico. Si el animal tiene menos de 4 meses se hacen 3 inyecciones separadas por 3 a 4 semanas a partir de las semanas 8-9 de vida. Si el animal tiene más de 4 meses, 2 inyecciones separadas por 3 a 4 semanas son suficientes. La primovacunación se termina con una última inyección máximo 12 meses después de la última vacuna.

Existe un debate sobre los refuerzos anuales de las vacunas. Recientes estudios estiman que los refuerzos anuales ya no son necesarios (Greene, 2006;

Day *et al.*, 2010), ya que la duración de la protección de las vacunas dura de 7 a 9 años para el Distemper, la Hepatitis infecciosa y la Parvovirus (Schultz, 2006; Day *et al.*, 2010). A partir de estos datos podemos proponer refuerzos cada 3 años después del primer refuerzo al año para el Distemper, la Hepatitis infecciosa y la Parvovirus. Este parece ser un buen compromiso entre los datos científicos y las recomendaciones de los fabricantes de vacunas. Sin embargo, esto no es válido para las vacunas inactivadas (*Leptospira*, Parainfluenza y Rabia) o locales (*Bordetella*). Así, el perro será vacunado cada año, pero con vacunas diferentes (Schultz, 2006; Day *et al.*, 2010).

Estas recomendaciones se pueden adaptar al modo de vida del animal, aumentando o disminuyendo el tiempo entre los refuerzos o la cantidad de vacunas, como se ve en la Tabla 1.

Así vemos que los perros que viven en perrera reciben cada año las vacunas contra el Distemper, la Hepatitis infecciosa, la Parvovirus, Parainfluenza, *Leptospira* y *Bordetella bronchiseptica*. En cambio los perros que viven solos y nunca salen de la casa, ne-

cesitan sólo las vacunas esenciales (Distemper, hepatitis, Parvovirus) y las otras son opcionales (Parainfluenza, *Leptospira*, *Bordetella bronchiseptica*).

5. Conclusiones

Para concluir, con el aumento del número de vacunas en el mercado y recientes controversias sobre los

efectos secundarios de las vacunas, tanto en medicina humana como veterinaria, se ha instaurado un debate en la sociedad sobre la vacunación. En este contexto, es importante que el veterinario reconsidere el acto vacunal, que no es ningún acto superfluo. La vacunación comporta riesgos y efectos secundarios. Para minimizar estos riesgos, se debe hacer un examen clínico riguroso, respetar las condiciones de utilización de las vacunas y adaptar el protocolo al modo de vida del animal.

Tabla 1. Tabla que clasifica a los perros en diferentes categorías según su modo de vida (lugar de vida, convivencia con otros animales, acceso al exterior...). Según el modo de vida, se sugiere la frecuencia de refuerzos vacunales que se debería aplicar (adaptado de (Greene, 2006)). Leyenda: D = Distemper, H = Hepatitis infecciosa, P = Parvovirus, Pi = Parainfluenza, L = Leptospirosis, R = Rabia, Bb= *Bordetella bronchiseptica*.

Categorías de perros	Modo de vida	Frecuencia de los refuerzos
Perros que viven en perrera o en grupos	Cohabitación de muchos perros, refugios, perros de trabajo (militares, policías...)	Todos los años: DHPPiL Bb Rabia: según la ley Herpesvirus: para las perras preñadas
Perros que viven afuera	Pasan la mayoría del tiempo afuera sin control	Todos los años: DHPPiL Bb Rabia: según la ley
Perros que pasan mucho tiempo afuera	Tienen contacto con otros perros	Cada 3 años: DHPPiL Bb Cada año: PiL Bb Rabia: según la ley
Perros que viven adentro	Viven estrictamente adentro y no tienen contacto con otros perros	Cada 3 años: DHP Rabia: según la ley Opcional: PiL Bb

Referencias

- Bergues, N. y S. Bertagnoli. 2003. **Aménager en pratique le protocole de vaccination du chiot et du chaton.** Le nouveau praticien vétérinaire, Hors-série néonatalogie et pédiatrie du chien et du chat, 397: 83–87.
- Boullier, S. 2003. **La protection colostrale - conséquences sur la vaccination du chiot et du chaton.** Le nouveau praticien vétérinaire, Hors-série néonatalogie et pédiatrie du chien et du chat, 397: 83–87.
- Cassaleux, G. 2009. **Parvovirose et infections intestinales du jeune chien.** In Encyclopédie vétérinaire. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, (Gastro-entérologie 2500): 1–10, paris.
- Cassaleux, G. y E. Fontaine. 2006. **Gestion de la parvovirose en élevage canin.** Le Point Vétérinaire, 262: 42–46.
- Day, M. 2007. **Immune system development in the dog and cat.** Journal of Comparative Pathology, 137: 10–15.
- Day, M., M. Horzinek y R. Schultz. 2010. **Guidelines for the vaccination of dogs and cats compiled by the vaccination guidelines group (vgg) of the world small animal veterinary association (wsava).** Journal of Small Animal Practice, 51: 1–32.
- Day, M. y R. Schultz. 2011. **Veterinary Immunology - Principles and practice.** Manson Publishing, Londres, 1 edición.
- Greene, C. 2006. **Infectious diseases of the dog and cat.** Saunders Elsevier, St. Louis, 3 edición.
- Person, J.-M. 2003. **La mise en place du système immunitaire : conséquences sur la vaccination du**

- chiot et du chaton. hors-série néonatalogie et pédiatrie du chien et du chat.** Le nouveau praticien vétérinaire, 397: 73–75.
- Schultz, R. 2006. **Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review.** Veterinary Microbiology, 117: 75–79.
- Tizard, I. 2013. **Veterinary Immunology.** Saunders Elsevier, St. Louis, 9 edición.

Normas para la preparación de los manuscritos

LA GRANJA (pISSN: 1390-3799, eISSN: 1390-8596) es una revista internacional, física y electrónica, bilingüe, y de frecuencia semestral dedicada a la publicación de artículos científicos originales previa aceptación y revisión por pares académicos o árbitros científicos (*peer review*).

Política económica

Todos los artículos son publicados para poder acceder a su contenido de manera abierta sin restricciones de contenido o económicas. La revista es publicada por Abya-Yala, de Quito, Ecuador.

Copyright

Los autores son los titulares de los derechos de todos los artículos en La Granja, no obstante los autores han concedido a terceros, de antemano y a perpetuidad, el derecho a usar, reproducir o difundir el artículo, previa citación de la originalidad del mismo artículo

Para que un artículo pueda ser sometido al proceso de Revisión por Pares, se deben cumplir los siguientes pasos y lineamientos:

Originalidad

1. Al ingresar un manuscrito a La Granja: Revista de Ciencias de la Vida, el sistema exige que el autor confirme que el material entregado es inédito y original, que no ha sido publicado anteriormente en forma impresa o electrónica y que no se presentará a ningún otro medio antes de conocer la decisión de esta revista.

Envío electrónico por OJS

2. Enviar el manuscrito en forma electrónica a través del sistema OJS (Open Journal System) de la página de La Revista de Ciencias de la Vida: La Granja (<http://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja>),

previo registro y junto con la CARTA DE PRESENTACIÓN (adjunta en el mismo enlace) que debe incluir el tipo de artículo que se quiere someter a revisión: artículo científico, revisión bibliográfica o punto de vista. Las comunicaciones breves se reservan para hallazgos sobresalientes y se publicarán en un tiempo mucho menor al de los artículos regulares. De la misma manera, se deben responder las siguientes preguntas del manuscrito:

- ¿Qué preguntas o hipótesis aborda su trabajo?
- ¿Es su trabajo claramente importante y novedoso? ¿Por qué?
- ¿Cómo contribuye su trabajo a la comprensión y avances de la ciencia?
- ¿Su estudio es relevante para científicos de otros países?

Requerimientos técnicos

3. Los artículos pueden estar escritos sobre Microsoft Word (.doc o .docx) o L^AT_EX (.tex).
4. Cuando presente el artículo, usted no debe intentar diseñar el manuscrito, no justifique el documento, o centre los títulos, ni utilice el formato de doble columna. El único formato requerido es que los nombres en latín de los organismos deben estar en itálicas.
5. Las fotos, ilustraciones únicamente se presentan como figuras, y éstas, al igual que las tablas, deben estar numeradas secuencialmente incluyendo una descripción al pie explicativa para cada una, así como estar referidas en el texto. Las ecuaciones a las cuales se haga referencia en el artículo también deberán estar numeradas.
6. Use doble *enter* al final de cada párrafo, título o encabezamiento. No use *enter* en ningún otro

lugar, deje al programa procesador de palabras romper las líneas en otros lugares.

Componentes del manuscrito

7. Título: debe ser corto, conciso y reflejar el contenido del artículo. Escribirlo en mayúsculas y minúsculas, centrado; si contiene nombres científicos de taxa, destacarlos con cursivas, sin el autor del taxón. Debe estar escrito en inglés y español.
8. Nombre de los autores y filiación: El nombre del (los) autor(es) deberá escribirse completo, en mayúsculas y minúsculas, alineados al centro. Todo autor debe indicar su filiación institucional con superíndices indicando su dirección de contacto, y correo electrónico.
Adicionalmente se debe incluir qué autor será el responsable del manuscrito o autor por correspondencia.
9. Resumen: Este párrafo debe informar al lector sobre la hipótesis que buscó responder a través de su investigación, la metodología o diseño experimental utilizado, los principales resultados y conclusiones (en no más de 250 palabras). Debe estar escrito en inglés (*Abstract*) y en español.
10. Palabras clave: Las palabras clave serán de tres a seis y representarán los principales temas del artículo, deberán ser colocadas al final del resumen, en minúsculas, separadas entre sí por comas. Deberán incluirse tanto en español, como en inglés (*Key words*).
 - Introducción
 - Materiales y métodos (incluyendo área de estudio)
 - Resultados
 - Discusión
 - Agradecimientos
 - Referencias
11. Los Resultados y la Discusión pueden presentarse en algunos casos combinados.
12. Los agradecimientos deberán estar solamente en un párrafo al final del artículo y ser cortos.
13. La sección de Referencias debe incluir todas las publicaciones referidas en el texto. No se debe incluir reportes no publicados u otro tipo de información que no es posible obtener. Las tesis deben citarse únicamente cuando estén disponibles para consulta en una biblioteca. En el texto las referencias deben seguir el sistema nombre-fecha en orden cronológico por ejemplo: Whitmore (1984), Van der Maarel *et al.*, (1987), Olsen y Balslev (1990), Laegaard (1992). Dos o más referencias citadas en el mismo sitio del texto deben ser arregladas cronológicamente y no alfabéticamente, por ejemplo: Acosta Solís (1982, 1992), Estrella (1983, 1986, 1989, 1991, 1995).
14. La sección de Referencias deberá incluirse en un archivo aparte sobre \LaTeX , proporcionando un archivo de información bibliográfica (.bib); o si el artículo está escrito sobre Microsoft Word u otro procesador de texto, añadir una tabla en Microsoft Excel (.xls o .xlsx) y utilizar el Sistema de Administración de Fuentes. De esta manera, el formato de la revista para las referencias se coloca automáticamente, tal como se muestra en algunos ejemplos a continuación:

Referencias

- Granados, R. y M. Villaverde. 2002. **Microbiología**, tomo II. Parafino S.A., segunda edición, pág. 13.
- Merino, A. 2010. **Métodos topológicos para teoría cuántica**. En: **Cuarto encuentro de Física**, Escuela Politécnica Nacional.
- Noriega, P., P. Coba, J. Naikiai y J. Abad. 2011. **Extracción, pruebas de estabilidad y análisis químico preliminar de la fracción colorante obtenida a partir del exocarpo del fruto *Renealmia alpinia***. La Granja, 13(1): 13–20.
- Ramírez, R. 2000. **Autocriticalidad de los incendios forestales**. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Estudios a Distancia.
- UICN. 2007. **Lista Rápida para plantas de la UICN. Programa de Especies**. Gland, Suiza, URL <http://www.iucnsis.org>, consulta: 10 de abril de 2008.

15. Numerar las figuras secuencialmente con números arábigos (1,2,3,...) en el orden en que deben aparecer en el texto. Numerar las tablas secuencialmente con números arábigos (1,2,3,...) en el orden en que deben aparecer en el texto. Cuando escriba los títulos de figuras y los encabezamientos de tablas, asegúrese de que cada una de las figuras y tablas sean auto-comprensibles, por ejemplo: sin tener que regresar a leer el texto de nuevo.

Preparación de las figuras

16. Las figuras pueden ser dibujos lineales, mapas, o fotografías de medios tonos en blanco y negro o a color en resolución de 300 dpi.
17. Diseñe las figuras para que se ajusten eventualmente al tamaño final de la revista $19,2 \times 26,2$ cm. Asegúrese de que las inscripciones o detalles, así como las líneas, tengan tamaños y grosores adecuados de tal manera que no queden ilegibles cuando sean reducidos a su tamaño final (números, letras y símbolos deben ser reducidos al menos a 2,5 mm de altura después que las ilustraciones han sido reducidas para ajustarse a la página impresa). Idealmente, las ilustraciones lineales deben ser preparadas a aproximadamente a un cuarto de su tamaño final de publicación, ejemplo: $4,7 \times 6,5$ cm.
18. Diferentes elementos en la misma figura deben ser deletreados a, b, c, d, etcétera.
19. Las fotografías deben gravarse con alto contraste y en alta resolución. Recuerde que las fotografías frecuentemente pierden contraste en el proceso de impresión.
20. El texto en las figuras y mapas debe escribirse con letras fácilmente legibles, por ejemplo con el tipo Arial.
21. Si las figuras han sido previamente usadas, es la responsabilidad del autor el obtener el permiso correspondiente para evitar problemas

posteriores relacionados con los derechos de autor.

Procedimiento editorial

22. Cuando el manuscrito ha sido recibido por el editor pasa por dos procesos de selección. El primero se lleva a cabo dentro de un Consejo Editorial Interno que determinará la pertinencia y solvencia científica del manuscrito.
23. Si el manuscrito es aprobado, pasará al segundo proceso dentro del Consejo Editorial Externo, el cual está conformado por expertos de instituciones extranjeras, con reconocimiento internacional.
24. Si el artículo no es aceptado, será devuelto al autor.
25. Si el artículo es aceptado para publicación, el editor combinará los comentarios de los revisores con sus propios comentarios editoriales y regresarán el manuscrito al autor principal para su revisión final. El autor debe entonces realizar las correcciones y cambios necesarios. Usualmente el tiempo dado para cambios no será mayor a dos semanas.
26. La editorial hará las correcciones necesarias al manuscrito. En este punto, si es necesario, una segunda prueba de impresión puede ser enviada al autor corresponsal, pero usualmente esto no ocurrirá.
27. Los editores combinarán todos los manuscritos de acuerdo al tema en el volumen de la
28. La velocidad de publicación del volumen de la revista depende de la calidad de colaboración entre los autores de los manuscritos, los revisores, la imprenta, y los editores. Cada vez que uno de los autores toma más tiempo del necesario para contestar a un requerimiento, el proceso entero será afectado.