

El Dr. Jesús Enrique Lossada, luego de trabajar infatigablemente hasta lograr la reapertura de la Universidad del Zulia, el 01 de octubre de 1946, le aportó a esta institución su primera revista científica: la *Revista de la Universidad del Zulia*, fundada por este insigne zuliano, el 31 de mayo de 1947. En su Tercera Época la revista mantiene la orientación que le asignara su fundador: es un órgano científico de difusión de trabajos parciales o definitivos de investigadores y/o equipos de investigación nacionales y extranjeros. La revista posee un carácter multidisciplinario, por ello su temática se divide en tres grandes ejes: a. ciencias sociales y arte; b. ciencias del agro, ingeniería y tecnología; c. ciencias exactas, naturales y de la salud. Su publicación es cuatrimestral. Cada número, de los tres del año, se corresponde con uno de los tres ejes temáticos. La *Revista de la Universidad del Zulia*, por su naturaleza histórica y patrimonial, está adscrita a la *Cátedra Libre Historia de la Universidad del Zulia*.

AUTORIDADES

Jorge Palencia
Rector

Judith Aular de Durán
Vice Rectora Académica

María Guadalupe Núñez
Vice Rectora Administrativa

Marlene Primera
Secretaria

Imelda Rincón Finol
Coordinadora de la Cátedra Libre
Historia de la Universidad del Zulia

Contenido

- 6** Merlin Rosales
Presentación
- 9** Alfredo Acurero, David Bracho, Carlos Rincón y Jianfeng Wu
Calidad de servicio entre sistemas autónomos con enlaces a 5.7 GHz y servicios de última milla inalámbricos con el uso de IPv6. *Quality of Service between autonomous systems with links at 5.7 GHz and last mile wireless services by using IPv6*
- 31** José R. Fermín
Efectos de interfase y superficie en películas delgadas de Fe (001) *Interface and surface effects in thin films of Fe*
- 55** Mónica Arias Jiménez y Roberto Bauza Fermín
Descriptores cromatográficos en fase normal de derivados feniluretanos de alcoholes polietoxilados *Chromatography descriptors in normal phase of phenyluretan derivatives of polyethoxylated alcohols*
- 78** Juan Chirinos, Darmenia Ibarra, Ángel Morillo y Jeannette Zárraga
Líquidos iónicos en catálisis: avances en dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas *Ionic liquids in catalysis: advances in olefin dimerization, oligomerization and polymerization*
- 102** Laugeny Díaz-Borrego, Alexandra Vera, Julio Marín, Cateryna Aiello-Mazzarri, Beltrán Briceño y Ever Morales
Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta) *Effect of kerosene and the concentration of nutrients in the growth of a mixed culture of microalgae (Chlorophyta)*
- 119** Andrea Sánchez y Ángela Matos Acurero
Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de zábila (Aloe vera L.) in vivo. *Effects of the use of colchicine as an inducer of polyploidy in aloe plants*
- 140** Jorymar Leal, Pablo Ortega, Carlos Chávez, Tania Romero, Carolina Escalona y Yanneris Medina
Coexistencia de anemia, depleción de las reservas de hierro y deficiencia de vitamina A en niños con síndrome de Down *Co-existence of anemia, depleted reserves of iron and vitamin A deficiency in children with Down syndrome*
- 168** Orlando J. Castejón
Pathology of nerve cell membranes in complicated and severe human brain traumatic injuries. An electron microscopic study using cortical biopsies
- 198** Yrma Santana Pérez, Ivette Suárez Gómez, Alexis Morón Borjas, Mary Rincón Fernández, Roberto García López, Sirio Piletti Rincón
Estado de salud periodontal y necesidad de tratamiento de una población escolar *Periodontal health status and treatment needs of a student population*
- 211** Normas para la presentación de trabajos
- 217** Fe de errata

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA. 3ª época.
Ciencias Exactas, Naturales y de la Salud///
Año 3 N° 6, Myo-Agost 2012
ISSN 0041-8811 - Depósito legal pp 76 - 654

Año 3 N° 6

Mayo - Agosto 2012

Revista de la Universidad del Zulia

Revista de la Universidad del Zulia

Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada



Ciencias

Exactas

Naturales

y de la Salud

65
Aniversario

Año 3 N° 6

Mayo - Agosto 2012
Tercera Época
Maracaibo- Venezuela

ISSN 0041-8811
DEPÓSITO LEGAL pp 76-654

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA
TERCERA ÉPOCA

DIRECTORES Y RESPONSABLES EMÉRITOS

Jesús Enrique Lossada, José Ortín Rodríguez, José A. Borjas Sánchez, Felipe Hernández, Antonio Borjas Romero, César David Rincón, Sergio Antillano

DIRECTORA

Imelda Rincón Finol

COORDINADOR

Reyber Antonio Parra Contreras

EDITOR ASOCIADO

Merlin Rosales

COMITÉ EDITORIAL

Imelda Rincón (LUZ)

Reyber Parra (LUZ)

Teresita Álvarez (LUZ)

Lourdes Molero (LUZ)

Jesús Medina (LUZ)

José Lárez (UNERMB)

Marielis Villalobos (LUZ)

COMITÉ ASESOR

Nelson Márquez (LUZ)

Judith Aular (LUZ)

Rutilio Ortega (LUZ)

Tahís Ferrer (LUZ)

Alí López (ULA)

Antonio Castejón (LUZ)

Ana Judith Paredes (LUZ)

Nevi Ortín (LUZ)

María Dolores Fuentes Bajo
(Universidad de Cádiz, España)

Néstor Queipo (LUZ)

Ana Irene Méndez (LUZ)

Mayela Vílchez (LUZ)

Modesto Graterol (LUZ)

Mario Ayala (UBA Argentina)

Tomás Fontaines (UDO)

Enrique Pastor Seller

(Universidad de Murcia, España)

TRADUCCIÓN

Laura González

Rhina Parra

COLABORADORES

Nancy Feria (FUNDADESARROLLO-LUZ)

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD
DEL ZULIA
Tercera Época
**Ciencias Exactas,
Naturales y de la Salud**

Año 3 Nº 6 Mayo- Agosto 2012



PUBLICACIÓN AUSPICIADA
POR LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA

Esta revista impresa en papel alcalino.

*This publication was printed on acid-free paper that meets
the minimum requirements of the American National Standard*

for Information Sciences-Permanence for Paper for

Printed Library Materials, ANSI Z39.48-1984

**Indizada y/o catalogada electrónicamente
en las siguientes bases de datos:**

REVENCYT

REVICYHLUZ

LATINDEX

CLASE

PERIODICA

**Sistema de Bibliotecas de la Universidad
de Antioquia**

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA

© 2012. Universidad del Zulia

ISSN 0041-8811

Depósito legal pp 76-654

Portada:

Concepto gráfico: Laura González

Diagramación final: Lcda. Génesis Quintero labichino.

Diagramación e impresión: Grafifor, C.A.

Teléfonos: 0261 788 56 72 / 788 63 06 / 787 23 76

grafiforca05@gmail.com / Grafiforca@cantv.net

Maracaibo - Venezuela

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA.

Calle 67 (prolongación Cecilio Acosta) con Av. 16 (Guajira).

Nueva sede rectoral de la Universidad del Zulia. Edificio Fundadesarrollo.

Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Teléfono/Fax: 58-261-7831611.

Correos electrónicos: revistauniversidaddelzulia@gmail.com, revistadeluz@gmail.com

Contenido

6 Merlin Rosales

Presentación

9 Alfredo Acurero, David Bracho, Carlos Rincón y Jianfeng Wu

Calidad de servicio entre sistemas autónomos con enlaces a 5.7 GHz y servicios de última milla inalámbricos con el uso de IPv6./// *Quality of Service between autonomous systems with links at 5.7 GHz and last mile wireless services by using IPv6*

31 José R. Fermin

Efectos de interfase y superficie en películas delgadas de Fe (001) /// *Interface and surface effects in thin films of Fe*

55 Mónica Arias Jiménez y Roberto Bauza Fermín

Descriptores cromatográficos en fase normal de derivados feniluretanos de alcoholes polietoxilados /// *Chromatography descriptors in normal phase of phenyluretan derivatives of polyethoxylated alcohols*

78 Juan Chirinos , Darmania Ibarra, Ángel Morillo y Jeannette Zárraga

Líquidos iónicos en catálisis: avances en dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas /// *Ionic liquids in catalysis: advances in olefin dimerization, oligomerization and polymerization*

102 Laugeny Díaz-Borrego, Alexandra Vera, Julio Marín, Cateryna Aiello-Mazzarri, Beltrán Briceño y Ever Morales

Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta) /// *Effect of kerosene and the concentration of nutrients in the growth of a mixed culture of microalgae (Chlorophyta)*

119 Andrea Sánchez y Ángela Matos Acurero

Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de sábila (Aloe vera l.) in vivo. /// *Effects of the use of colchicine as an inducer of polyploidy in aloe plants*

140 Jorymar Leal, Pablo Ortega, Carlos Chávez, Tania Romero, Carolina Escalona y Yanneris Medina

Coexistencia de anemia, depleción de las reservas de hierro y deficiencia de vitamina A en niños con síndrome de Down /// *Co-existence of anemia, depleted reserves of iron and vitamin A deficiency in children with Down syndrome*

168 Orlando J. Castejón

Pathology of nerve cell membranes in complicated and severe human brain traumatic injuries. An electron microscopic study using cortical biopsies

198 Yrma Santana Pérez, Ivette Suárez Gómez, Alexis Morón Borjas, Mary Rincón Fernández, Roberto García López, Sirio Piletti Rincón

Estado de Salud periodontal y necesidad de tratamiento de una población escolar /// *Periodontal health status and treatment needs of a student population*

211 Normas para la presentacion de trabajos

217 Fe de errata

Presentación

En esta oportunidad se presenta el número 06 de nuestra histórica *Revista de la Universidad del Zulia* correspondiente al período Mayo-Agosto 2012, el cual coincide con el LXV Aniversario de esta revista (31 de Mayo de 1947), valioso legado del Dr. Jesús Enrique Lossada, considerado el Padre de la moderna Universidad del Zulia (LUZ), por ser el líder de su reapertura. La Revista contiene los resultados de diversas investigaciones ubicadas en las áreas de las Ciencias Exactas, Naturales y de la Salud. Son en total nueve artículos científicos que proceden de la labor investigativa persistente de destacados investigadores de las Facultades: Experimental de Ciencias, Medicina y Odontología de la Universidad del Zulia.

En el área de la Computación se tiene un artículo de gran relevancia: ***Calidad de servicio entre sistemas autónomos con enlaces a 5.7 GHz y servicios de última milla inalámbricos con el uso de IPv6***, en el cual se analizó el comportamiento del protocolo IPv6 en sistemas autónomos conectados por enlaces de 5.7 GHz usando parámetros de medición de calidad de servicio (QoS) y nodos móviles en los extremos.

En el área de la Física se incluye un artículo ***Efectos de interfase y superficie en películas delgadas de Fe (001)***. En este trabajo se emplea la Resonancia Ferromagnética (FMR) para estudiar los efectos de interfase y superficie en películas delgadas magnéticas; en el mismo se muestra que las propiedades magnéticas son debidas al efecto combinado de las anisotropías magnéticas y a la competencia entre los mecanismos de conducción y las dislocaciones de las anisotropías.

En el campo de la Química se incluyen dos artículos: 1) **Descriptores cromatográficos en fase normal de derivados feniluretanos de alcoholes polietoxilados**, en el cual se evaluó el modelo lineal de descriptores cromatográficos para derivados feniluretanos de alcoholes polietoxilados con número de óxido de etileno (EON) de 4 y 18, empleando cromatografía de alta resolución en fase normal (HPLC-FN), y 2) **Líquidos iónicos en catálisis: avances en dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas**. En este artículo se presenta una recopilación detallada de los métodos de síntesis de los líquidos iónicos y del empleo de estas sustancias como medio de reacción en reacciones de olefinas tales como: la dimerización, la oligomerización y la polimerización catalizadas por complejos de níquel y hierro, incluyendo también los avances recientes en el uso de catalizadores derivados de complejos de Fe(II), Co(II) y Cr(III), basados en ligandos tipo bis(imino)piridina.

En el campo de la Biología se incluyen dos artículos: 1) **Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta)**, en el cual se evaluó el efecto combinado del queroseno y la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (*Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* sp.), aisladas de una fosa petrolera, y 2) **Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de sábila (*Aloe vera* L.) in vivo**, en el cual se demuestra que el uso de la colchicina como inductor de poliploidía en sábila es una herramienta valiosa para la obtención de plantas con mayor biomasa, lo que permite aumentar la materia prima para la exportación y elaboración de productos medicinales y cosméticos.

Finalmente, en el área de la salud se insertan tres artículos: 1) **Coexistencia de anemia, depleción de las reservas de hierro y deficiencia de vitamina A en niños con síndrome de Down**, donde se demuestra que en niños con síndrome de Down la prevalencia de afectación del hierro y vitamina A fue superior que en niños normales; 2) **Pathology of nerve cell membranes in complicated and**

severe human brain traumatic injuries. An electron microscopic study using cortical biopsies, en el cual se utilizó la microscopía electrónica de transmisión para examinar biopsias corticales de pacientes con lesiones cerebrales traumáticas, y 3) ***Estado de salud periodontal y necesidad de tratamiento de una población escolar***, cuyos resultados evidenciaron que la gran mayoría de niños y adolescentes del municipio Baralt del estado Zulia presentaban una condición periodontal sana y que la necesidad de tratamiento está relacionada con el mejoramiento de su higiene bucal.

Con el presente número, *la Revista de la Universidad del Zulia* cierra su segundo ciclo temático, logrando publicar los números correspondientes a las áreas de: Ciencias Sociales y Arte; Ciencias del Agro, Ingeniería y Tecnología; y Ciencias Exactas, Naturales y de la Salud. Con la participación y el compromiso de todos los investigadores acreditados de nuestra Ilustre Alma Mater, esta revista multidisciplinaria, fundada por el Dr. Jesús Enrique Lossada, continuará siendo el vínculo entre nuestra máxima casa de estudio con la sociedad.

Merlin Rosales
Editor Asociado

Calidad de servicio entre sistemas autónomos con enlaces a 5.7 GHz y servicios de última milla inalámbricos con el uso de IPv6.

Alfredo Acurero¹
David Bracho¹
Carlos Rincón¹
Jianfeng Wu²

RESUMEN

El estudio de conectividad inalámbrica entre Sistemas Autónomos no ha sido muy explorado, por lo que se busca asociar el nuevo protocolo de direccionamiento IPv6 con dicha problemática. Consecuentemente, se analizó el comportamiento del protocolo IPv6 en Sistemas Autónomos conectados por enlaces de 5.7 GHz usando parámetros de medición de Calidad de Servicio (QoS) y nodos móviles en los extremos. Aplicando los principios de Bisquerra (2000), la metodología constó de cuatro (4) fases: recopilación de información, diseño de topologías de pruebas, rutinas de medición y recopilación de los resultados y análisis estadístico. Del análisis-comparativo entre el protocolo IPv6 e IPv4 se desprende que IPv6 presentó en general un menor desempeño frente a IPv4, pero mediante el uso del método estadístico ANOVA se concluye que a causas de diferencias no considerables, IPv6 no influye significativamente en el rendimiento, considerando factible su uso en una red con las características estudiadas.

PALABRAS CLAVE: IPv6, BGP, QoS, 802.11a

¹ Departamento de Computación, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. E-mail: aacurero@fec.luz.edu.ve

² Licenciatura en Computación, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Quality of Service between autonomous systems with links at 5.7 GHz and last mile wireless services by using IPv6.

ABSTRACT

Nowadays, the study of wireless connectivity between Autonomous Systems has not been explored widely, therefore is sought to relate the new addressing protocol IPv6 with this problem. Consequently, the objective of this research was to analyze the behavior of IPv6 Autonomous Systems connected by links of 5.7 GHz using QoS metrics and mobile nodes. Applying the principles of Bisquerra (2000), methodology was established in four (4) phases divided into: information compilation, topology design and / or test environments, test data collection and measurement of results and, treatment and statistical analysis of the data. The results of the comparative analysis between IPv6 and IPv4 in this network environment, showed that IPv6 generally has a lower performance compared to IPv4, but also through the use of ANOVA statistical method it is concluded that due to irrelevant differences, IPv6 does not influence the performance of a network with the studied features significantly.

KEYWORDS: IPV6, BGP, QOS, 802.11A

Introducción

El crecimiento exponencial de Internet está llevando hacia el agotamiento de las direcciones IPv4, es decir a la progresiva merma de la cantidad de direcciones IPv4 disponibles. Como consecuencia, este crecimiento desmesurado se ha convertido en el factor impulsor en la creación y adopción de diversas nuevas tecnologías, incluidas las direcciones CIDR (Classless Inter-Domain Routing, en inglés) y NAT (Network Address Translation, en inglés) como soluciones a corto plazo, mientras que el IPv6 se ve como un remedio a largo plazo para el agotamiento de las direcciones IPv4 (Bagnulo, 2004).

El nuevo protocolo, no sólo ofrece un espacio mayor de direcciones, sino que además mejora o soluciona algunos problemas de su antecesor IPv4, tales como Direccionamiento público a cada dispositivo conectado a Internet, Movilidad basado en IPv6 (MIPv6) y mayor nivel de Seguridad (IPsec) por defecto (Díaz et al, 2007).

Estas nuevas características de IPv6 permiten dar mayor confiabilidad a las redes inalámbricas. Por lo tanto, su implementación se extiende hasta las redes a gran escala como el caso de los Sistemas Autónomos, que según Fabero (2008), son comúnmente los Proveedores de Servicios de Internet (ISP, por sus siglas en inglés) de un país, organizaciones transnacionales e instituciones de gran flujo de datos en sus redes, y que por razones geográficas no siempre puede enlazarse con medios alámbricos.

Actualmente, los Sistemas Autónomos se comunican entre sí bajo el protocolo IPv4 y BGP (Border Gateway Protocol, en inglés), el cual es un protocolo de enrutamiento externo que comunica enrutadores de diferentes sistemas autónomos (Cisco Systems, 2012). Sin embargo, la gran madurez que está experimentando últimamente IPv6, obliga que los Sistemas Autónomos lo implementen lo más rápido posible. Además, debido a la diferencia del tamaño de la cabecera de los paquetes entre el protocolo Ipv4 e IPv6 se hace notable el estudio comparativo en este ambiente de los Sistemas Autónomos, especialmente en enlaces inalámbricos donde se ha comprobado que se obtienen notables pérdidas de señal con respecto a los enlaces cableados (Flickenger, 2006).

Una de las motivaciones principales de este estudio radica en que "...mientras más tiempo se deje pasar en empezar a habilitar y probar IPv6, mayores serán los costos en inversión en aspectos como actualizaciones en Humanware, software y hardware; aunque se estima que los precios más altos en la transición a IPv6 ocurrirán con el entrenamiento y no con el software" (Fernández, 2007, s/p).

Además, la implementación de este protocolo IPv6 resuelve ampliamente las deficiencias nativas del IPv4, tanto a nivel de seguridad como movilidad, sin olvidar de la solución que daría IPv6 al problema del agotamiento de direcciones IP. Con esto, se permitiría la incorporación de nuevos dispositivos que tendrán direcciones IP públicas sin ningún inconveniente, logrando que estos aparatos se comuniquen entre sí sin restricciones de redes privadas del NAT. (Millán, 2012)

Sin embargo, en la actualidad existe muy poco material sobre el estudio de conectividad inalámbrica entre Sistemas Autónomos tanto en la Web como los libros textuales. Por lo tanto, se buscó con esta investigación ofrecer a estos sistemas las grandes ventajas del enlace no cableado, de las cuales cabe destacar que el vínculo inalámbrico puede ser un reemplazo idóneo para aquellas situaciones que el cableado es imposible de implementar.

Además la frecuencia 5.7 Ghz es una frecuencia autorizada sin licencia y muy poco usada ya que en el mercado disponen principalmente de dispositivos inalámbricos de frecuencia 2.4 Ghz, por lo que se puede obtener mayores beneficios tales como la casi inexistencia de interferencia de dispositivos operativos en el nivel del espectro 5.7 Ghz, logrando una mejor distribución y aprovechamiento de aparatos inalámbricos.

De esta forma, con el problema antes descrito, fue necesario desarrollar un esquema para medir el rendimiento de una red con políticas de Calidad de Servicio, en Sistemas Autónomos bajo BGP conectadas inalámbricamente a 5.7 Ghz y nodos móviles en los extremos usando el protocolo emergente IPv6, a fin de verificar la estabilidad del enlace a esa frecuencia, estudiando, entre otros aspectos, la relación de las características del nuevo protocolo con respecto a las pérdidas asociadas a enlaces de este tipo.

1. Aspectos teóricos

1.1. Protocolo de Internet versión 6 (IPv6)

Díaz y colaboradores (2007) manifiestan que IPv6 es la nueva versión del protocolo de Internet, que es básico para el funcionamiento de la Red y cuyas primeras especificaciones fueron desarrolladas por Internet Engineering Task Force (IETF) en los años noventa. La motivación principal de la transición al nuevo protocolo es la expansión de las direcciones públicas disponibles de Internet, que permitirá la conexión a la Red de múltiples dispositivos como PDAs y teléfonos móviles. Otro factor clave para la adopción del nuevo protocolo es la expansión del uso de las tecnologías basadas en el concepto 'always-on' o siempre conectados como DSL, cable, Ethernet hasta la casa, fibra óptica, PLC, entre otros.

Las ventajas de IPv6 son, además de un mayor espacio para las direcciones, la escalabilidad, ya que ha sido diseñado para crecer sin los límites y parches de IPv4; una seguridad implícita, pues IPsec es obligatorio como parte del protocolo; y la movilidad, ya que facilita la nueva generación de aplicaciones (Millán, 2012), teniendo cabida en la creciente movilidad de los usuarios de Internet y las redes domésticas con avanzados sistemas de televigilancia, control, y seguridad, entre otros.

Entre sus aspectos más importantes está un mayor espacio de direcciones, paquetes eficientes y extensibles, reenumeración y multi-homing (que facilita el cambio de proveedor de servicios), movilidad, calidad de servicio y clases de servicios, seguridad, auto configuración de los nodos, aplicaciones anycast y multicast, Wireless, End to end (no usa NAT).

1.2. Calidad de Servicio

La calidad de servicio (QoS, por sus siglas en inglés) se encarga de proveer un nivel de servicio para que las diferentes aplicaciones que usen la red se puedan beneficiar de ella de manera apropiada, y ya que no todas las aplicaciones tienen los mismos niveles de exigencia de la red, busca asignar a cada una la exigencia que requiera. Al utilizar la calidad de servicio, distintas aplicaciones de red pueden coexistir en la misma red sin consumir cada una el ancho de banda de las otras (Certain, 2009).

Según Álvarez (2005), cada red puede tomar ventaja de distintos aspectos en implementaciones de QoS para obtener una mayor eficiencia, ya sea para redes de pequeñas corporaciones, empresas o proveedores de servicios de Internet.

En términos generales, explica el mismo autor que puede definirse la Calidad del Servicio (QoS) como la capacidad que tiene un sistema de asegurar, con un grado de fiabilidad preestablecido, que se cumplan los requisitos de tráfico, en términos de perfil y ancho de banda, para un flujo de información dado.

1.3. Estándar WLAN 802.11a

La norma IEEE 802.11 es un estándar en continua evolución, por lo que ha sufrido varias modificaciones y extensiones a lo largo de su corta vida, y es por ello que aún hoy en día van apareciendo nuevas especificaciones. Este estándar no especifica una tecnología o implementación concretas, sino simplemente el nivel físico y el subnivel de control de acceso al medio (MAC), siguiendo la arquitectura de sistemas abiertos OSI/ISO.

802.11a: La revisión 802.11a al estándar original fue ratificada en 1999. El estándar 802.11a utiliza el mismo juego de protocolos de base que el estándar original, opera en la banda de 5 GHz y utiliza

52 subportadoras por multiplexación por división de frecuencias ortogonal (OFDM, por sus siglas en inglés) con una velocidad máxima de 54 Mbit/s, lo que lo hace un estándar práctico para redes inalámbricas con velocidades reales de aproximadamente 20 Mbit/s. La velocidad de datos se reduce a 48, 36, 24, 18, 12, 9 o 6 Mbit/s en caso necesario. 802.11a tiene 12 canales no solapados, 8 para red inalámbrica y 4 para conexiones punto a punto. No puede interoperar con equipos del estándar 802.11b, excepto si se dispone de equipos que implementen ambos estándares.

1.4. Sistemas autónomos

Según Goitia (2003), un sistema autónomo (SA) será la subred que es administrada por una autoridad común, que tiene un protocolo de ruteo homogéneo mediante el cual intercambia información en toda la subred y que posee una política común para el intercambio de tráfico con otras redes o sistemas autónomos. En Internet se dan, al menos, dos niveles jerárquicos de ruteo, el que realiza dentro de un sistema autónomo y el que se efectúa entre sistemas autónomos.

Habitualmente, el SA es visto como una única entidad. Cada SA tiene un número identificador de 16 bits, que se le asigna mediante un Registro de Internet (como RIPE, ARIN, o APNIC), o un proveedor de servicios en el caso de los SA privados. Así, se consigue dividir el mundo en distintas administraciones, con la capacidad de tener una gran red dividida en redes más pequeñas y manipulables. Existen casos de que se junten varios SA, cada uno de estas asociaciones utilizará un router de gama alta que llamaremos router fronterizo, cuya función principal es intercambiar tráfico e información de rutas con los distintos routers fronterizos. Así, un concepto importante de comprender es el tráfico de tránsito, que no es más que todo tráfico que entra en un SA con un origen y destino distinto al SA local.

1.5. Protocolo de Enrutamiento de Pasarela Frontero: BGP

Goitia (2003), menciona que dentro de un solo SA, el protocolo de enrutamiento recomendado en Internet es el OSPF (aunque no es el único en uso). Entre los SA se usa un protocolo diferente, el BGP (Border Gateway Protocol o protocolo de pasarela frontera). Se requiere un protocolo diferente entre los SA, ya que las metas de un protocolo de pasarela interior y un protocolo de pasarela exterior no son iguales.

Es por eso que Stallings (2004) explica que el protocolo de pasarela de frontera (BGP) se desarrolló para su uso en conjunción con interconexiones en redes que empleen la arquitectura de protocolo TCP/IP, aunque los conceptos son aplicables a cualquier interconexión de redes. El protocolo de pasarela frontera se ha convertido en el protocolo de dispositivo de enrutamiento exterior preferido para Internet, diseñado para permitir la cooperación en el intercambio de información de enrutamiento entre dispositivos de enrutamiento de diferentes sistemas autónomos (SA), llamado pasarelas en el estándar.

2. Metodología utilizada

Para determinar cómo influye el protocolo Ipv6 con QoS en Sistemas Autónomos conectados por Enlace Inalámbrico a 5.7 Ghz, en esta investigación se siguió la metodología de Bisquerra (2000) que se describe a través de las siguientes fases:

Fase I: Recopilación de información

Para el desarrollo de la investigación se recopiló información muy importante referente a los mecanismos, estructuras y configuración de calidad de servicio para cada protocolo IP, redes de área local inalámbrica, comandos de configuración de enrutadores, entre otros, utilizando los dos protocolos en comparación, Ipv6 e Ipv4,

configuración de puntos de acceso y las características del protocolo Ipv6. Además de éstos, se tuvo la necesidad de buscar y conocer software de monitoreo de red a fin de escoger el que mejor se adaptaba a la investigación. Así, entonces, fueron estudiados por medio de búsquedas en Internet, consultas de tesis, guías, revistas, libros, entre otras.

Fase II: Diseño y desarrollo de topologías y/o ambientes de pruebas de la red

En ésta se llevó a cabo la conexión total de los equipos pasivos y activos a través del diseño de una red WAN inalámbrica y nodos móviles. La topología implementada se muestra en la figura No. 1 y debido a que el modelo de enrutadores CISCO 1721 sólo disponen de una interfaz Ethernet, y para este entorno de trabajo se requería un mínimo de dos interfaces Ethernet (Una para el Access Point y el otro para la Antena Ubiquiti), se tuvo que agregar un Switch CISCO 2924 en cada extremo y utilizar VLAN (Virtual LAN en inglés) para imitar que los enrutadores CISCO tuvieran más de dos puertos Ethernet.

Luego, se procedió a conectar físicamente todas las interfaces Ethernet entre el AP, Switch y el enrutador mediante el cable UTP (Cat 5) para simular un Sistema Autónomo (SA). Así mismo, se hizo un procedimiento similar en el otro extremo para crear otro Sistema Autónomo. Posteriormente, se configuraron dos Antenas (AP Ubiquiti) en cada uno extremo de los dos Sistemas Autónomos creando un Enlace Inalámbrico a 5.7 Ghz. Seguidamente, se configuraron los dos APs de cada SA para formar dos redes inalámbricas en los extremos. Una vez finalizado esto, se inició la configuración de los distintos protocolos requeridos en este ambiente de pruebas, tales como RIPv2/RIPng, OSPF, BGP con IPv4 / IPv6.

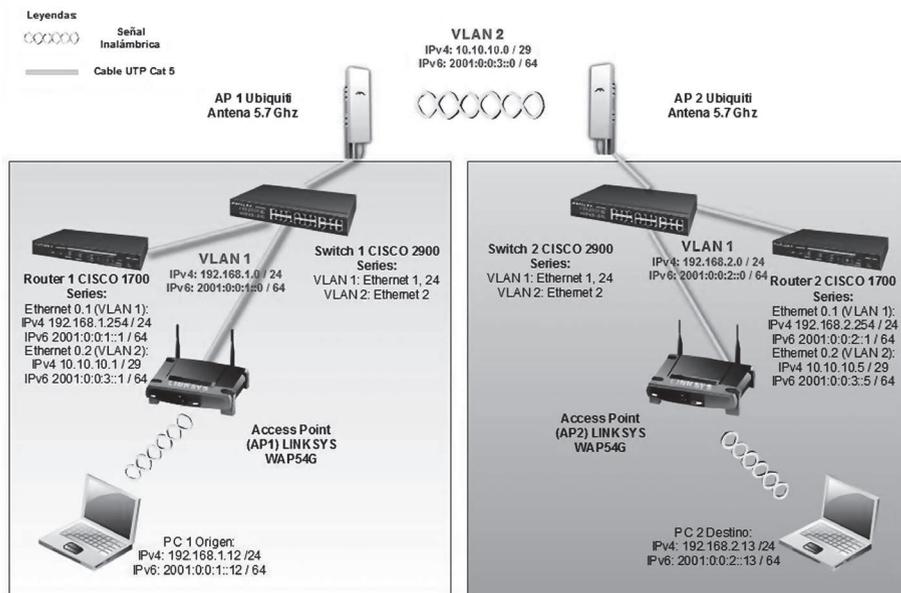


FIGURA 1: Topología y/o ambiente de pruebas
 Fuente: Autores (2012)

La comunicación y configuración con los enrutadores y switches CISCO se estableció por medio de un cable de consola a través de la interfaz de línea de comando de un programa de Terminal (Hyper Terminal). Finalmente, se procedió a configurar las PCs en cada extremo de los SA asignándoles direcciones IPv4 e IPv6 a través de la interfaz de red inalámbrica de Windows.

Fase III: Pruebas de medición y recopilación de información de las mismas

Para conseguir un análisis representativo de la QoS en cada protocolo fue necesario disponer de un número óptimo de pruebas realizadas; por este motivo se hicieron de tres (3) repeticiones de cada prueba para garantizar datos más confiables (Montgomery, 2004). Asimismo, los valores reflejados en las tablas de los parámetros (indicadores) estudiados se refieren a su valor promedio. En otras palabras, se promedian los resultados de las tres mediciones realizadas.

Dichas pruebas fueron establecidas en base a la variación del porcentaje de prioridad del ancho de banda que le fue asignado a cada uno de los tres tipos de tráfico (Video, Dato y Voz) a ser enviados, junto con variación de congestionamiento de tráfico de la red, para evaluar cómo se comportaba QoS en ambos protocolos y con distintos niveles de congestionamiento y estableciendo varios puntos de comparación entre los mismos.

Los datos fueron recopilados mediante software de Generación de Tráfico Distribuido DITG (versión 2.6.1d), Wireshark (versión 1.4.4), VideoLAN e IPERF. Del mismo se recopilaron parámetros de medición para establecer el comportamiento de una red, en base al tráfico que se generó; por consiguiente, estos datos fueron almacenados, clasificados y ordenados de manera adecuada, distinguiendo entre cada prueba definida.

Se detectó el ancho de banda disponible desde una PC de un extremo a otra PC del otro extremo, arrojando como resultado óptimo 16.9Mbits/sec. Una vez conocido el ancho de banda disponible en el ambiente, y sabiendo que la QoS funcionaba sólo en caso de congestionamiento, se diseñaron tres tipos de Tráfico que se describen de la siguiente manera:

- Tráfico Datos: Este flujo de tráfico simula la transmisión de tráfico UDP, en las cuales se enviaron paquetes de tamaño 540 bytes, tamaño por defecto del programa DITG para representar una transmisión constante de datos.
- Tráfico Voz: Este flujo de tráfico también fue de UDP, en la cual se enviaron paquetes de tamaño 144 bytes, en el cual se utilizó el códec G.711 de flujo de voz con la técnica de codificación VAD (Propuesta por DITG).
- Tráfico Video: Este flujo de tráfico fue de RTP (Real Time Protocol, siglas en inglés), pero estos paquetes son de tamaño 1390

bytes para IPv6 y 1370 bytes para IPv4, estos valores fueron generados automáticamente por el VideoLAN y capturados por el Wireshark.

En base a estos tres tipos de tráfico antes mencionados, se crearon los siguientes parámetros de pruebas de tráfico a criterio del investigador para colapsar el ancho de banda disponible en este ambiente de red:

1. Tráfico Bajo:

- 1.1. Datos: Se enviaron 200 paquetes por segundo durante 60 segundos, para un total de 12000 paquetes.
- 1.2. Voz: Se enviaron 100 paquetes por segundo durante 60 segundos, para un total de 6000 paquetes.
- 1.3. Video: Se enviaron 25874 paquetes.

2. Tráfico Medio:

- 2.1. Datos: Se enviaron 2000 paquetes por segundo durante 60 segundos, para un total de 120000 paquetes.
- 2.2. Voz: Se enviaron 500 paquetes por segundo durante 60 segundos, para un total de 30000 paquetes.
- 2.3. Video: Se enviaron 25874 paquetes.

3. Tráfico Alto:

- 3.1. Datos: Se enviaron 4000 paquetes por segundo durante 60 segundos, para un total de 240000 paquetes.
- 3.2. Voz: Se enviaron 1000 paquetes por segundo durante 60 segundos, para un total de 60000 paquetes.
- 3.3. Video: Se enviaron 25874 paquetes.

Cabe destacar que se transmitió el mismo video en los diferentes tipos de tráfico por no contarse con el software para enviar un segmento de video, pero se ajustó el tráfico de datos y voz según cada ambiente de prueba, tal como se especifica en la siguiente sección. Este criterio se establece dado que buscó forzar el funcionamiento de la QoS para cada ambiente.

Ambientes de prueba

Basado en lo anterior, se puede decir que en esta investigación se usaron varios ambientes de pruebas, variando los parámetros de prueba de tráfico antes descritos y las prioridades que se le daba a cada tipo de tráfico (individual) a través de políticas de calidad de servicio en el enrutador. Dichos ambientes contemplaron el uso de IPv4 e IPv6 por separado, con y sin QoS, quedando establecidos de la siguiente manera:

- a. Condiciones de la red en IPv4 /IPv6 sin QoS enviando:
 - Tráfico Bajo
 - Tráfico Medio
 - Tráfico Alto

- b. Condiciones de la red en IPv4 / IPv6, con Calidad de Servicio y 55% del ancho de banda para Datos, 10% para el Video y 10% para la Voz, con envío de:
 - Tráfico Bajo
 - Tráfico Medio
 - Tráfico Alto

- c. Condiciones de la red en IPv4 / IPv6, con Calidad de Servicio y 10% del ancho de banda para Datos, 55% para el Video y 10% para la Voz, con envío de:
 - Tráfico Bajo
 - Tráfico Medio
 - Tráfico Alto

- d. Condiciones de la red en IPv4 / IPv6, con Calidad de Servicio y 10% del ancho de banda para Datos, 10% para el Video y 55% para la Voz, con envío de:
 - Tráfico Bajo
 - Tráfico Medio
 - Tráfico Alto

Fase IV: Análisis comparativo, teórico y estadístico

En esta fase, se realizó un estudio comparativo entre el protocolo actual (IPv4) y el protocolo en estudio (IPv6), ya que a la fecha es el único punto de comparación, lo cual permite establecer conclusiones más ajustadas a la realidad. Seguidamente, se realizó una sustentación teórica de los resultados obtenidos y finalmente, se realizó un análisis estadístico. Para tales efectos, se trabajó con el software estadístico SPSS versión 15, utilizando la distribución Fisher y el procedimiento ANOVA. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente: la variable independiente está conformada por el Protocolo IP (IPv4 e IPv6), y las variables dependientes pertenecen al conjunto relativo al rendimiento de la red (% de Paq. Perdidos, Delay, Bitrate).

El modelo estadístico utilizado es: $y_{ij} = \mu + \alpha_i - \varepsilon_{ij}$

Donde: $i=1, \dots, n$ $j=1, \dots, m$

n es el número de repeticiones y m el número de casos
 y = var dependiente: % de Paq. Perdidos, Delay, Bitrate
 μ = media del caso
 α = var independiente: los dos protocolos (IPv4 e IPv6)
 ε_{ij} = error experimental

3. Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos se resumen en tres (3) tablas (gráficos) categorizadas por Indicadores de QoS:

- Porcentaje de Paquetes Perdidos:

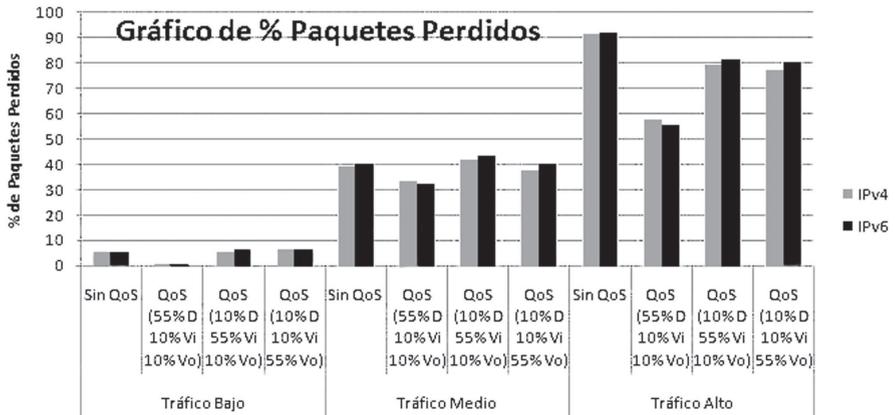


GRÁFICO N° 1: Gráfico de Porcentaje de Paquetes Perdidos.

Fuente: Autores (2012).

En términos generales, IPv4 tuvo mejor comportamiento que IPv6 aunque no fue con amplio margen, según la visualización del gráfico. Sin embargo, en los ambientes con implementación de QoS y en los cuales donde la mayor prioridad de ancho de banda se da al tráfico de DATOS, se pudo apreciar una pequeña mejora de IPv6 con respecto a IPv4.

- Delay (Latencia):

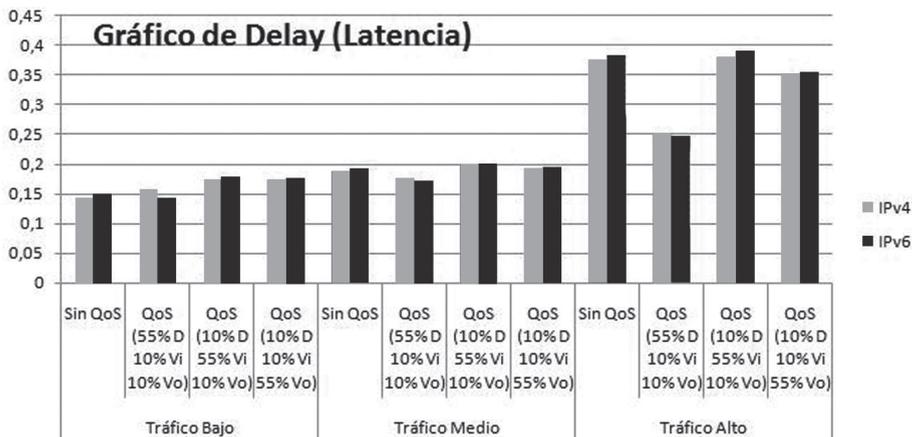


GRÁFICO N° 2: Gráfico de Delay (Latencia).
Fuente: Autores (2012).

En esta categoría, se pudo apreciar que IPv4 funcionó mejor que el nuevo protocolo IPv6. Con la excepción de los ambientes de QoS con mayor prioridad de ancho de banda para tráfico de DATOS, en los cuales el IPv6 salió victorioso frente a IPv4 con un margen mínimo.

- *Bitrate*:

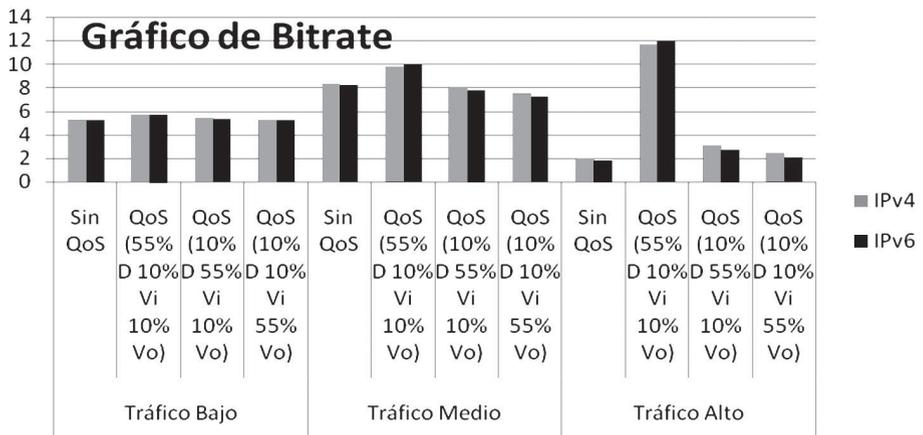


GRÁFICO N° 3: Gráfico del Bitrate.

Fuente: Autores (2012).

En este renglón, el IPv6 tuvo un comportamiento inferior comparado con el IPv4, ya que en la mayoría de los ambientes de pruebas fue igual o inferior. Pero, en los casos de ambientes con QoS y la mayor prioridad de ancho de banda en el tráfico de DATOS, el IPv6 fue mejor que el IPv4 aunque fue por una mínima diferencia.

3.1 Sustentación teórica de los resultados

En líneas generales, para estas pruebas se evidencia que IPv4 tuvo un mejor comportamiento que IPv6, aún cuando las diferencias fueron mínimas. Asimismo, la relación entre los cuatros indicadores medidos no muestra tendencias anormales. Es decir, se demuestra que mientras mayor es la latencia y el número de paquetes perdidos, menor es el bitrate (situación mayormente notable en la congestión); tal y como lo especifica García (2002), cuando describe

que al ir aumentando la congestión de una red, se activan mecanismos de anticongestión que generan disminución en el bitrate.

Según Odom (2004), la latencia también se ve afectada por un retardo de la señal en los medios, como así también por el retardo añadido por el procesamiento de las señales mediante hubs y repetidores.

Asímismo, se comprueba que esta pérdida se da porque la energía de la señal radiada se expande en función de la distancia desde el transmisor (Flickenger, 2006).

La pérdida también puede producirse cuando los nódulos congestionados de la red dejan caer los paquetes. Algunos protocolos de redes, como TCP, brindan protección de caída de paquetes al retransmitir los paquetes que pueden haber caído o que pueden haber sido corrompidos por la red. A medida que la red se congestiona más, caen más paquetes y hay más retransmisiones de tipo TCP (CNX Anixter, 2011: s/p).

Con respecto al número de paquetes perdidos, y debido a que las transmisiones realizadas estuvieron basadas en el protocolo UDP, el cual no está orientado a conexión, la pérdida de paquetes se produce por descartes de paquetes que no llegan a tiempo al receptor, permitiendo una degradación de la comunicación (menor bitrate) (Harrington, 2003).

4. Resultados del análisis estadístico

A continuación se analizan estadísticamente los resultados obtenidos a partir de los ambientes y las pruebas descritas:

- *Porcentaje (%) de Paquetes Perdidos:*

En todos los ambientes a realizar, se pudo apreciar que el F arrojado por ANOVA es mucho menor que el Ftab (7,71) y además la

significancia (Sig) asociada en la tabla ANOVA también es mucho mayor que el coeficiente de significancia (0,05). Por lo que se pudo afirmar que no hubo diferencias significativas entre IPv4 e IPv6 en este indicador.

- *Delay (Latencia):*

Al igual que el indicador anterior, se pudo notar que en todos los ambientes a realizar, el F arrojado por ANOVA es mucho menor que el F_{tab} (7,71) y además la significancia (Sig) asociada en la tabla ANOVA también es mucho mayor que el coeficiente de significancia (0,05). Por lo que se pudo afirmar que no hubo diferencias significativas entre IPv4 e IPv6 en esta categoría.

- *Bitrate:*

En este indicador se pudo observar un comportamiento equivalente a todos los indicadores anteriores, por lo que se puede afirmar que no hubo diferencias significativas entre IPv4 e IPv6 en este contorno.

Conclusiones

Cuando se establecen políticas de calidad de servicio donde la mayor prioridad es para tráfico que no son de tiempo real, IPv6 tiende a comportarse mejor que IPv4 aún cuando no es significativo estadísticamente. Asimismo, el uso de una cabecera más grande en IPv6, influye en el aumento de los retardos y disminución del bitrate, debido al tiempo de procesamiento de los paquetes en los dispositivos activos como enrutadores, conmutadores y puntos de acceso.

Por otra parte, la utilización del protocolo IPv6 en ambientes de producción con QoS similares a los utilizados en esta investigación, no influye significativamente en el desempeño de la red respecto a entornos IPv4 con las mismas características usadas. A pesar de que

IPv6 presenta en general un menor desempeño frente a IPv4, esta diferencia puede considerarse no significativa, IPv6 aún está en su etapa de madurez, ya que IPv6 es un protocolo que fue construido en base a la experiencia obtenida con IPv4. Por lo tanto, puede concluirse que su uso no altera de manera significativa el desempeño de Sistemas Autónomos conectados por enlaces inalámbricos a 5.7 GHz.

Por último, el hecho de utilizar enlaces de 5.7 GHz genera una pérdida de paquetes superior a otros enlaces de otras frecuencias y enlaces cableados, debido al factor distancia, donde la pérdida de espacio libre puede aumentar, ya que la potencia de la señal tiende a disminuir. Por tanto, el estudio de las condiciones de los enlaces inalámbricos entre sistemas autónomos, es un factor determinante dada la envergadura de los sistemas a interconectar.

Referencias

- Álvarez S. (2005). *Estudio y configuración de calidad de servicio para protocolos ipv4 e ipv6 en una red de fibra óptica WDM*. Universidad Politécnica Federico Santa María, Chile. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rfacing/v13n3/art15.pdf>. (Página consultada el 12 de Mayo de 2009).
- Bagnulo, Marcelo (2004). *¿Por qué IPv6?* [On-Line]. Dirección URL: <http://lacnic.net/documentos/lacnicvi/why-IPv6-lacnicVI.pdf> (Página consultada el 12 de Mayo de 2009).
- Bisquerra, R. (2000). *Manual de orientación y tutoría*. Barcelona. Praxis, 271-293.
- Certain A. (2009). *Calidad de Servicio (QoS)*. [En Línea]: <http://www.alfredcertain.com/?p=9>. (Página consultada el 12 de Mayo de 2009).

Cisco Systems (2012). *Border Gateway Protocol (BGP)*. [On-Line]. Dirección: URL: http://www.cisco.com/en/US/tech/tk365/tk80/tsd_technology_support_sub-protocol_home.html. (Página consultada el 25 de enero de 2012).

CNX Anixter (2011). *La importancia de la Calidad de Servicio (QoS) - Parte II*. Revista en Línea: CNX Anixter, Año 2011 - N° 132, 06 de Junio de 2011. [On-Line]. Dirección URL: http://www.anixtersoluciones.com/latam/cl/informacion_general/2078/la_importancia_de_la_calidad_de_servicio_qos___parte_ii_es.htm (Página consultada el 22 de Junio de 2011).

Díaz Miguel A., Morales César O., García S. Pedro (2007). *Despegando con Movilidad IPv6 (MIPv6)*. [On-Line]. Dirección URL: http://www.ist-enable.eu/open/enable_pu_paper_consulintel_despegando_con_MIPv6_AUI_v1_5.pdf (Página consultada el 12 de Mayo de 2009).

Fabero, Juan Carlos (2008). *Tecnologías Avanzadas de Redes y Telecomunicaciones*. [On-Line]. Dirección URL: <http://www.fdi.ucm.es/profesor/jcfabero/Asuncion/bgp.pdf> (Página consultada el 13 de Mayo de 2009).

Fernández Alcántara, Azael (2007). *Direcciones IPv4 ¿recurso de Internet en agotamiento?* [On-Line]. Dirección URL: <http://www.enterate.unam.mx/Articulos/2007/junio/art1.html> (Página consultada el 8 de Junio de 2009).

Flickenger Rob (2006). *Creative Commons. Redes Inalámbricas en los Países en Desarrollo*. Editorial Limehouse Book Sprint Team.

García, J. (2002). *Redes de Comunicación: conceptos fundamentales y arquitecturas*. Madrid. Editorial: MC Graw Hill-Madrid.

Goitia, Maria Julieta (2003). *Protocolos de Enrutamiento Un Simulador Didáctico*. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Exactas, Licenciatura en Sistemas, Argentina.

Harrington Donna L. (2003). *Shooting Trouble with IP*. [On-Line]. Dirección URL: <http://www.ciscopress.com/articles/article.asp?p=98156&seqNum=2>

Millán R. (2012). *Qué ha pasado con IPv6?* [En línea]. Disponible en: <http://www.ramonmillan.com/documentos/estadoipv6.pdf>. (Página consultada el 25 de enero de 2012).

Montgomery D. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Segunda Edición. Editorial Limusa Wiley.

Odom Wendell (2004). *Networking First-Step: How to Build a Local (Network) Roadway*. [On-Line]. Dirección URL: <http://www.ciscopress.com/articles/article.asp?p=174105&seqNum=2>

Stallings, William (2004). *Comunicaciones y Redes de Computadores*. Séptima Edición. Madrid. España. McGraw-Hill Internacional, S.A.

Efectos de interfase y superficie en películas delgadas de Fe (001)

José R. Fermin¹

RESUMEN

Se emplea la Resonancia Ferromagnética (FMR) para estudiar los efectos de interfase y superficie en películas delgadas magnéticas. Para esto, se depositó una serie de películas delgadas de Fe sobre sustratos monocristalinos de MgO(001). Las anisotropías magnéticas son estudiadas en función del ángulo azimutal y espesor de las películas. Mostramos que las propiedades magnéticas son debidas al efecto combinado de las anisotropías magnéticas, y a la competencia entre los mecanismos de conducción y las dislocaciones de las anisotropías.

PALABRAS CLAVE: películas delgadas magnéticas, nanoestructuras magnéticas, resonancia ferromagnética, anisotropías magnéticas, efectos de interfase.

¹Departamento de Física, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Aptdo. Postal 526, Maracaibo 4001, Zulia, Venezuela. E-mail: jfermin70@gmail.com

Interface and surface effects in thin films of Fe

ABSTRACT

Ferromagnetic Resonance technique (FMR) has been employed to study the interface and surface effects on the magnetization of thin magnetic films. For this, a series of Fe thin films were deposited into single crystalline MgO (001) substrates. The magnetic anisotropies are studied as functions of the in-plane angle, and film thickness. As the result we showed that the magnetic properties in these materials are due to the combined effect of magnetic anisotropies, and a competition between conduction mechanisms and anisotropy dislocations.

KEYWORDS: magnetic thin films, magnetic nanostructures, ferromagnetic resonance, magnetic anisotropies, interface effects

Introducción

Los avances recientes en las técnicas de deposición de películas delgadas, han permitido la deposición epitaxial de nano-estructuras ferromagnéticas de apenas algunas monocapas. Estas películas son depositadas sobre un substrato con estructura de un monocristal, con los ejes cristalinos bien definidos. En estos sistemas, cada capa atómica está acoplada por interacción de intercambio, dando origen a un momento magnético cuya orientación es determinada por las anisotropías magnéticas. En particular, en una película monocristalina de Fe, la magnetización está restringida al plano de la película y en la dirección del eje cúbico [100], en la ausencia de campo externo. Adicionalmente, en la medida que el espesor de la película disminuye, la tendencia del material para formar dominios también disminuye. Esto justifica, en la mayoría de los casos, los modelos fenomenológicos de mono-dominios con rotación coherente (Cow-

burn, et. al, 1995; Florczak y Dan Dahlberg, 1992; Dieny, et. al, 1990; Nowak, 1992).

Las películas delgadas monocristalinas de Fe son entonces, candidatos naturales para estudiar efectos de interfaces tales como, transiciones de fase [Hu y Kawazoe, 1995; Abanov, et. al., 1995; Morozov y Sigov, 1997; Zhang y Yang, 1995], observación de dominios (Gu, et. al., 1995; Slonczewsky y Middelhoek, 1965; Politi, 1998), anisotropías magnéticas (Johnson, et. al., 1996), rugosidades (Kudrnovsky, et. al., 1996; Palasabtzas, 1997), oxidación de superficies (Kock y Geus, 1985; Salviatti, 1997), etc.

El interés en el estudio de las propiedades magnéticas de interfaces monocristalinas ferromagnéticas/semiconductoras(aislantes), es debido en gran parte, al potencial de aplicación en la fabricación de heteroestructuras microelectrónicas magnéticas (Prinz, 1994). Estas interfaces poseen propiedades más favorables para la microelectrónica que otros sistemas ya conocidos.

Los sustratos más usados en la epitaxia de películas delgadas de Fe son los monocristalinos, entre ellos: GaAs (001)(Li, et. al., 1998; Tustinson, et. al., 1987), MgO (001)(Lairson, et. al., 1995; Lawler, et. al., 1997; Mühge, et. al., 1994), Si (001) y Si (111)(Heinrich y Cox, 1994; Ustinov, et. al., 1994), Ag (001) (Laidler, et. al., 1996; Goryunov, et. al., 1995), Al₂O₃ (1120) (Mühge, et. al., 1994), etc. Estos sustratos son de gran interés en la fabricación de dispositivos electrónicos, y combinándolos con materiales ferromagnéticos, se pueden producir estructuras híbridas epitaxiales para aplicaciones en microelectrónica. En particular, la superficie (001) del MgO es muy estable, con estructura ideal casi similar a la del material masivo (Heinrich y Cox, 1994). Esto ofrece la posibilidad de depositar películas monocristalinas de Fe con espesores desde algunas monocapas hasta películas relativamente gruesas. El sistema Fe/MgO (001) epitaxial, es también usado como capa intermedia (o buffer layer) en la fabricación de multicapas y otros sistemas más complejos (Ustinov,

et. al., 1996). Las técnicas más usadas en la epitaxia de películas delgadas de Fe sobre MgO (001) son el magnetron sputtering (RF o DC) (Harp y Parkin, 1996) y MBE (Mühge, et. al., 1994).

En este trabajo presentamos un estudio sobre las propiedades magnéticas de películas delgadas monocristalinas de Fe, crecidas sobre substratos de MgO (001) mediante DC magnetron sputtering. Mostramos que la relajación ferromagnética de la película es debida a la formación de dislocaciones interfaciales y que las propiedades magnéticas en películas muy delgadas son controladas por la competencia entre las anisotropías uniaxial y cúbica.

1. Metodología experimental

Para el estudio de las propiedades magnéticas de películas delgadas ferromagnéticas, fueron depositadas películas de Fe sobre substratos de MgO (001) obtenidos comercialmente. Los substratos fueron sometidos al tratamiento de limpieza con ultrasonido, en baño de metanol durante 10 mins. Las películas fueron depositadas utilizando un sistema de sputtering Balzers/Pfeiffer PLS500, en la configuración vertical, o sputter-up, con distancia blanco-substrato de 9 cm. La cámara de deposición fue mantenida a una presión de base de 1.2×10^{-7} Torr antes del sputtering, y presión de Ar de 3.3×10^{-3} Torr, durante el sputtering. La pureza del argón y del blanco de Fe fue de 99.999% y 99.9%, respectivamente. La temperatura del substrato fue de 130°C y potencia aplicada de 20 W. La tasa de deposición para las películas de Fe fue de $\sim 1 \text{ \AA/s}$, con espesores entre 70 y 250 Å. La estabilidad de la superficie cúbica de MgO (001) y el parámetro de desacomplamiento ($\sim 3.8\%$) con relación a la red cristalina del Fe, facilitan la epitaxia de películas de Fe en un amplio rango de espesores. De esta manera es posible estudiar las propiedades de las películas y los efectos de interface a medida que el espesor de la película disminuye.

Las medidas de FMR fueron obtenidas como función de ángulo azimutal, φ , y en intervalo de frecuencias de 7.2 GHz hasta 12.3 GHz, en un espectrómetro VARIAN de banda X, empleando una cavidad cilíndrica con factor de calidad del orden de 2500. Un campo magnético homogéneo es aplicado en el plano de las películas, y modulado con un campo sinusoidal de 100 Hz. Las películas son montadas en un goniómetro que permite rotar el plano de las mismas de 0 a 360 grados.

2. Modelo fenomenológico

2.1. Campo de resonancia

El campo de resonancia es determinado a partir de la ecuación (Heinrich y Cochran, 1993):

$$\left(\frac{\omega}{\gamma}\right)^2 = \frac{1}{M^2 \sin^2 \theta} \left[\frac{\partial^2 E}{\partial \theta^2} \frac{\partial^2 E}{\partial \varphi^2} - \left(\frac{\partial^2 E}{\partial \theta \partial \varphi} \right)^2 \right]_{\theta_0, \varphi_0}, \quad (1)$$

donde θ y φ son los ángulos polar y azimutal de la magnetización y θ_0 y φ_0 indican las posiciones de equilibrio. Esta es la condición general de la resonancia, siendo la herramienta principal en la interpretación de los datos experimentales de FMR. Las posiciones de equilibrio (θ_0 , φ_0) son determinadas a partir de las derivadas de la energía libre magnética, apropiada para cada material en estudio, y mediante las condiciones de equilibrio $\partial E / \partial \theta = 0$ y $\partial E / \partial \varphi = 0$. Para el caso de una película ferromagnética con anisotropía cúbica, en el plano (001), con constante de anisotropía magnetocristalina K_1 , constante de anisotropía uniaxial en-el-plano K_u , constante de anisotropía perpendicular K_N y magnetización M y sometido a un campo magnético H . El ángulo θ es medido con respecto a la normal a la película y los ángulos φ , φ_u y φ_H con relación al eje cúbico [100]. La energía libre magnética por unidad de volumen de esta película es (Fermin, et. al., 1999):

36

$$E(\theta, \varphi) = -\mathbf{H} \cdot \mathbf{M} + \frac{K_1}{4} (\text{sen}^2 2\theta + \text{sen}^4 \theta \text{sen}^2 2\varphi) + 2\pi M_{\text{eff}}^2 \cos^2 \theta + K_u \text{sen}^2 \theta \text{sen}^2 (\varphi - \varphi_u) \quad ,$$

donde M^{eff} es una magnetización efectiva definida usualmente como $M^{\text{eff}} = 4\pi M - 2K_n/M$. Las posiciones de equilibrio de M son dadas por los ceros de las primeras derivadas de la energía con respecto a θ y φ . En el caso de películas ferromagnéticas tales como Fe, la posición de equilibrio perpendicular al plano es $\theta = \theta_0 = \pi/2$, y en el plano, es dada por la ecuación:

$$H_0 \text{sen}(\varphi_0 - \varphi_H) = -\frac{H_1}{4} \text{sen}(4\varphi_0) - \frac{H_u}{2} \text{sen}(\varphi_0 - \varphi_u) \quad , \quad (3)$$

donde $H_1 = 2K_1/M$ e $H_u = 2K_u/M$. Aplicando la ecuación de la resonancia (1) en $\theta = \theta_0 = \pi/2$ y $\varphi = \varphi_0$, obtenemos

$$\begin{pmatrix} \omega \\ \gamma \end{pmatrix}^2 = \left[H_0 \cos(\varphi_0 - \varphi_H) + \frac{H_1}{4} (3 + \cos 4\varphi_0) - H_u \text{sen}^2(\varphi_0 - \varphi_u) + 4\pi M_{\text{eff}}^2 \right] \times [H_0 \cos(\varphi_0 - \varphi_H) + H_1 \cos 4\varphi_0 + H_u \cos 2(\varphi_0 - \varphi_u)] \quad . \quad (4)$$

El campo de resonancia $H_0 = H_{\text{Res}}$, como función del ángulo en el plano (φ_H), es calculado a partir de esta ecuación, para ω fijo.

2.2. Ancho de línea

El estudio del ancho de línea de FMR es uno de los procedimientos más usados en la investigación de los mecanismos de relajación de películas delgadas magnéticas. El ancho de línea de FMR en metales masivos es debido principalmente al mecanismo de conducción y a la relajación intrínseca (Frait y Fraitová, 1980; Schreiber, et. al., 1995). En películas delgadas, otras contribuciones a ΔH deben ser consideradas. En estos sistemas, efectos de tamaño, de superficie y de interface modifican las anisotropías magnéticas y pueden

producir dispersión de los ejes locales de anisotropía (Ding y Zhu, 1994). Con esto en mente, el ancho de línea de FMR puede ser escrito en la forma

$$\Delta H = \Delta H_{\text{mom}} + \Delta H_{\text{hom}} \quad , \quad (5)$$

donde el primer término representa el ensanchamiento inhomogéneo de la línea debido a la presencia de inhomogeneidades y defectos, y el segundo termino representa el ensanchamiento homogéneo debido a los mecanismos intrínsecos y de conducción. Despreciando las propiedades dinámicas de la magnetización, la contribución de estos procesos al ancho de línea puede ser calculada mediante la expresión (Heinrich y Cochran, 1993):

$$\Delta H_{\text{hom}} = \frac{2}{\sqrt{3}} \left| \frac{\partial \omega}{\partial H_0} \right| M^2 \left(\frac{\partial^2 E}{\partial \theta^2} + \frac{1}{\text{sen}^2 \theta} \frac{\partial^2 E}{\partial \varphi^2} \right)_{\theta_0, \varphi_0} \quad , \quad (6)$$

donde $\partial \omega / \partial H_0$ es la derivada de (4) con respecto al campo aplicado, calculada en el equilibrio. Debido al hecho de que la energía libre magnética, E , presenta simetría definida, ΔH también exhibe simetría definida con relación al ángulo del campo en el plano, φ . Calculando las derivadas de E y ω para una película con anisotropía cúbica, e introduciendo los respectivos resultados en (6), obtenemos que ancho de línea homogéneo es:

$$\Delta H_{\text{hom}} = \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{G}{\gamma^2 M} \frac{\omega}{|\cos(\varphi_0 - \varphi_H)|} \quad , \quad (7)$$

Esta expresión tiene mínimos cuando el campo magnético está orientado en las direcciones de simetría de la película, y máximos en ciertas direcciones intermedias, donde el amortiguamiento de la magnetización es menor. El origen microscópico de esta viscosidad es la interacción spin-órbita, que acopla los spins con la red y está contenida en el parámetro de Gilbert, G . Cuando el principal meca-

38

nismo de relajación es la dispersión electrón-fonón, el parámetro G puede ser relacionado con el factor de Landé, g , mediante (Futamoto, et. al., 1994):

$$G \propto (g - 2)^2 \quad . \quad (8)$$

Si el factor- g es anisotrópico, el parámetro de Gilbert también será anisotrópico, y el ancho de línea de FMR exhibirá una simetría diferente de $1/\cos(\varphi_0 - \varphi_H)$. La parte inhomogénea del ancho de línea de FMR, ΔH_{Hinom} , en la ecuación (5), es debida a las imperfecciones y defectos en la muestra. Las imperfecciones más comunes en películas delgadas, son las mosaicidades o dislocaciones interfaciales (Ambrose, et. al., 1997), que inducen dispersiones en las anisotropías. Estas son introducidas para garantizar la relajación de la película.

Un intento para entender los mecanismos de relajación en películas delgadas ferromagnéticas es considerar que, debido a la presencia de las dislocaciones interfaciales, son inducidas dispersiones de los ejes locales de anisotropía. Fenomenológicamente, ΔH_{Hinom} puede ser expresado como:

$$\Delta H_{\text{inom}}(\omega, \varphi_H) = \left| \frac{\partial H_{\text{eff}}}{\partial \varphi_H} \right| \Delta \varphi_H + \left| \frac{\partial H_{\text{eff}}}{\partial \varphi_u} \right| \Delta \varphi_u + \Delta H(0) \quad , \quad (9)$$

donde $H_{\text{eff}} = \omega/\gamma$, es definido en la ecuación (4), el primer término es la contribución de la dispersión angular de los ejes cristalográficos, de acuerdo con Chappert (Chuang, et. al., 1994) y el segundo término es introducido para incluir los efectos de la dispersión del eje uniaxial (Baker, et. al., 1996). $\Delta \varphi_H$ y $\Delta \varphi_u$ son las dispersiones angulares de los ejes cristalino y uniaxial respectivamente. $\Delta H(0)$ es el término independiente de la frecuencia que está relacionado con la historia térmica del material y el proceso de preparación de la muestra. Considerando la energía libre (2), para una película cúbica

orientada en el plano (001) con anisotropía uniaxial, y calculando las derivadas indicadas en la expresión (9), obtenemos que el ancho de línea inhomogéneo es

$$\begin{aligned} \Delta H_{inom}(\omega, \varphi_H) = & \left\{ \frac{\omega}{2\gamma} \text{sen}2(\varphi_0 - \varphi_H) + \left[\frac{1}{2}(4\pi M_{eff}) + \frac{1}{4}H_1 \left(1 + \frac{1}{2}\cos 4\varphi_0 - \frac{1}{2}\text{sen}8\varphi_0 \right) \right] \right. \\ & \times \text{sen}(\varphi_0 - \varphi_H) + \text{sen}(\varphi_0 - \varphi_H) [\cos 2(\varphi_0 - \varphi_H) - \text{sen}4(\varphi_0 - \varphi_H)] \frac{1}{2}H_u \left. \right\} \Delta\varphi_H \\ & + \left\{ \frac{3}{4}H_u \cos(\varphi_0 - \varphi_H) + [4\pi M_{eff} H_u + H_1 H_u \left(1 + \frac{1}{2}\cos 4\varphi_0 - \frac{1}{2}\text{sen}8\varphi_0 \right) \right. \\ & \left. + (\cos 2(\varphi_0 - \varphi_u) - 2\text{sen}4(\varphi_0 - \varphi_u)) H_u^2 / 2 \right] \frac{\gamma}{2\omega} \left. \right\} \text{sen}2(\varphi_0 - \varphi_u) \Delta\varphi_u + \Delta H(0) . \quad (10) \end{aligned}$$

Las expresiones (7) y (10) incluyen las principales contribuciones al ancho de línea de FMR de una película delgada. La expresión total es complicada y debe ser resuelta numericamente para cada posición del campo externo, H0.

3. Resultados y análisis

La Fig.1 muestra la dependencia angular del campo de resonancia, HR, en 11.0 GHz, para películas de Fe/MgO (001) con espesores de 70 Å y 102 Å. La película de 102 Å presenta la simetría C4 propia del plano (001) de Fe B.C.C. La muestra con espesor de 70 Å exhibe una simetría C4 distorciónada por el efecto de un campo de anisotropía uniaxial con eje fácil a lo largo de la dirección [110] del Fe. Las muestras más gruesas presentaron un comportamiento similar a la película de 102 Å. Las líneas continuas en la Fig. 1 representan ajustes numéricos de los datos experimentales con el modelo fenomenológico descrito en la sección 2. Los parámetros de cada película obtenidos de los ajustes, son listados en la Tabla 1. En las Figs. 2(a) y 2(b) mostramos la dependencia del campo de anisotropía magnetocristalina cúbica, $H1 = 2K_1/M$, y del campo de anisotropía uniaxial,

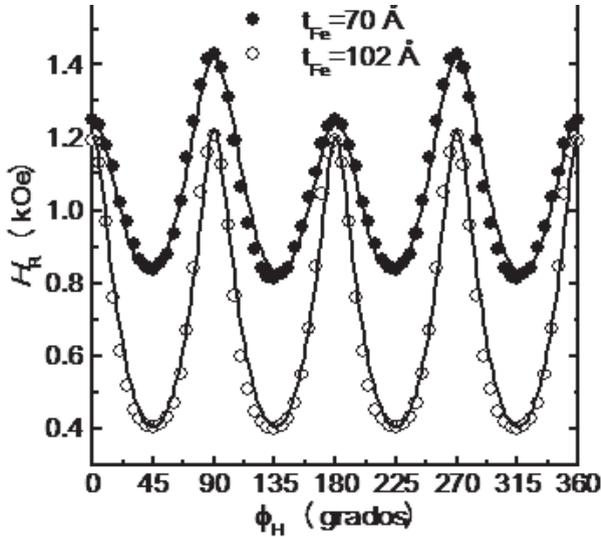


FIGURA 1. Dependencia angular del campo de resonancia para películas finas de Fe/MgO (001) con espesores de 70 Å y 102 Å. Fermin, J. R.

TABLA 1. Parámetros de FMR obtenidos de los ajustes numéricos para Fe (t_{Fe})/MgO (001) Fermin, J. R.

t_{Fe} (Å)	$4\pi M_{eff}$ (kOe)	$2K_I/M$ (kOe)	$2K_u/M$ (kOe)	$\Delta\phi_H$ (deg)	$\Delta\phi_u$ (deg)	G (GHz)
70	11.7	0.27	0.07	2.0	0.2	0.11
89	15.7	0.36	0.015	0.95	0.14	0.03
102	16.5	0.42	0.01	0.9	0.0	0.03
114	17.2	0.44	0.01	0.7	0.13	0.03
127	17.4	0.46	0.01	0.72	0.0	0.043
177	18.0	0.50	0.01	0.7	0.0	0.03
202	18.9	0.52	0.01	0.68	0.0	0.03
252	19.5	0.55	0.01	0.68	0.0	0.03

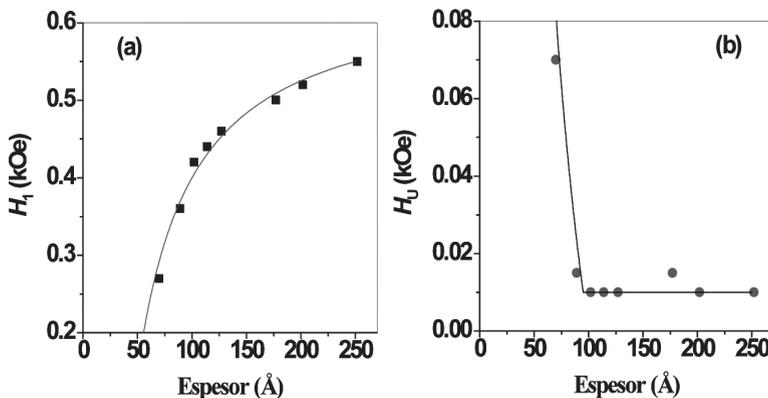


FIGURA 2. Dependencia con espesor de la película de Fe de (a) campo de anisotropía magnetocristalina y (b) campo de anisotropía uniaxial, en películas delgadas de Fe (tFe)/MgO (001). Fermin, J. R.

$H_U = 2K_U/M$, con el espesor de la película. El campo de anisotropía magnetocristalina aumenta con el espesor de la película hasta llegar a cierto valor de ~ 0.55 kOe, próximo del valor para Fe cúbico masivo. La línea continua en 5(a) representa un ajuste de acuerdo con la expresión $2K_1/M = (0.60 - 25.0/t_{Fe})$ kOe, donde el primer término es la contribución de la anisotropía cúbica del volumen y el término proporcional a $1/t_{Fe}$ es la contribución de la interface. Este tipo de dependencia es observada en películas monocristalinas ferromagnéticas (Heinrich y Cochran, 1993) e indica como la presencia de la interface afecta la anisotropía cúbica de la película. Las películas presentaron una anisotropía uniaxial, probablemente inducida por compresión debida al desacoplamiento entre los parámetros de red de la película y del sustrato. Se observa la dependencia no lineal con el espesor de la película, con una transición abrupta en torno de 100 Å. La línea continua en la Fig. 2(b) es un ajuste mediante una función escalón del tipo

$$H_U = \frac{2K_U}{M} = \begin{cases} \left(\frac{2K_U}{M}\right)_V + \left(\frac{t_b - t_F}{t_F}\right)\left(\frac{2K_U}{M}\right)_S; & t_F < t_b \\ \left(\frac{2K_U}{M}\right)_V & ; \quad t_F \geq t_b \end{cases} \quad (11)$$

donde t_b y t_{Fe} son un espesor crítico y espesor de la película, respectivamente, el primer término de la parte superior corresponde a la contribución del volumen de la película, y el segundo término proporcional al inverso del espesor representa a la anisotropía inducida en la interface. El mejor ajuste fue obtenido usando los valores $(2K_U/M)_V = 0.010$ kOe, $(2K_U/M)_S = 0.20$ kOe y $t_b \cong 95$ Å. Este tipo de dependencias con el espesor son también observadas en estructuras epitaxiales con anisotropía inducida por relajación elástica (Gester, et. al., 1996). En este caso la anisotropía uniaxial es proporcional al estrés, ε , diferenciando la película en dos regiones: $t_{Fe} < t_C$, donde la película es sometida a fuerzas elásticas y de compresión, y el crecimiento es pseudomórfico; $t_C < t_{Fe}$, donde aparecen las dislocaciones interfaciales y el estrés no es más importante. Para películas de Fe/MgO (001), $t_C \sim 10$ Å (Frait y MacFaden, 1965). En la Fig. 2(b) podemos diferenciar más claramente la segunda región ($t_C < t_{Fe}$). Esta región es dividida en $t_C < t_{Fe} < t_b$, donde se forman las dislocaciones interfaciales y el estrés decae rápidamente, y la región de saturación, $t_{Fe} > t_b$, donde no se introducen más dislocaciones y el estrés llega al valor de saturación. Este mecanismo está relacionado con los procesos de relajación de la película y será discutido con más detalles en la discusión sobre ancho de línea de FMR.

La magnetización efectiva, $4\pi M_{eff} = 4\pi M - 2K_n/M$, en función del espesor de la película, es mostrada en la Fig.3. Se observa un incremento gradual de la magnetización efectiva con el espesor de la película, hasta ~ 19.5 kOe, próximo del valor esperado en Fe masivo (~ 22.0 kOe). Este comportamiento puede ser representado mediante la expresión $4\pi M_{eff} = 22.0 - 650/t_{Fe}$ (línea continua). Los símbolos abiertos en la Fig. 3 representan los valores del campo de anisotropía perpendicular, $2K_n/M$, extraídos de la definición de $4\pi M_{eff}$ cuyos valores son representados por los símbolos cerrados. Este resultado muestra que la magnetización de la película, es diferente de la magnetización del material masivo debido a la presencia de una anisotropía perpendicular, que decae como el inverso del espesor de la película.

El ancho de la línea, ΔH , con respecto al ángulo azimutal se muestra en la Fig. 4, para las mismas películas de la Fig. 1. La película con 102 Å exhibe la misma simetría C4 de Fe/GaAs(001), con mínimos iguales a lo largo de los ejes [100] y [110] del Fe. Esta dependencia es explicada fenomenológicamente mediante la expresión (7) del ancho de línea homogénea y el primer término en (10) que representa la contribución inhomogénea debida a la mosaicidad de la interface. La curva continua corresponde al ancho de línea calculada numericamente con estos dos términos. Obtenemos excelente concordancia entre los datos experimentales y la teoría asumiendo una dispersión angular de los ejes cúbicos, $\Delta\phi H=0.9^\circ$, del mismo orden que el valor de la mosaicidad medida por rayos x, en películas de Fe/MgO (001) crecidos por *sputtering* RF (Mühge, et. al., 1994; Goryunov, et. al., 1995). De los ajustes numéricos extraímos el valor del parámetro de Gilbert, $G=0.03$ GHz, es el valor reportado para Fe masivo.

Las películas con espesores $t_{Fe} > 102$ Å, presentaron dependencia similar con relación al ángulo azimutal. Para $t_{Fe} < 102$ Å, el ancho de línea presenta un comportamiento diferente. La anisotropía uniaxial inducida, quiebra la simetría de ΔH , introduciendo una diferencia entre los valores medidos a lo largo de los ejes [100] y [110] del Fe. Este comportamiento no puede ser más explicado asumiendo apenas relajación intrínseca (7) y dispersión angular de los ejes cúbicos, como en películas más gruesas. En este caso, es necesario asumir que el eje de anisotropía uniaxial, también presenta dispersión angular, $\Delta\phi_u$. Usando (7) y (10), calculamos numericamente el ancho de línea para cada posición del campo magnético en el plano de la película (línea continua). Obtenemos un ajuste razonable con los parámetros $G=0.11$ GHz, $\Delta\phi H \sim 2.0^\circ$ e $\Delta\phi_u \sim 0.2^\circ$. Los valores de $\Delta\phi H$ y $\Delta\phi_u$ para cada película está listado en la Tabla 1. En la Fig. 5, mostramos la variación de las dispersiones angulares, $\Delta\phi H$ y $\Delta\phi_u$, medidas en 11.0 GHz. Se observa un comportamiento del tipo $1/t_{Fe}$, indicando que las dispersiones de las anisotropías resultan de efectos de interface. Sin embargo siendo las películas epitaxiales,

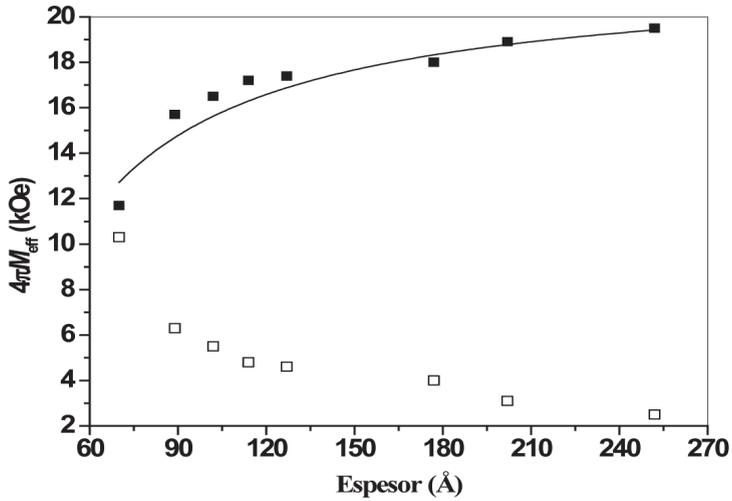


FIGURA 3. Dependencia con espesor de la magnetización efectiva de películas de Fe (tFe)/MgO (001), definida como $4\pi M_{\text{eff}} = 4\pi M - 2K_n/M$. Fermin, J. R.

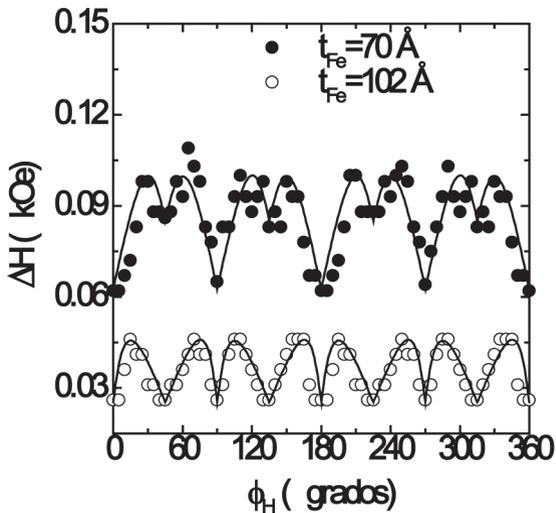


FIGURA 4. Dependencia angular del ancho de línea de FMR de películas monocristalinas de Fe (tFe)/MgO (001), para $t_{\text{Fe}} = 70 \text{ \AA}$ e 102 \AA . Fermin, J. R.

ellas exhiben una estructura de mosaicos, que consiste en rotaciones microscópicas de los planos cristalinos en torno de la normal y distribuidas a través de toda la película. Las dispersiones angulares llegan al valor de saturación cuando $t_{Fe} \sim t_b \cong 115 \text{ \AA}$. Esto muestra que en la región $70 \text{ \AA} < t < t_b$, la estructura de la interface es caracterizada por la presencia de dislocaciones interfaciales que inducen dispersiones en los ejes de anisotropía. Estas dislocaciones son esenciales para compensar el desacoplamiento entre los parámetros de red del substrato y de la película.

En la región $t_{Fe} > t_b$ ($\cong 95 \text{ \AA}$), donde la anisotropía inducida por relajación elástica llega al valor de saturación, el parámetro de red de la película es próximo del valor en Fe masivo y la película, las dislocaciones interfaciales saturan y la película se encuentra totalmente relajada. La variación del ancho de línea de FMR a 9.5 GHz, en relación al espesor de la película, está mostrada en la Fig. 6. Los símbolos sólidos corresponden a los valores medidos con el campo magnético aplicado en las direcciones [100] y [110] del Fe. Los círculos abiertos representan el ancho de línea media sobre todo el plano de la película. Se observa el comportamiento no lineal del tipo $1/t_{Fe}$ típico de los efectos de interface. Las líneas continua y punteada son calculadas a partir de una expresión del tipo (12), similar a la usada en la interpretación de la anisotropía uniaxial, donde usamos los valores $\Delta H_V = 0.025 \text{ kOe}$ y $\Delta H_S = 0.06 \text{ kOe}$ para el ancho de línea media y $\Delta H_V = 0.025 \text{ kOe}$ y $\Delta H_S = 0.02 \text{ kOe}$, cuando es medida a lo largo de los ejes [100] y [110].

$$\Delta H = \begin{cases} \Delta H_V + \left(\frac{t_b - t_{Fe}}{t_{Fe}} \right) \Delta H_S; & t_{Fe} < t_b \\ \Delta H_V & ; \quad t_{Fe} \geq t_b \end{cases} \quad (12)$$

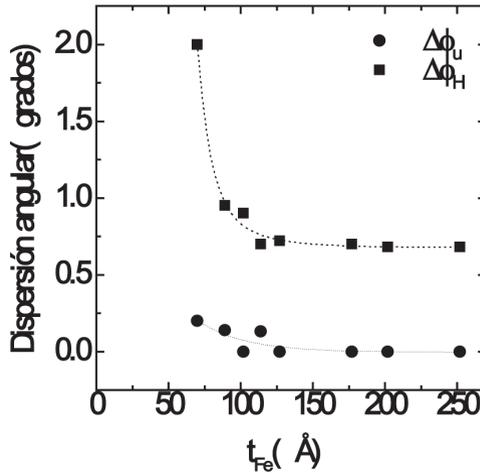


FIGURA 5. Dependencia con el espesor de las películas de Fe, de las dispersiones de los ejes de anisotropía cúbica (cuadrados) y anisotropía uniaxial (círculos), extraídos de las medidas de FMR. . Fermin, J. R.

Para ambas curvas $t_b \sim 140 \text{ \AA} > 95 \text{ \AA}$, el valor extraído de la medida de anisotropía uniaxial. Así mismo, ΔH , $\Delta\phi_H$, $\Delta\phi_u$ e $H_u = 2K_u/M$ presentan dependencia similar con el espesor de la película. Este resultado muestra que la relajación ferromagnética de las películas de Fe es debida a las dispersiones angulares de los ejes de anisotropía, inducidas a través de dislocaciones interfaciales. La dependencia de ΔH con relación a la frecuencia, medida a lo largo de los ejes [100] y [110], es mostrada en la Fig. 7, para las películas de 70 Å y 102 Å. Las líneas continuas representan ajustes numéricos de acuerdo con la expresión (12), con los parámetros en la Tabla 1 y ϕ_H fijo. El parámetro de Gilbert, G , fue ajustado hasta obtener la mejor curva teórica. De aquí, obtenemos $G \sim 0.11 \text{ GHz}$ para $t_{Fe} = 70 \text{ \AA}$ y $G \sim 0.03 \text{ GHz}$ para $t_{Fe} = 102 \text{ \AA}$. Esto indica que el parámetro de Gilbert es aproximadamente isotrópico y es afectado por las dislocaciones interfaciales. El comportamiento lineal de ΔH en $\omega > 7.0 \text{ GHz}$ es esperado en películas metálicas, donde los procesos de relajación son debidos principalmente al mecanismo de intercambio por conducción (Frait y Fraitová, 1980). Este mecanismo es válido solamente en películas

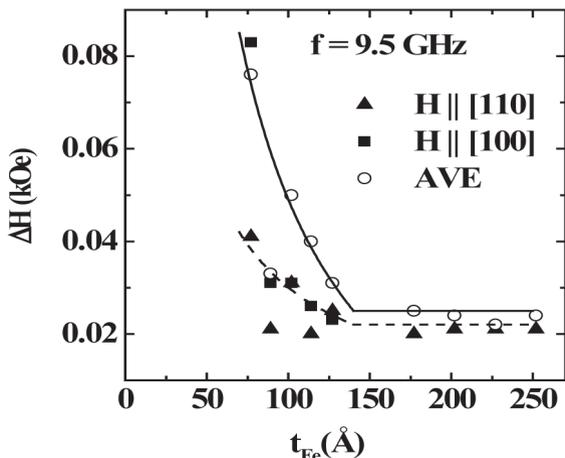


FIGURA 6. Dependencia con espesor de la película de Fe del ancho de línea de FMR, para películas delgadas de $Fe(t_{Fe})/MgO$ (001), medida a lo largo de los ejes cúbicos [100] y [110] del Fe . Fermin, J. R.

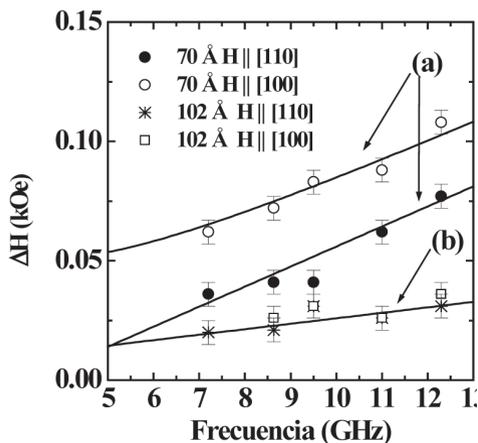


FIGURA 7. Dependencia del ancho de línea de FMR con la frecuencia, medida a lo largo de los ejes cristalinos [100] y [110] del Fe, para (a) Fe (70 Å)/ MgO (001) y (b) Fe (102 Å)/ MgO (001). Fermin, J. R.

relativamente gruesas. En películas más delgadas, la dependencia de ΔH con frecuencia, es caracterizada por una parte no lineal a frecuencias bajas, proporcional a $1/\omega$. Otro aspecto importante, es el hecho de que los valores de ΔH medidos a lo largo de los ejes cúbicos [100] y [110] del Fe, son diferentes en las películas más delgadas.

Esto también es observado en otras películas ferromagnéticas pero no existen modelos teóricos explicando el origen de este fenómeno. Fenomenológicamente, la expresión (12) produce una explicación en términos de la anisotropía uniaxial y la dispersión angular del eje uniaxial. La dispersión angular del eje uniaxial, $\Delta\varphi_u$, quiebra la degeneración del ancho de línea en los ejes cristalinos, en altas frecuencias, por un valor dado por $\delta(\Delta H) = \Delta H_{[100]} \Delta H_{[110]} \cong 3/4 H_u \Delta\varphi_u$. Con esto, explicamos también el hecho de que en películas gruesas, con anisotropía uniaxial despreciable, el ancho de línea medida a lo largo del eje [100] es igual al valor medido con el campo magnético en la dirección [110].

Concluimos entonces, que los principales procesos de relajación en películas delgadas de Fe son los mecanismos de conducción intrínsecos y las dispersiones de los ejes de anisotropía debido a la formación de dislocaciones en la interface película-substrato.

Conclusiones

En este trabajo se presentó un estudio detallado sobre las propiedades magnéticas de películas delgadas de Fe/MgO (001), fabricadas mediante la técnica de magnetron *sputtering* y caracterizadas empleando FMR tanto el campo de resonancia, H_R , y el ancho de línea, ΔH , en el plano de la película presentaron una simetría C4 con respecto al ángulo azimutal, típico de sistemas ferromagnéticos BCC. Las constantes de anisotropía magnética en las películas de Fe presentan un comportamiento 1/espesor, evidenciando fuertes efectos de interface película/substrato. La anisotropía magnetocris-

talina, K_1 , aumenta a medida que aumenta el espesor de la película hasta estabilizarse cerca del valor esperado en un cristal de Fe BCC (~ 550 - 580 Oe). Las anisotropías uniaxiales K_u y K_N , disminuyen con el espesor hasta cierto espesor crítico, encima del cual son despreciables. Las medidas de FMR nos permitieron comprobar que el espesor crítico del sistema Fe/MgO (001) es 100-120 Å.

Empleamos un modelo fenomenológico para la interpretación del ancho de línea de FMR, ΔH . Este modelo se basa en la relajación ferromagnética por conducción y por la formación de dislocaciones en la interface película/substrato. El principal efecto de estas dislocaciones interfaciales es inducir dispersiones angulares en los campos de anisotropía de la película. Son estas dispersiones las responsables del ensanchamiento de la línea ha medida que la magnetización rota de un eje fácil a un eje duro. En las películas relativamente gruesas (> 100 Å), los principales procesos de relajación son los mecanismos de conducción intrínsecos y las dispersiones angulares del campo de anisotropía cúbica. En las películas más delgadas (< 100 Å), donde la anisotropía uniaxial en el plano es importante, las dispersiones angulares del campo uniaxial también deben ser consideradas. Este nuevo efecto es el responsable por el ensanchamiento de la línea a lo largo del eje fácil del Fe a frecuencias bajas. Aunque este efecto ha sido observado anteriormente en sistemas metálicos no cristalinos, no existe una explicación teórica consistente.

Referencias

- Abanov, A., Kalatsky, A. V., Pokrovsky, V. L., and Saslow, W. M. (1995). Phase diagram of ultrathin ferromagnetic films with perpendicular anisotropy. *Phys.Rev.B*, Volumen 51 N° 2, 1023-1038.
- Ambrose, T., Summer, R., and Chien, C. (1997). Angular dependence of exchange coupling in ferromagnet/antiferromagnet bilayers. *Phys. Rev.B*, Volumen 56 N° 1, 83-86.

- Baker, A., Cerezo, A., and Petford-Long, A. (1996). Interfacial diffusion studies in Co/Pd layered films. *J. Magn. Magn. Mater.*, Volúmen 156 N° 1/3, 83-84.
- Cowburn, R., Gray, S., Ferré, J., Bland, J. A. C., and Miltat, J. (1995). Magnetic switching and in-plane uniaxial anisotropy in ultrathin Ag/Fe/Ag(100) epitaxial films. *J. Appl. Phys.*, Volumen 78 N° 12, 7210-7220.
- Chuang., D. S., Ballentine, C. A., and O'Handley, R.C. (1994). Surface and step magnetic anisotropy. *Phys. Rev.B.* Volumen 49 N° 21, 15084-15095.
- Dieny, B., Gavigan, J. P., and Rebouillat, J. P. (1990). Magnetisation processes, hysteresis and finite-size effects in model multilayer systems of cubic or uniaxial anisotropy with antiferromagnetic coupling between adjacent ferromagnetic layers. *J. Phys.: Condes. Mater.* Volumen 2 N° 1, 159.
- Ding, J., and Zhu, J. -G. (1994). Microstructure and recording properties of bicrystal disks with GaAs substrates. *IEEE Trans. Magn.* Volúmen 30 N° 6, 3978-3980.
- Fermin, J. R., Azevedo, A., de Aguiar, F. M., Li, B., and Rezende, S.(1999). Ferromagnetic Resonance linewidth and anisotropy dispersions in thin Fe films. *J. Appl. Phys.* Volumen 85 N° 10, 7316-7320.
- FlorczaK, J. M., and Dan Dahlberg, E. (1992). Magnetization reversal in Fe/GaAs (100) thin films. *J. Magn. Magn. Mater.*, Volúmen 104/107 N° 1, 399-400.
- Frait, Z., and MacFaden, H. (1965). Ferromagnetic Resonance in Metals. Frequency Dependence. *Phys. Rev.* Volumen 139 N° 4A, A1173-A1181.

- Frait, Z., and Fraitová, D. (1980). Ferromagnetic resonance and surface anisotropy in iron single crystals. *J. Magn. Magn. Mater.* Volúmen 15/18 N° 2, 1081-1082.
- Futamoto, M., Suzuki, M., Inaba, N., Nakamura, A., and Honda, Y. (1994). Magnetic and recording characteristics of bicrystalline longitudinal recording medium formed on an MgO single crystal disk substrate. *IEEE Trans. Magn.* Volúmen 30 N° 6, 3975-3977.
- Gester, M., Daboo, C., Hicken, R. J., Gray, S. J., and Bland, J. A. C. (1996). Thickness-dependent in-plane magnetic anisotropy in epitaxial Fe films on GaAs substrates. *Thin Solid Films*, Volumen 275 N° 1-2, 91-94.
- Goryunov, Yu., Garif'yanov, V., Khallinlin, G. G., Garifullin, I. A., Tagirov, L. R., Schreiner, F., Mühge, Th., and Zabel H. (1995). Magnetic anisotropies of sputtered Fe films on MgO substrates. *Phys. Rev. B* Volumen 52 N° 18, 13450-13458.
- Gu, E., Bland, J. A. C., Daboo, C., Gester, M., Brown, L. M., Ploessl, R., and Chapman, J. N. (1995). Microscopic magnetization reversal processes and magnetic domain structure in epitaxial Fe/GaAs(001) films. *Phys.Rev.B* 51 N° 6, 3596-3604.
- Harp, G. R., and Parkin, S. S. P. (1996). Epitaxial growth of metals by sputter deposition. *Thin Solid Films*, Volumen 288 N° 1/2, 315-324.
- Heinrich, B., and Cochran, J. F. (1993). Ultrathin metallic magnetic films: magnetic anisotropies and exchange interactions. *Advances in Physics* Volumen 42 N° 5, 523-639.
- Heinrich, V. E. and Cox, P.A. (1994). *The Surface Science of Metal Oxides*, Primera Edición, New York: Cambrigde University Press.

52

- Hu, X., and Kawazoe, Y. (1995). Mean-field theory for spin-reorientation phase transitions in magnetic thin films. *Phys. Rev.B* Volumen 51 N° 1, 311-315.
- Johnson, M. T., Bloemen, P. J., den Broeder, F. J. A., and de Vries, J. J. (1996). Magnetic anisotropy in metallic multilayers. *Rep. Prog. Phys.* Volumen 59 N° 11, 1409-1430.
- Kock, A. J. H. M., and Geus, J. W. (1985). The characterization of iron surfaces. *Progress in Surface Science*, Volumen 20 N° 3, 165-272 .
- Kudrnovsky, J., Drchal, V., Turek, I., Sob, M., and Weinberg, P. (1996). Interlayer magnetic coupling: Effect of interface roughness. *Phys. Rev. B*, Volumen 53 N° 9, 5125-5128.
- Laidler, H., Hickey, B. J., Hase, T. P. A., Tanner, B. K., Schad, R., and Bruynseraede, Y. (1996). Effect of annealing on the roughness and GMR of Fe/Cr multilayers. *J. Magn. Magn. Mater.*, Volumen 156 N° 1/3, 332-334.
- Lairson, B. M., Payne, A. P., Brennan, S., Rensing, N. M., Daniels, B. J., and Clemens, B. M. (1995). **In situ** x-ray measurements of the initial epitaxy of Fe(001) films on MgO(001). *J. Appl. Phys.*, Volumen 78 N° 7, 4449-4455.
- Lawler, J. F., Schad, R., Jordan, S., and van Kempen, H. (1997). Structure of epitaxial Fe films on MgO(100). *J. Magn. Magn. Mater.*, Volumen 65 N° 1/3, 224-226.
- Morozov, A. I., and Sigov, A. S. (1997). Roughness of layer interfaces and phase diagram of magnetic multilayer structures. *Phys. Solid State*, Volumen 39 N° 7, 1104-1107.
- Mühge, Th., Stierle, A., Metoki, N., Zabel, H., and Pietsch, U. (1994). Structural properties of high-quality sputtered Fe

- films on $\text{Al}_2\text{O}_3(1120)$ and $\text{MgO}(001)$ substrates. *Appl. Phys. A*, Volumen 59 N° 6, 659-665.
- Nowak, J. (1992). Magnetic hysteresis in thin ferromagnetic films. *J. Appl. Phys.*, Volumen 72 N° 4, 1490-1494.
- Palasantzas, G. (1997). Roughness effects on the thermal stability of thin films. *J. Appl. Phys.*, Volumen 81 N° 1, 246-250.
- Politi, P. (1998). Domain structures in ultrathin magnetic films. *Comments Cond. Mat. Phys.*, Volumen 18 N° 1, 191-221.
- Prinz, G. A. (1994). *Ultrathin Magnetic Structures II*, Primera Edición, Berlin: Springer Eds.
- Salvietti, M., Ferro, P., Moroni, R., Canepa, M., and Mattera, L. (1997). Surface magnetism of an ultrathin Fe/Ag(100) film: influence of O_2 and CO adsorption. *Surf. Sci.* Volumen 377 N° 1, 481-486.
- Schreiber, F., Pflaum, J., Frait, Z., Mühge, Th., and Pelzl, J. (1995). Gilbert damping and g-factor in $\text{Fe}_x\text{Co}_{1-x}$ alloy films. *Solid State Commun.*, Volumen 93 N° 1, 965-968.
- Slonczewski, J. C., and Middelhoek, S. (1965). Energy of walls in thin magnetic double permalloy (NiFe) films. *Appl. Phys. Lett.*, Volumen 6 N° 7, 139-140.
- Tustison, R. W., Varitimos, T., Van Hook, J., and Schloemann, E. (1987). Epitaxial Fe films on (100)GaAs substrates by ion beam sputtering. *Appl. Phys. Lett.*, Volumen 51 N° 4, 285-287.
- Ustinov, V. V., Kirillova, M. M., Lobov, I. D., Maevskii, V. M., Makhnev, A. A., Minin, V. I., Romashev, L. N., Dehl, A. K., Semerikov, A. V., and Shreder, E. I. (1996). Magneto-optical

study of the non-collinear magnetic structure of Fe/Cr superlattices. *J. Magn. Magn. Mater.*, Volumen 156 N° 1, 179-180.

Zhang, G. M., and Yang, C. Z. (1995). Phase transitions in Ising ferromagnets with biquadratic exchange interactions. *Phys. Rev. B*, Volumen 51 N° 6, 3605-3609.

Descriptores cromatográficos en fase normal de derivados feniluretanos de alcoholes polietoxilados

Mónica Arias Jiménez¹
Roberto Bauza Fermín¹

RESUMEN

Se evaluó el modelo lineal de descriptores cromatográficos propuestos por Snyder (1974:1384) y Jandera (1988a:417) para derivados feniluretanos de alcoholes polietoxilados con número de óxido de etileno (EON) de 4 y 18, empleando cromatografía de alta resolución en fase normal (HPLC-FN). Se estudiaron los descriptores en columnas ciano y amino en un rango del solvente polar (Solvente B) de 4 hasta 22 % v/v, en proporciones de fases móviles isopropanol/metanol/acetónitrilo acuoso. Los descriptores del modelo interpretan con buena exactitud el comportamiento retentivo k' para EO bajos (desde 4 hasta 10 EO) pero el modelo se desvía para $EO > 10$. La columna amino presentó mayor selectividad α que la columna ciano en condiciones óptimas de separación. Los valores experimentales de los descriptores del grupo terminal de los derivados resultaron muy bajos indicando que la participación de éste es mínima en la retención k' .

PALABRAS CLAVE: HPLC, Fase Normal, Descriptores, feniluretano, retención.

¹Laboratorio de Instrumentación Analítica (LIA), Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526.
E-mail: rbauza7@gmail.com

Recibido: 23/10/2012 Aceptado: 23/11/2012

Chromatography descriptors in normal phase of phenylurethanes derivatives of polyethoxylated alcohols

ABSTRACT

Lineal model of chromatographic descriptors proposed by Snyder (1974:1384) y Jandera (1988a:417) was evaluated on phenyl polyurethane derivatives of polyethoxylated alcohols with ethylene oxide number (EON) of 4 and 18, using high performance liquid chromatography with normal phase (HPLC-NP). Descriptors on cyano- and amine-stationary phases with interval of polar solvent (solvent B) between 4 and 22 % v/v were evaluated with mobiles phase isopropanol/methanol/ aqueous acetonitrile. The descriptors interpreted with good accuracy the retentive behavior k' for the lowest EO (from 4 to 10 EO) but deviations were observed for $EO > 10$. The cyano column presented higher selectivity α than the amino column with optimal separation conditions. Experimental values of terminal group descriptors of derivatives were the lowest and consequently should be indicated minor retention of factor k' .

KEYWORDS: HPLC, normal phase, descriptors, phenylurethane, retention.

Introducción

Los descriptores cromatográficos son parámetros que permiten cualificar el fenómeno de retención en un proceso cromatográfico facilitando establecer premisas para posibles estrategias de selectividad y en consecuencia de resolución en mezclas altamente complejas de separar. El caso particular del estudio de descriptores en alcoholes etoxilados es primordial debido a la complejidad de etoxímeros (polietoxilados) que se forman en la reacción de etoxilación de alcoholes.

Las separaciones cromatográficas de mezclas de alcoholes polietoxilados ha sido ampliamente documentada y referenciada. El uso particular de la cromatografía de gas para el análisis de surfactantes es limitado debido a la baja volatilidad de los altos oligómeros y a la necesidad de derivatizarlos para aumentar dicha propiedad (Ding y Tzing, 1998:79) Las separaciones de surfactantes no iónicos por HPLC, tanto en fase normal (HPLC-FN) (Alexander et al., 1985:289, Desbene et al., 1987:857; Escott et al., 1983:655; Holt et al., 1986:419; Levsen et al., 1985:135; Marquez et al., 1994:1147; Melander et al., 1979:129; Pilc y Sermon, 1987: 375; Rothman, 1982:283; Schreuder y Martijn, 1988:73; Zeman, 1986:223) como en sistemas de fase reversa (HPLC-FR) (Brossard, et al., 1992:149; Desbene, et al.,1989:305; Desbene,et al.,1996:209; Escott y Mortimer, 1991:423; Jandera, 1988a: 417; Jandera, 1990:297; Takeuchi, et al.,1988:482; Wang y Fingas, 1993:145, Zeman, 1986:223) se consideran métodos bien validados en sus diversas aplicaciones.

No obstante, muy poco se ha referenciado en descriptores de conductas de retención para derivados de estos compuestos (Jandera, 1984:13; Jandera, 1988a:361). En el caso particular de HPLC-FN los oligómeros etoxilados individuales eluyen en el orden del aumento del número de óxido de etileno (EON). Mientras que en fase reversa dependen de la serie homóloga y de la composición de la fase móvil.

Jandera et al estudiaron el efecto simultáneo del grado de polimerización, N, y de la concentración del solvente fuerte en una fase binaria tanto en HPLC-FR (Jandera, et al., 1998:299; Jandera y Rozkošna, 1986:325) como en HPLC-FN (Jandera, 1988b:361), Jandera, et al., 1997:21). En ambos sistemas el logaritmo del factor de retención k' , aumenta de manera lineal con el aumento del número de unidades repetidas del oligómero N (Lemr, et al., 2003:19).

Los alcoholes etoxilados comerciales contienen compuestos que difieren no sólo del EON sino también de las longitudes de las cadenas alquílicas (y sus conformaciones). Si se parte de la condición

de que las energías de retención son constantes, es posible describir la retención de tales co-oligómeros como una distribución bimodal por la ecuación (1) (Jandera, et al., 1998:299):

$$\text{Log}k' = \text{log}\beta + N_M \text{log}\alpha_M + N_E \text{log}\alpha_E \quad (1)$$

Aquí, $k' = (V_R / V_O - 1)$, donde V_R es el volumen de elusión y V_O es el volumen muerto, $\text{log}\alpha_M$ y $\text{log}\alpha_E$ caracterizan la selectividad de la separación de oligómeros adyacentes que difieren por una unidad repetida M (metileno) o una unidad estructural E (óxido etileno) mientras $\text{log}\beta$ representa la contribución de la retención por los grupos terminales en la serie oligomérica. En sistemas en fase normal con fases móviles orgánicas binarias, conteniendo un solvente menos polar (A) y otro más polar (B), la dependencia de la retención de los co-oligómeros con la concentración φ del solvente B puede describirse por una simple ecuación (Jandera y Rozkošná, 1986:325):

$$\text{Log}k = a - m \text{Log} \varphi \quad (2)$$

Este modelo ya ha sido aplicado para describir las conductas de nonilfenol etoxilados en sílice no modificada y en fases enlazadas polares diol, ciano y amino (Pilc y Sermon, 1987:375); Wang y Finigas, 1993:145). No obstante, no se tiene información de la aplicación de este modelo a derivados de alcoholes polietoxilados con fenilisocianato (poliuretanos).

Lemr et al., (2003:19) evaluaron la influencia de la composición de la fase móvil (proporción acetonitrilo (ACN)/agua) en la separación de derivados del 3,5-dinitrobenzoil de alcoholes polietoxilados. Estos derivados mostraron una conducta irregular al compararlos con el modelo propuesto por Jandera (1988a: 417). Los autores concluyen que la solvatación de las cadenas oxietilénica juega un papel importante en esta desviación del modelo. En este trabajo se aplicará este modelo para evaluar cómo es la conducta cromatográfica de los poliuretanos en fase normal con columna enlazadas ciano y amino.

1. Materiales y reactivos

Las muestras de alcoholes polietoxilados comerciales se obtuvieron de la compañía Etoxil (Zulia–Venezuela) con valores nominales de EON 4 y 18.

Para la reacción de derivatización y fraccionamiento de las muestras, se emplearon los siguientes reactivos: Fenil isocianato al 98 % (v/v) de la Merck (CAS: 10-22-26-34-42). Isooctano (CAS: 0-300), y 2-propanol (CAS: 67-63-0) de la Fisher. Acetonitrilo (CAS: 75-05-8), y metanol (CAS: 67-56-1) de la Merck. Todos los solventes fueron grado HPLC. Asimismo, se empleó agua tridestilada y desionizada. Para el tratamiento de las muestras se emplearon los siguientes materiales: Sistemas de desgasificación de solventes con helio, membranas de filtración de 0,45 μm de tamaño de poro.

2. Instrumentos

Se emplearon los siguientes equipos: estufa marca Memmert, temperatura máxima 250 $^{\circ}\text{C}$, cromatógrafo líquido modular marca Waters, constituido por: inyector universal modelo U6K, controlador de solventes modelo 600, distribuidor de solventes cuaternario, detector de arreglo de fotodiodos (PDA), modelo 996, computador PC 5500 con software Millenium, versión 2.0. El volumen V_M se determinó empleando n-hexano como el marcador de volumen muerto con un detector de índice de refracción. Este se empleó para el cálculo de los factores de capacidad, $k' = (V_R/V_M - 1)$, de los oligómeros individuales. Las separaciones HPLC se llevaron a cabo en las columnas: Lichrocart– NH_2 de 25 cm x 3,9 mm DI con partículas de 5 μm y Lichrocart–CN de 25 cm x 3,9 mm DI con partículas de 5 μm . Ambas de la Merck.

3. Metodología

3.1. Reacción de derivatización

El derivado feniluretano se obtuvo de la reacción del alcohol polietoxilado con el fenil isocianato. Para la reacción se colocó en un vial 500 mg/L de alcohol con 800 mg/L de fenil isocianato y 1 mL de ACN, en un baño termostático a 60 °C por 90 min. Los derivados obtenidos se diluyeron con factor de 100 X en el solvente empleado.

3.2. Modelo empleado en el estudio

La retención cromatográfica en fase normal, según el modelo de Snyder (1974:1384) y Jandera (1988a:417), puede explicarse como un fenómeno de competitividad entre las moléculas del soluto con la fase móvil en la superficie del adsorbente (fase estacionaria) y puede ser descrita por medio de la ecuación modificada de Jandera y Rozkošna (1986:325), según la ecuación 3.

La retención aportada por la serie oligomérica se evaluó a diferentes composiciones de fase móvil ($n=3$) empleando isopropanol/isooctano/ACNac, donde ACNac es una solución de acetonitrilo con un 1 % v/v de agua tridestilada. En este caso se manipuló los porcentajes para que el ACNac participe como el componente B (*fuerte*) de la fase móvil. El término *fuerte* se mantendrá en el texto para señalar a la fase con mayor influencia en el factor de capacidad k' . Se evaluó la dependencia de la k' con respecto a las unidades etoxiladas (EO) y la proporción del solvente B (φ). De esta dependencia se obtuvieron valores de a y m para las unidades etoxiladas individuales del derivado feniluretano.

El tratamiento parte del modelo de Snyder (1968:145; 1974:1384) que posteriormente fue modificado por Jandera et al (Jandera, 1984:13; Jandera, 1988a:417; Jandera, et al., 1997:21).

La adsorción competitiva depende del número de unidades estructurales repetitivas en el oligómero, n , y de la concentración φ de un solvente polar en fase móvil orgánica binaria. Esta retención puede aproximarse a una relación lineal similar a la ecuación 1:

$$\text{Log } k' = \log \beta + n \log \alpha \quad (3)$$

Que combinada con la ecuación (2) resulta:

$$\text{Log } k' = a_0 - m_0 \log \varphi + (a_1 - m_1 \log \varphi) n \quad (4)$$

Las constantes a_0 , a_1 , m_0 y m_1 están relacionadas con la energía de adsorción de la unidad estructural repetida, Q_i , y el grupo terminar Q_o del surfactante, y por otro lado al área de la superficie del adsorbente A_i ocupada por una unidad oligomérica y por el grupo terminar.

Las gráficas de $\log k'$ contra $\log \varphi$ proporcionan las constantes m y a , de acuerdo a la ecuación 2 para cada número de etoxilados NE en función de la concentración del solvente más fuerte. Estas constantes se grafican en función de NE según las correlaciones lineales:

$$a = a_o + a_i N_E \quad (5)$$

$$m = m_o + m_i N_E \quad (6)$$

4. Resultados y discusión

A continuación se discuten los resultados obtenidos para EON = 4 y EON = 18. Se escogieron estas distribuciones para evaluar la influencia de baja y alta etoxilación.

4.1. Separación HPLC en fase normal

En la Figura 1 se muestran los cromatogramas en fase normal de los feniluretanos que se obtuvieron para extraer los tiempos de retención t_r y finalmente los k' . En la Figura 1A se muestra la separa-

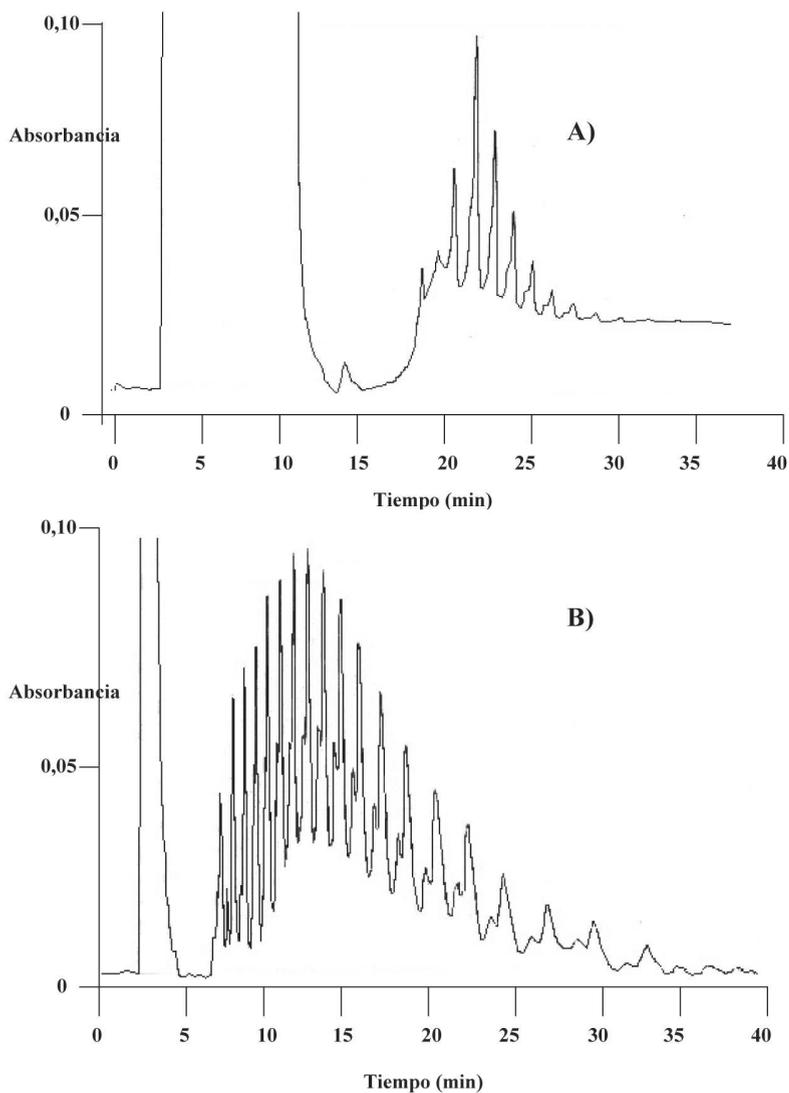


FIGURA 1: Cromatogramas HPLC en fase normal de derivados de feniluretanos. A) EON = 4. Columna ciano, 5 μm , y B) EON= 18, columna amino. Condiciones cromatográficas: fase móvil: isopropanol/isooctano/ACNac 70/8/22 % v/v (en columna amino) detector PDA, 240 nm.

ción lograda en columna ciano de una mezcla de los derivados poliuretanos con $EON = 4$ con fase móvil ternaria isopropanol/MeOH/acetoneitrilo acuoso. En la Figura 1B se observó una óptima separación con la misma mezcla ternaria en columna amino para el $EON = 18$. La mezcla ternaria se aproximó a una binaria manteniendo la proporción orgánica menos polar (isopropanol/MeOH) como un solvente A y la proporción orgánica polar (ACNac) como el solvente B, denominado ϕ según el modelo planteado en este trabajo. Este tipo de aproximaciones ya ha sido reportada en la literatura con otros solventes (Jandera et al., 1997:1; Lemr et al., 2003:19) y permite aplicar el modelo de Jandera (Jandera, 1988a:417) a sistemas de solventes binarios. Diversos autores han observado una gran mejora en la separación cromatográfica de surfactantes no iónicos al adicionar una pequeña proporción de agua o de solución reguladora al modificador orgánico o solvente fuerte de la fase móvil. Referencias de esta influencia ya han sido reportadas en alquil fenol etoxilados (Marquez, et al., 1994:1147), alcoholes polietoxilados (Melander et al., 1979:129), y polietilenglicol (Alexander, et al., 1985:289), permitiendo así llevar a cabo estudios de retención cromatográfica de manera adecuada. Esto debido al aumento de las interacciones entre la fase móvil y cada uno de los oligómeros del compuesto.

4.2. Influencia de la concentración del ACNac en la fase móvil, sobre k'

Para comprender la retención cromatográfica y explicar adecuadamente el comportamiento cromatográfico de los derivados en fase normal, se estableció una relación entre el factor de retención de la muestra o componentes de la muestra y la concentración del solvente modificador orgánico de la fase móvil, para así extrapolar por medio del modelo de correlación las tendencias del resto de las unidades repetitivas de la muestra. Se estudió la dependencia del factor de retención respecto a la concentración de ACNac en la fase móvil, tanto en una columna ciano como en una amino.

Para los derivados fenil uretano con EON 4 y 18, en la columna ciano se varió el contenido de ACNac en la fase móvil en una proporción de 10 a 24 % v/v, resultando 22% la concentración más adecuada para la separación de estos compuestos. Los parámetros a y m se calcularon en un rango de 4 hasta 22 % v/v del solvente fuerte, según la selectividad que mostró la columna.

4.3. Retenciones k' en fase normal para derivados de EON = 4

En la Figura 2 se muestran los resultados de la influencia del EO (Figura 2A) y de la proporción ϕ (Figura 2B) en los valores de retención k' para un derivado EON = 4 en columna amino. Nótese en la Figura 2A como aumenta linealmente la retención a medida que aumenta el EO en el oligómero derivado y se hace más pronunciado este efecto a 4 % v/v ACNac en la fase móvil y menos pronunciado entre 6 – 10 % de este solvente. Esto presupone que a pequeñas proporciones del modificador polar, las interacciones, que promueve el adsorbente, aumentan y en consecuencia aumenta la selectividad hacia los derivados. Este argumento se puede apreciar ilustrativamente en la Figura 2B. Obsérvese que a pequeños oligómeros, el efecto del aumento de ϕ (la escala x aumenta de derecha a izquierda) es inapreciable, manteniéndose constante la pendiente m (según la ec. 2).

De manera similar se evaluó el comportamiento del derivado EON = 4 en una columna ciano para observar la influencia del adsorbente en la selectividad y retención del derivado. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos. En la Figura 3A se muestran las correlaciones lineales que presenta el derivado a medida que aumento el EO. Al comparar este perfil con el obtenido en amino (Figura 2A) observamos una retención similar pero, nótese que se ha acentuado la diferencia de sensibilidad observada en la columna amino (Figura 2A) y en consecuencia se está presentado un mecanismo selectivo que es más sensible en el rango 16–18 % v/v del solvente polar y menos pronunciado en el rango de solvente polar

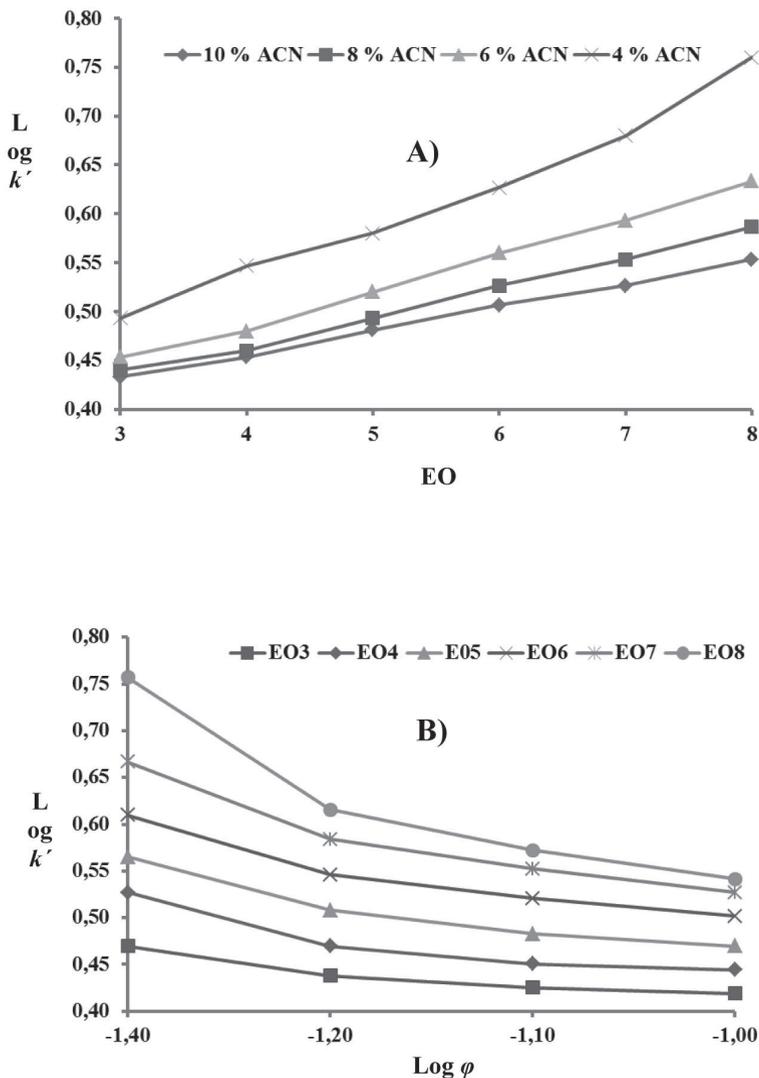


FIGURA 2: Influencia del A) número de etoxilación (EON = 4) y B) solvente (ϕ) en el factor de retención k' en columna amino según condiciones cromatográficas en Figura 1B.

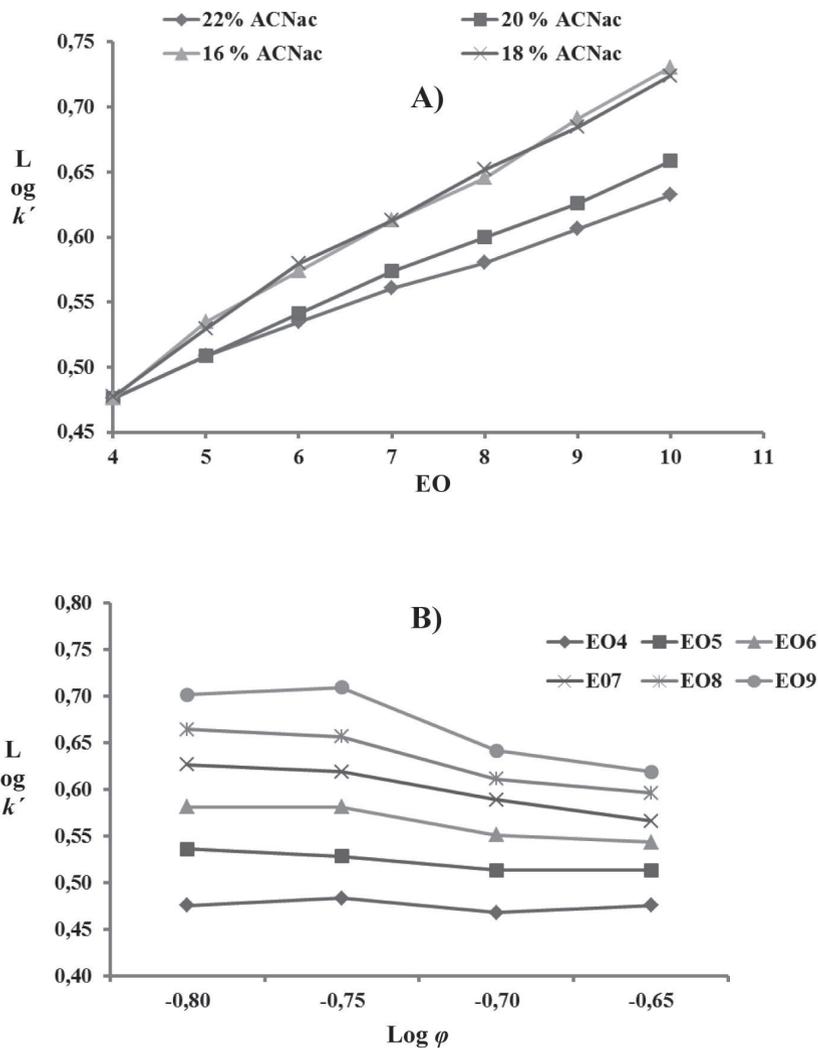


FIGURA 3: Influencia del A) número de etoxilación (EON = 4) y B) solvente (ϕ) en el factor de retención k' en columna ciano según condiciones cromatográficas en Figura 1B.

de 20 – 22 % v/v. En ambas situaciones (comparar Figuras 2A y 3A) es concluyente que a medida que disminuye ϕ se permite que en el adsorbente haya mayores sitios activos interactuando con la parte oligomérica y en consecuencia la selectividad es exclusivamente aportada por la columna. Este fenómeno se puede observar en el modelo lineal $\log k'$ contra $\log \phi$ (Figura 3B). A bajos EO el modelo es lineal y se pierde esta condición a medida que aumenta el EO. Obsérvese igualmente que a bajo EO no es perceptible la influencia del ϕ (similar a lo observado en columna amino, (ver Figura 2B), aumentando su influencia a medida que aumenta el EO en el rango de 16 – 18 % v/v del solvente polar. Es posible que esta marcada selectividad permita diferenciar entre la serie oligomérica y homóloga del derivado y el modelo lineal pueda explicar la bimodalidad (doblete) de pico que se observa pronunciadamente en la columna ciano.

4.4. Retenciones k' en fase normal para derivados de EON = 18

Se evaluó, de manera similar al EON = 4, el comportamiento del derivado para EON = 18 en columna amino y ciano. En las Figuras 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos como función de correlaciones lineales. De manera similar al comportamiento del EON = 4 en columna amino, el derivado EON = 18 mostró una relación lineal entre el $\log k'$ y el EO según Figuras 4 y 5, para un rango mayor del solvente polar debido al aumento de la retención. Se espera que un EON = 18 se retenga más que un EON = 4 y en consecuencia el primero necesitará mayor solvente polar para adecuar la k' . Es interesante comparar la influencia de los EO en la k' de ambos EON (4 y 18) en la columna amino (Comparar Figuras 2A y 4A). A baja proporción del solvente polar (4 % v/v) es más sensible el cambio de k' y en consecuencia la distribución es más sensible a los cambios del solvente, como ya ha sido explicado en el anterior apartado. Por otro lado, al igual que en EON = 4, el derivado EON = 18 pierde linealidad a bajos EO a medida que aumenta el ϕ (Ver Figura 4B).

Los derivados EON = 18 se evaluaron igualmente por columna ciano. En la Figura 5 (A y B) se muestran los resultados de estos estu-

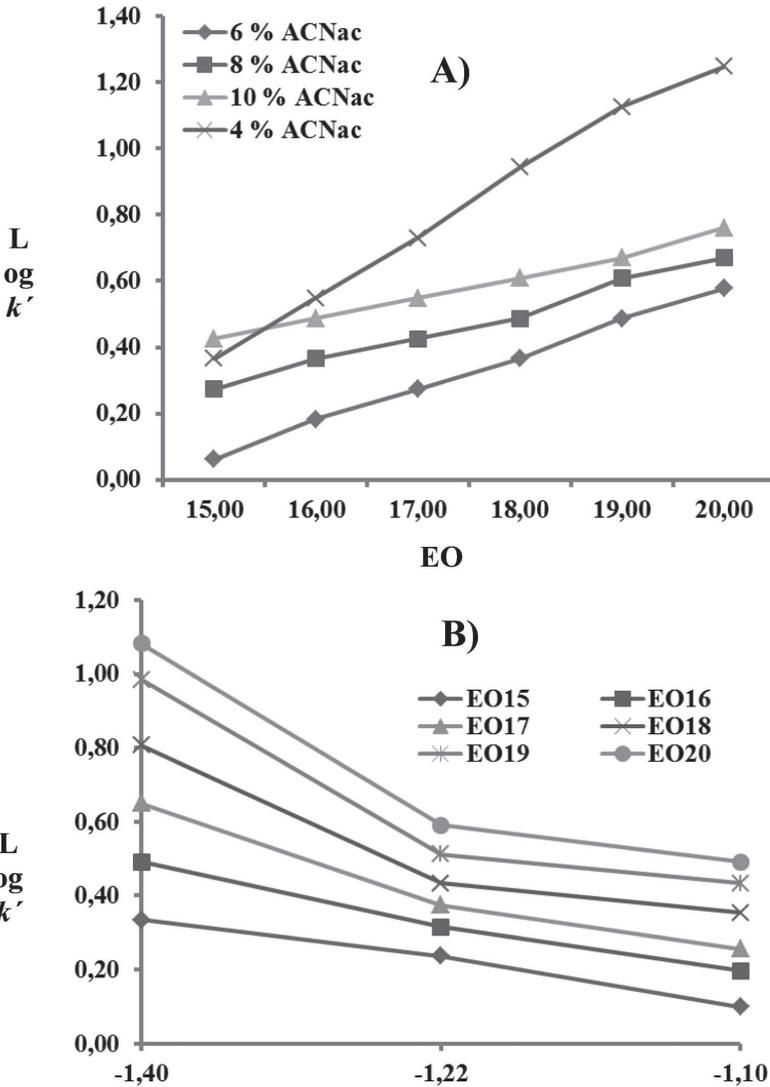


FIGURA 4: Influencia del A) número de etoxilación (EON = 18) y B) solvente (φ) en el factor de retención k' en columna amino según condiciones cromatográficas en Figura 1A.

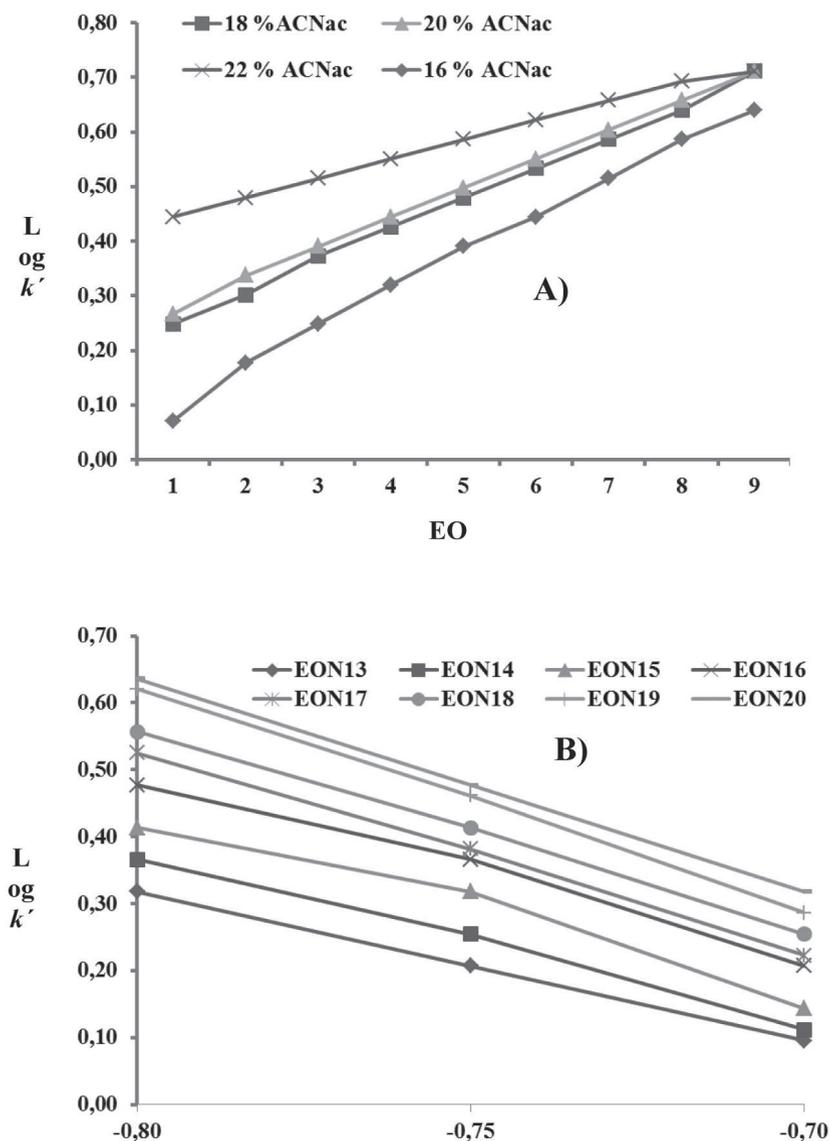


FIGURA 5: Influencia del A) número de etoxilación (EON = 18) y B) solvente (ϕ) en el factor de retención k' en columna cianopropil según condiciones cromatográficas en Figura 1A.

dios. Nótese en la Figura 5A como la diferencia de sensibilidad de la k' observada en la Figura 4A se minimiza a medida que aumenta el EO. La relación k' y ϕ correlaciona mejor al modelo lineal propuesto por Snyder (1974:1384) y Jandera (1988a:417) para fase normal. La linealidad y casi paralelismo de las pendientes en la Figura 5 B, indican con seguridad que la selectividad se mantiene constante a medida que aumenta el EO.

4.5. Contribución de la serie oligomérica y grupo terminar a la α y k'

De acuerdo a las ecuaciones 3–4 se puede establecer una relación lineal entre los parámetros m_0 , m_1 , a_1 y a_0 , generados por el modelo lineal que relaciona $\log k'$ con EO y $\log \phi$. En las Figuras 6 y 7 se presentan las relaciones halladas de los parámetros de correlación lineal antes mencionados. En la Figura 6A se observa cómo aumenta a medida que aumentamos el NE, esto es EO, en las Figuras 2–5. Se mantendrán los símbolos reseñados por el modelo original de Jandera (1988:417) para darle continuidad al modelo. En la Figura 6 y 7 se observan las contribuciones del parámetro a (pendiente superior) y del parámetro m (pendiente inferior) para un derivado EON = 4 en columna ciano (Figura 6A) y columna amino (Figura 6B). El mismo caso para EON = 18 en columna ciano (Figura. 7A) y amino (Figura 7B). De estas correlaciones se hallaron los parámetros m_0 , m_1 , a_1 y a_0 . Estas relaciones se listan en la Tabla 1. En la Figura 6 A se observa como aumenta a a medida que aumenta el NE en una columna amino de acuerdo con lo observado en la Figura 2A. El parámetro a esta relacionado a la contribución de la energía de adsorción de la serie oligomérica. A medida que aumenta NE lo hará su contribución energética a la retención k' . Hay una contribución similar a la selectividad α tanto del EON = 4 como el EON = 18 para columna CN ($\alpha = 1,70 - 1,52$, en Tabla 1).

Las correlaciones m permiten evaluar la participación del grupo terminar del derivado en la retención k' a través del parámetro β , según la ecuación (3). De las Figuras 7 A y B así como los parámetros β listados en la Tabla 1 es concluyente que el aporte del grupo

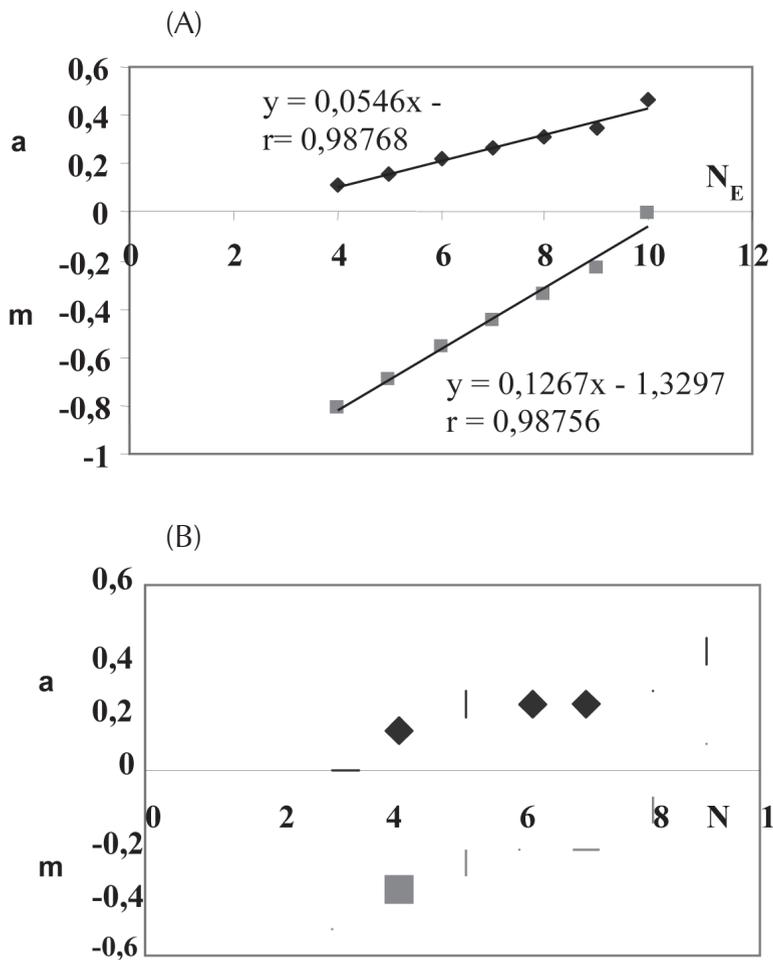


FIGURA 6: Influencia de N_E en los parámetros de energía de adsorción (a/m) según su EON (EON = 4) en A) columna ciano y B) columna amino.

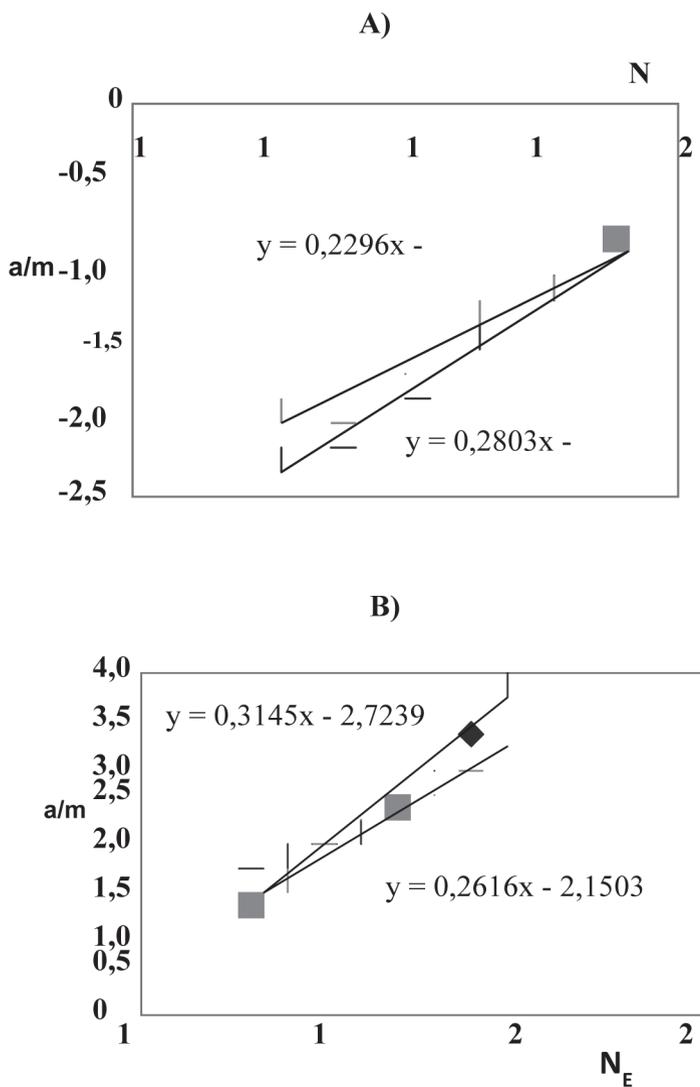


FIGURA 7: Influencia de NE en los parámetros de energía de adsorción (a/m) según su EON (EON = 18) en A) columna ciano y B) columna amino.

terminar es poco significativo, siendo la parte oligomérica la que contribuye mayormente a la retención k' .

Conclusiones

El modelo lineal propuesto por Snyder (1974:1384) y Jandera (1988a:417) ha sido aplicado para evaluar la influencia de los parámetros EO y ϕ en la retención k' , para adsorbentes polares amino y ciano. El modelo puede describir satisfactoriamente las retenciones de oligómeros de baja denominación, hasta EO 10 aproximadamente y comienza a desviarse por encima de estos valores. Las correlaciones lineales halladas indican que hay una importante contribución de la serie oligomérica, siendo pequeña la contribución del residuo terminar que incluye el residuo isocianato y la serie homóloga del derivado etoxilado.

Referencias

- Alexander, J.N.; McNally, M.E.; Rogers, L.B. (1985). "Liquid chromatographic fractionation of oligomers of nonylphenyl-oligo(ethylene glycol)", *J. Chromatogr. A* 318, 289-298.
- Brossard, S.; Lafosse, M.; Dreux, M. (1992). "Comparison of ethoxylated alcohols and polyethylene glycols by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography using evaporative light-scattering detection", *J. Chromatogr. A* 591, 149-157.
- Desbene, P.L.; Desmazieres, B.; Basseler, J.; Minssieux, L. (1987). "Analysis of non-ionic surfactants used in tertiary oil recovery. Optimisation of stationary phase in normal phase partition chromatography", *Chromatographia* 24, 1, 857-861.

- Desbene, P.L.; Desmazieres, B.; Basseler, J.J.; Desbene A. (1989). "Analytical study of non-ionic surfactants used in enhanced oil recovery : Optimization of analytical conditions in reversed-phase partition chromatography", *J. Chromatogr. A* 461, 305-313.
- Desbene, P.L.; Portet, F.I.; Goussot, G.J. (1996). "Quantitative trace analysis of surfactant mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography with refractometric detection", *J. Chromatogr. A* 730, 209-218.
- Ding, W.H.; Tzing S.H. (1998). "Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas chromatography-ion trap (tandem) mass spectrometry with electron impact and chemical ionization", *J. Chromatogr. A* 824, 79-90.
- Escott, R.E.A.; Brinkworth, S.J.; Steedman, T.A. (1983). "The determination of ethoxylate oligomer distribution of non-ionic and anionic surfactants by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 282, 655-661.
- Escott, R.E.A.; Mortimer, M. (1991). "Analysis of polyethylene glycol and derivatives by high-performance liquid chromatography using elevated temperatures and low-wavelength ultraviolet detection, and supercritical fluid chromatography", *J. Chromatogr. A* 553, 423-432.
- Holt, M.S.; McKerrell, E.H.; Perry, J.; Watkinson, R.J. (1986). "Determination of alkylphenol ethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection", *J. Chromatogr. A* 362, 419-424.

- Jandera, P. (1984). "Reversed-phase liquid chromatography of homologous series: A general method for prediction of retention", *J. Chromatogr. A* 314, 13-36.
- Jandera, P.; Rozkošná, J. (1986). "Isocratic and gradient-elution liquid chromatography of styrene oligomers on silica gel", *J. Chromatogr. A* 362, 325-343.
- Jandera, P. (1988a). "Mechanism and prediction of retention of oligomers in normal-phase and reversed-phase HPLC", *Chromatographia* 26, 417-422.
- Jandera, P. (1988b). "Methods for characterization of selectivity in reversed-phase liquid chromatography : IV. Retention behaviour of oligomeric series", *J. Chromatogr. A* 449, 361-389.
- Jandera, P.; Urbánek, J.; Prokeš, B.; Churáček, J. (1990). "Comparison of various stationary phases for normal-phase high-performance liquid chromatography of ethoxylated alkylphenols", *J. Chromatogr. A* 504, 297-318.
- Jandera, P.; Petránek, L.; Kučerová M. (1997). "Characterisation and prediction of retention in isocratic and gradient-elution normal-phase high-performance liquid chromatography on polar bonded stationary phases with binary and ternary solvent systems", *J. Chromatogr. A* 791, 1-19.
- Jandera, P. Holcapek, M. Theodoridis, G. (1998). "Investigation of chromatographic behaviour of ethoxylated alcohol surfactants in normal-phase and reversed-phase systems using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 813, 299-311.

- Lemr, K.; Sevcik, J.; Hlavac, J. (2003). "Retention of 3,5-dinitrobenzoyl derivatives of linear alcohol polyethoxylates in reversed-phase liquid chromatographic system with acetonitrile–water mobile phase", *J. Chromatogr. A*, 1021, 19-24.
- Levsen, K.; Wagner-Redeker, W.; Schäfer, K.H.; Dobbers P. (1985). "On-line liquid chromatography-mass spectrometry analysis of non-ionic surfactants", *J. Chromatogr. A* 323, 135-141.
- Marquez, N.; Anton, R.E.; Usubilaga, A.; Salager, J. (1994). "Optimization of HPLC Conditions to Analyze Widely Distributed Ethoxylated Alkylphenol Surfactants", *J. Liq. Chromatogr.* 17, 1147-1169.
- Martin, N. (1995). "Analysis of Non-ionic Surfactants by HPLC Using Evaporative Light-Scattering Detector", *J. Liq. Chromatogr.* 18, 1173-1194.
- Melander, W.R.; Nahum, A.; Horvath, Cs. (1979). "Mobile phase effects in reversed-phase chromatography: III. Changes in conformation and retention of oligo- (ethylene glycol) derivatives with temperature and eluent composition", *J. Chromatogr. A* 185, 129-152.
- Pilc, J.A.; Sermon, P.A. (1987). "Chromatographic separation of a wide range of ethoxylated non-ionic surfactants and their sulphonates using high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 398, 375-380.
- Rothman, A.M. (1982). "High-performance liquid chromatographic method for determining ethoxymer distribution of alkylphenoxypolyoxyethylene surfactants", *J. Chromatogr. A* 253, 283-288.

- Schreuder, R.H.; Martijn, A. (1988). "Determination of dodecylbenzenesulphonates and ethoxylated alkylphenols in liquid pesticide formulations by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.A* 435, 73-82.
- Snyder. L. (1968). "Principles of adsorption Chromatography". Marcel Dekker, New York. 145.
- Snyder, L. (1974). "Role of the solvent in liquid-solid chromatography. Review", *Anal Chem.* 46, 1384-1393.
- Soczewinski, E. (2002). "Mechanistic molecular model of liquid-solid chromatography: Retention-eluent composition relationships", *J Chromatogr. A*, 965 109-116.
- Takeuchi, T.; Watanabe, S.; Kondo, N.; Goto, M.; Ishii, D. (1988). "Improvement of the interface for coupling of fast atom bombardment mass spectrometry and micro high-performance liquid chromatography", *J Chromatogr. A* 435, 482-488.
- Wang, Z.; Fingas, M. (1993). "Rapid separation of non-ionic surfactants of polyethoxylated octylphenol and determination of ethylene oxide oligomer distribution by C1 column reversed-phase liquid chromatography", *J. Chromatogr.A* 637, 145-156.
- Zeman, I. (1986). "Application of bonded diol phases for separation of ethoxylated surfactants by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 363, 223-230.

Líquidos iónicos en catálisis: avances en dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas.

Juan Chirinos¹
Darmenia Ibarra¹
Angel Morillo¹
Jeannette Zárraga²

RESUMEN

En este trabajo se presenta una recopilación detallada de los métodos de síntesis de los líquidos iónicos y del empleo de estas sustancias como medio de reacción en la dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas catalizadas, principalmente, por complejos de níquel y hierro. Además, se incluyen recientes avances utilizando catalizadores derivados de complejos de Fe(II), Co(II) y Cr(III), basados en ligandos tipo bis(imino)piridina. Los líquidos iónicos empleados como medios de reacción, en combinación con catalizadores metálicos, han resultado en sistemas catalíticos con altas actividades y selectividades, ofreciendo una promisoriosa oportunidad para aplicaciones industriales con mínimos impactos sobre el medio ambiente. Finalmente se presenta una perspectiva crítica sobre el uso de líquidos iónicos como medios alternativos de reacción.

PALABRAS CLAVE: líquidos iónicos, olefinas, dimerización, oligomerización, polimerización.

¹Laboratorio de Polímeros. Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo. Venezuela. E-mail: jchirinos@fec.luz.edu.ve

²Instituto de Superficies y Catálisis. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

Ionic liquids in catalysis: advances in olefin dimerization, oligomerization and polymerization

ABSTRACT

In this paper the methods for the synthesis of ionic liquids and the use of ionic liquids as reaction media for the catalyzed olefin dimerization, oligomerization and/or polymerization are full described. Additionally, recent advances in the use of catalysts derived from Fe (II), Co (II) and Cr (III) bearing bis (imine) pyridine ligands, for the same reactions in ionic liquids are included. The ionic liquids used as reaction media in combination with a suitable catalyst result in highly active and selective catalytic systems affording a good opportunity for industrial applications with low environmental risk. Finally a critical view about the use of the ionic liquids as alternative reaction media is presented.

KEYWORDS: ionic liquids, olefin, dimerization, oligomerization, polymerization.

Introducción

El diseño de productos químicos y procesos que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias peligrosas es el principal objetivo de la química verde (Anastas y Kirchhoff, 2002). La identificación de solventes benignos al medio ambiente y procesos de separación es uno de los campos de investigación más activos hoy en día. La mayoría de los procesos químicos emplean grandes cantidades de solventes orgánicos, los cuales debido a su volatilidad, inflamabilidad, y toxicidad son incompatible con los objetivos de la química verde. Un solvente ideal debe tener baja volatilidad, ser química y físicamente estable, fácil de manipular, reciclable y reutilizable.

Recientemente, los líquidos iónicos han sido identificados como uno de los posibles reemplazos de solventes tradicionales, ofrecien-

do una promisorio oportunidad de utilizar en aplicaciones industriales y rutinarias estos medios de reacción que son más compatibles con la química verde (Wasserscheid y Keim, 2000; Dzyuba y Bartsch, 2002; Olivier-Bourbigou, *et al*, 2010; Plechkova y Seddon, 2008. Qinghua, *et al*, 2011; Williams, *et al*, 1987). Adicionalmente, las características intrínsecas y la potencial reciclabilidad de estas sustancias han permitido un amplio rango de aplicación con fines electroquímicos, separaciones analíticas, medios de reacción tanto en procesos químicos como bioquímicos, procesos de adsorción, etc. (Baker *et al*, 2005; Chiappe y Pieraccini, 2005; Plechkova y Seddon, 2008; Van Doorslaer *et al*, 2010; Elomari *et al*, 2011; Ray *et al*, 2012; Wang *et al*, 2012).

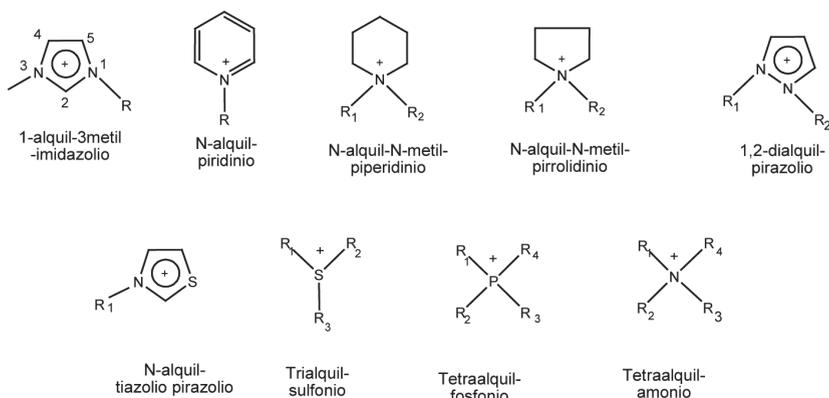
Bajo estas premisas, en este trabajo se describen en forma crítica los métodos de síntesis de líquidos iónicos y los avances recientes de su aplicación en reacciones de dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas.

1. Definición de líquidos iónicos

Los líquidos iónicos se definen generalmente como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de 100 °C (Welton, 1999). En algunos casos los líquidos iónicos son líquidos que fluyen libremente a temperatura ambiente, por lo cual reciben el nombre de líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs) (Welton, 1999; Sheldon, 2001; Anderson *et al*, 2005).

Estos líquidos están compuestos en su mayoría por un catión voluminoso, de baja simetría con débiles interacciones intermoleculares y bajas densidades de cargas y, un anión que puede ser orgánico o inorgánico (Welton, 2004). Los cationes y aniones más comúnmente empleados en la síntesis de líquidos iónicos se muestran en la Figura 1.

Cationes comunes para la síntesis de líquidos iónicos



Aniones comunes para la síntesis de líquidos iónicos

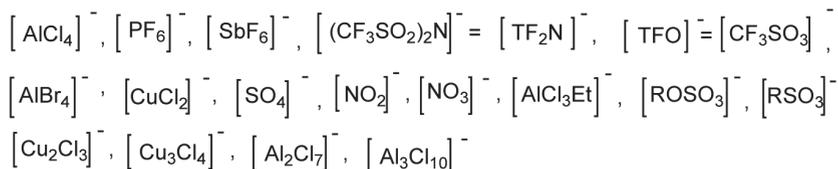
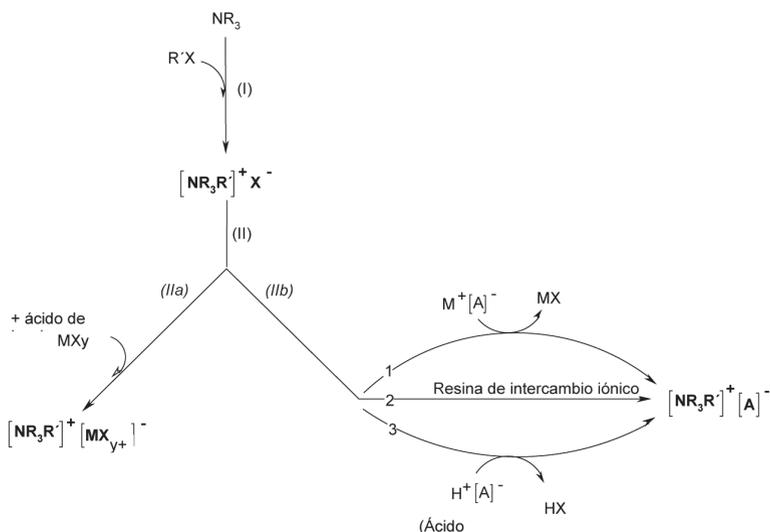


FIGURA 1. Cationes y aniones más comunes en líquidos iónicos (Sheldon, 2001; Welton, 2004; Baker et al, 2005; Plechkova et al, 2008).

2. Síntesis de líquidos iónicos

En general, la preparación de líquidos iónicos supone dos etapas: la formación del catión (I) y la reacción de intercambio iónico que generará el producto deseado (II). La reacción de intercambio iónico a su vez se puede dividir en dos reacciones principales, la primera consiste en el tratamiento directo de las sales de haluros con un ácidos de Lewis (IIa), mientras que la segunda se fundamenta en reacciones de metátesis aniónica ó el intercambio iónico a partir de una sal metálica del anión deseado, $M+[A]^{-}$, con precipitación del

correspondiente haluro metálico, $M+X^-$, (IIb); ó mediante el uso de una resina de intercambio iónico ó, por desplazamiento del ión haluro por un ácido fuerte $H+[A]^-$, con liberación de $H+X^-$, como se ilustra en el Esquema 1.



ESQUEMA 1. Síntesis general de líquidos iónicos (Ibarra, 2009)

La formación de los cationes generalmente se logra mediante la protonación con un ácido o por cuaternización de una amina o fosfina, principalmente con un haloalcano ($R'X$). Las reacciones de protonación, se usan en la formación de sales tales como $[EtNH_3][NO_3]$, mientras que la reacción de cuaternización se emplea en la síntesis de $[BMIM][Cl]$, por ejemplo.

El tratamiento de la sal de haluro cuaternaria $[R'R_3N]+X^-$ con ácidos de Lewis MX_y ($EtAlCl_2$ (Gilbert et al, 1995), BCl_3 (Williams et al, 1987), $CuCl$ (Chauvin y Olivier-Bourbigou, 1995), $SnCl_2$, $GeCl_2$ y $InCl_3$ (Seddon et al, 2003) conduce a la formación de más de

una especie aniónica, dependiendo de las proporciones relativas de $[R'R_3N]^+X^-$ y MX_y .

La composición líquido iónico-ácido de Lewis está generalmente relacionada a la fracción molar del ácido presente en la mezcla, xAl (Ecuaciones 1-3; Fannin et al, 1984; Zenon y Osteryoung, 1984; Kärkkäinen, 2007). Cuando $xAl < 0,5$, la mezcla es básica y el $[EMIM][Cl]$ está presente en un exceso sobre $AlCl_3$. En este caso el anión dominante en la mezcla es el Cl^- . De igual manera, cuando la mezcla contiene cantidades equivalentes de $[EMIM][Cl]$ y $AlCl_3$, el anión dominante es el $[AlCl_4]^-$ y la mezcla es neutra, con $xAl = 0,5$, según se describe en la ecuación 1.

Si la cantidad de aluminio es tal que $xAl > 0,5$ la mezcla contiene un exceso de $AlCl_3$, y coexisten varios aniones. La cantidad de $[AlCl_4]^-$ decrece, y al mismo tiempo la cantidad de $[Al_2Cl_7]^-$ se incrementa (ecuación 2) resultando en líquidos iónicos ácidos. Finalmente, para $xAl > 0,67$ se obtienen líquidos iónicos súper ácidos, donde prevalecen los aniones del tipo $[Al_3Cl_{10}]^-$ (ecuación 3).



Por otra parte, la reacción de metátesis entre el $[RMIM][I]$, y una sal de plata, $AgBF_4$, $AgNO_3$, $AgNO_2$, $AgCH_3CO_2$ y Ag_2SO_4 , en metanol o disoluciones acuosas de metanol permite aislar los líquidos iónicos con altos rendimientos y pureza. Este método es el más eficiente para la síntesis de líquidos iónicos miscibles en agua, pero está limitado por el alto costo de las sales de plata y las grandes cantidades de sub-producto sólido formado.

Fuller et al. (1994) reportaron el primer líquido iónico insoluble en agua, [EMIM][PF₆], obtenido a partir de la reacción de [EMIM][Cl] y HPF₆ en una disolución acuosa (Figura 2). La preparación de líquidos iónicos inmiscible en agua es considerablemente más sencilla que la síntesis de sus análogos solubles en agua. La solubilidad de los líquidos iónicos en agua depende de la naturaleza del anión y catión presente y en general decrece con el incremento del carácter orgánico del catión.



FIGURA 2. Preparación del [BMIM][PF₆] (Fuller et al, 1994)

Un método alternativo para la preparación de líquidos iónicos de alta pureza, propuesto por Wasserscheid y Keim (2000), se basa en el uso de resinas de intercambio iónico. En este sentido, Lall et al (2000), han realizado la síntesis de líquidos iónicos basados en aniones fosfatos con cationes de poliamonio a partir de esta metodología.

3. Aplicaciones de los líquidos iónicos en catálisis de dimerización, oligomerización y/o polimerización de olefinas

3.1. Reacciones de dimerización

La dimerización de olefinas de cadena corta catalizada por complejos de níquel en líquidos iónicos, conteniendo aniones cloroaluminatos, es probablemente la reacción más investigada en líquidos iónicos (Chauvin et al, 1990; Coelho et al, 1998; Silvana et al, 1998; Souza et al, 2007; Dötterl y Alt, 2012c; Dötterl y Alt, 2012d).

Chauvin *et al* (1990), Chauvin *et al* (1995a) y Chauvin *et al* (1995b) reportaron la dimerización de propeno catalizada por precursores del tipo L_2NiCl_2 ($L = P(nBu)_3, P(Pr)_3, P(Cy)_3, P(Bn)_3$ o Py) en combinación con $EtAlCl_2$ ($[BMIM][Cl-AlCl_3-EtAlCl_2] = 1:1,2:0,1$). El catalizador activo es un complejo de Ni(II), $[LNiCH_2CH_3][AlCl_4]$, formado por la reacción de L_2NiCl_2 con $EtAlCl_2$. A $-15^\circ C$ y presión atmosférica se obtuvieron productividades muchos más altas que las obtenidas con los disolventes orgánicos tradicionales (Chauvin *et al*, 1995a). La mezcla de dímeros obtenidas, contienen 2,3-dimetilbuteno como el componente mayoritario ($\approx 83\%$). Los productos formados en la fase orgánica (superior) son fácilmente decantados y el catalizador permanece selectivamente disuelto en la fase del líquido iónico.

En la dimerización bifásica de olefinas catalizadas por complejos de níquel en líquidos iónicos, tanto la actividad como la selectividad es mucho más alta que los sistemas libre de solvente y los que emplean solventes convencionales. Este proceso ha sido patentado con el nombre de proceso Difasol, y puede ser adaptado dentro de las plantas Dimersol existentes (Commereuc *et al*, 2003).

Similarmente, los complejos $[Ni(MeCN)_6][BF_4]_2$, $[Ni(MeCN)_6][AlCl_4]_2$, $[Ni(MeCN)_6][ZnCl_4]$ inmovilizados en $[BMIM][Cl-AlCl_3-EtAlCl_2]$ son excelentes catalizadores para la dimerización de *n*-butenos, con TOF en el orden de 0,42 a $2,2 s^{-1}$, y selectividad de 93 y 96 % de octenos con índices de ramificación de 1,2 a 1,3 (Cohelo *et al*, 1998). La selectividad de estos sistemas indican la existencia de un complejo catiónico Ni-H como la especie catalíticamente activa. La solución catalítica fue recuperada y reutilizada varias veces sin pérdida significativa de la actividad (Cohelo *et al*, 1998).

Wasserscheid y Keim (2000) sintetizaron un líquido iónico, ($[BMIM][Cl/AlCl_3/base]$), libre de alquilaluminio para la dimerización de *n*-buteno a $25^\circ C$. Se empleó un catalizador de níquel y bases del tipo pirrol, *N*-metilpirrol, quinolina, piridina, 2,6-dimetilpiridina, di-*tert*butilpiridina, 2,6-dicloropiridina y 2,6-difluoropiridina.

La composición del líquido iónico usada fue 0,43:0,53:0,04. La quinolina y la *N*-metilpirrol mostraron ser las mejores bases para este tipo de reacción, con la producción 3,4-dimetilhexeno, 3-metilheptenos y *n*-octenos, con 98% de selectividad (Figura 3). La cantidad de *n*-octeno resultó en 64% con quinolina y 51 % con *N*-metilpirrol, respectivamente.

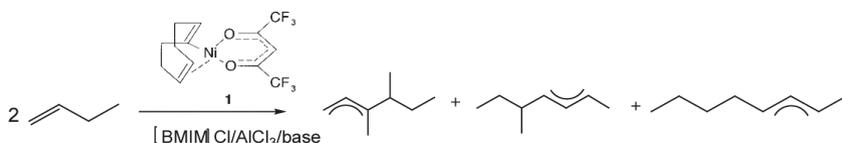


FIGURA 3. Reacción de dimerización del 1-buteno catalizada por complejos de níquel en líquidos iónicos (ácidos de Lewis) con diferentes bases (Wasserscheid y Keim, 2000).

La dimerización de butadieno a 1,3,6-octatrieno y 1,3,7-octatrieno catalizada por paladio es de gran importancia industrial debido al amplio rango de aplicación de sus productos: comonómeros y en la síntesis de plastificantes, adhesivos y fragancias. Debido a que estos octatrienos se polimerizan rápidamente en presencia de aire, la separación de los productos desde el catalizador presenta un serio problema. Esto parece ser, por tanto, un objetivo atractivo para la catálisis bifásica en líquido iónico.

Silvana *et al.* (1998) reportaron la obtención de 1,3,6-octatrieno en 100% de selectividad mediante la dimerización bifásica de 1,3-butadieno empleando el catalizador PdCl₂-Ph₃P (1:4) en [BMIM][X] (X = BF₄⁻ ó PF₆⁻) a 70 °C. Las conversiones de butadieno en medio homogéneo (THF), con precursores catalíticos de PdCl₂ son significativamente más bajas (1,5%) que las obtenidas con compuestos de paladio inmovilizados en líquidos iónicos (BF₄⁻ = 12,7 y PF₆⁻ = 11,3 %, respectivamente).

La reacción de ciclodimerización de 1,3-butadieno puede ser llevada a cabo empleando complejos de hierro, preparado *in-situ* por la reducción de $[\text{Fe}_2(\text{NO})_4\text{Cl}_2]$ con zinc metálico (Ligabue *et al.*, 2001), disueltos en los líquidos iónicos $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ ó $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ (Figura 4). En las reacciones llevadas a cabo con $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$, a $50\text{ }^\circ\text{C}$, se obtiene 4-vinilciclohexeno en 100 % de conversión y selectividad con un TOF superior a 1.440 h^{-1} . Las conversiones se incrementan con la solubilidad del dieno en el líquido iónico (1,3-butadieno es dos veces más soluble en líquidos iónicos basados en BF_4^- que en las sales PF_6^-) y con el incremento de la temperatura.

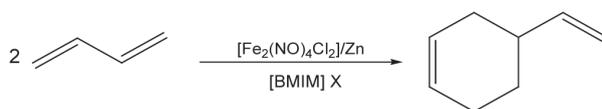


FIGURA 4. Ciclodimerización de 1,3-butadieno en $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ ó $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ (Ligabue *et al.*, 2001).

DuPont *et al.* (2002) emplearon el complejo catiónico $[\text{Ni}(\text{MeCN})_6][\text{BF}_4]_2$ disuelto en el líquido iónico $[\text{BMIM}]\text{AlCl}_4/\text{AlEtCl}_2$ (relación: 1:1,2:0,25), y condiciones suaves de reacción ($25\text{ }^\circ\text{C}$, 8 bar), para la dimerización de etileno (Figura 5), encontrando TOF de 5.954 h^{-1} y selectividades de 56 % en butenos. La selectividad en butenos puede ser incrementada a 100 % por el aumento de la presión de etileno (18 bar) y reducción de la temperatura de reacción a $-10\text{ }^\circ\text{C}$.

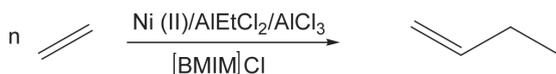


FIGURA 5. Dimerización de etileno en líquidos iónicos organoaluminatos (DuPont *et al.*, 2002).

Las reacciones de dimerización de olefinas descritas anteriormente demuestran la factibilidad de extender la aplicación de estos medios iónicos a reacciones de oligomerización y/o polimerización. En

ambos casos se requiere favorecer la constante de propagación de cadenas o inserción de monómeros a la constante de terminación de la reacción.

3.2. Reacciones de oligomerización y/o polimerización

El proceso de oligomerización de etileno es de gran importancia industrial para la producción de alfa olefinas lineales (LAO). Dependiendo de la longitud de la cadena, estas α -olefinas son empleadas como comonómeros para la obtención de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), o como intermediarios para la preparación de plastificantes, lubricantes o surfactantes (Plechkova y Seddon, 2008; Timken y Elomari, 2009; Patil y Bodige, 2012; Ray *et al*, 2012).

Muchos complejos de metales de transición catiónicos han sido excelentes catalizadores para la oligomerización de olefinas (Kubisa, 2004; Qinghua *et al*, 2011). Sin embargo, estos complejos a menudo son poco solubles en solventes no polares. Con solventes orgánicos comunes está situación usualmente requiere un compromiso entre las propiedades de solvatación y coordinación del solvente. Para aumentar la solubilidad del complejo se requiere de solventes con alta polaridad, no obstante pueden competir con el sustrato por los sitios de coordinación en el centro metálico. En este sentido, los líquidos iónicos, especialmente los cloroaluminatos, hexafluorofosfatos y tetrafluoroboratos, ofrecen una nueva perspectiva debido a su habilidad para combinar cierta polaridad del disolvente con una débil coordinación al centro metálico de una manera única (Wasserscheid y Keim, 2000; Dötterl y Alt, 2011; Ochedzan-Siodłak, 2011; Dötterl *et al*, 2012a; Dötterl y Alt, 2012b; Dötterl y Alt, 2012d; Elomari y Miller, 2012; Kenneth *et al*, 2012; Liu, *et al*, 2012).

Wasserscheid *et al*, (2001) realizaron reacciones de oligomerización de etileno a α -olefinas superiores empleando un sistema bifásico, donde el catalizador catiónico de níquel, **1**, fue inmovilizado en

[BMIM][PF₆] (Figura 6). Las velocidades de reacción fueron siete veces más rápida en [BMIM][PF₆] (TOF= 12.712 h⁻¹) que en CH₂Cl₂ (TOF= 1.852 h⁻¹), a la par de un alto incremento en la selectividad hacia alquenos lineales. El producto fue fácilmente separado y el catalizador contenido en el líquido iónico reciclado.



Cat-Ni:

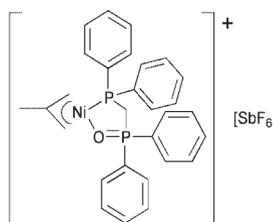


FIGURA 6. Reacción de oligomerización de etileno empleando un catalizador de níquel inmovilizado en [BMIM][PF₆] (Wasserscheid *et al*, 2001).

Yang *et al*, (2009) reportaron la oligomerización de *i*-buteno catalizada por líquidos iónicos conteniendo FeCl₃ (**2-5**) mostrados en la Figura 7. Las oligomerizaciones se realizaron a 40 °C empleando una relación líquido iónico/*i*-buteno de 1,2:1. Los datos experimentales muestran que la selectividad de los productos deseados, C₈, C₁₂, C₁₆ y C₂₀ fue alta (11-86%). Por otra parte, la conversión de *i*-buteno catalizada por [(C₂H₅)₃NHCl][Fe₂Cl₇] y [C₁₃H₂₂NCl][Fe₂Cl₇] resultaron ser 85 y 83 %. Sin embargo, la conversión encontrada con [C₁₉H₃₄NCl][Fe₂Cl₇] and [C₂₅H₅₄NCl][Fe₂Cl₇] fue 11 y 3 %, respectivamente. Estos resultados demuestran que el tipo de catión afecta significativamente la reacción de oligomerización.

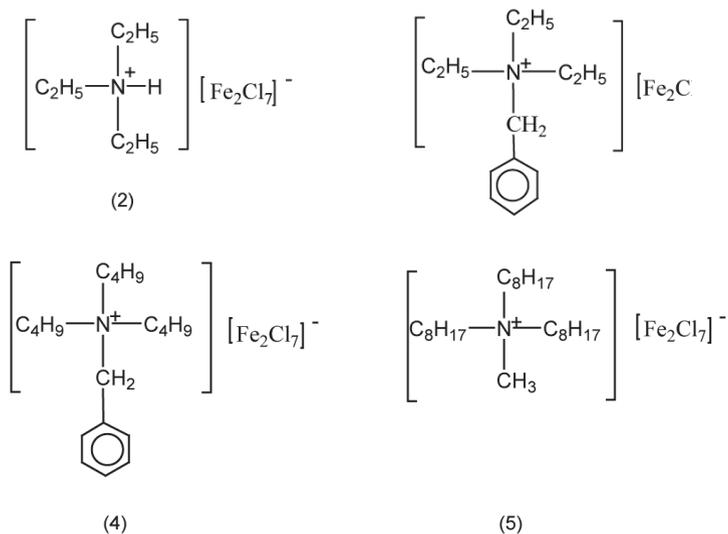


FIGURA 7. Líquidos iónicos, **2-5**, basados en cloruro de hierro (III) (Yang *et al*, 2009).

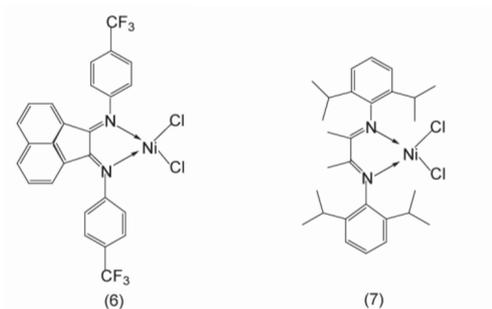


FIGURA 8. Complejos de níquel con ligandos diiminas (Lecocq *et al*, 2007).

Similarmente, los complejos de níquel, **6** y **7**, conteniendo ligandos diiminas (Figura 8), activados con MAO, en tolueno son sistemas activos para la oligomerización de etileno dependiendo de la voluminosidad del ligando diimina (Lecocq *et al*, 2007).

La estructura de los complejos **6** y **7** ejerce un efecto sustancial en la distribución de la longitud de cadena del producto, cuando la reacción se lleva a cabo en tolueno como solvente y la mezcla [BMIM][Cl] y $AlCl_3$. Los catalizadores derivados de **6** y **7** resultaron ser más activos en cloroaluminatos (TOF= 41.000 h⁻¹ y 25.000 h⁻¹, respectivamente) que en tolueno (TOF= 18.000 h⁻¹ y 17.000 h⁻¹, respectivamente). Mientras que con los sistemas homogéneos se producen principalmente 1-hexeno, con los sistemas bifásicos se obtienen hexenos ramificados como productos principales.

La reacción de oligomerización de etileno empleando catalizadores derivados de complejos de metales de transición tardíos y tempranos ha sido extensamente estudiada mediante técnicas de exploración acelerada y sistemática (**HTS** de sus siglas en inglés para **High throughput Screening**) de las condiciones y variables de reacción (Chirinos, 2004). Los complejos 8-11 basados en Fe (III), Co (II) y Cr(III) (Figura 9), se activaron con diferentes cocatalizadores (MAO, TMA, EADC, B(ArF)) bajo diferentes condiciones de reacción y se evaluaron hacia la oligomerización de olefinas en líquidos iónicos de diferente naturaleza.

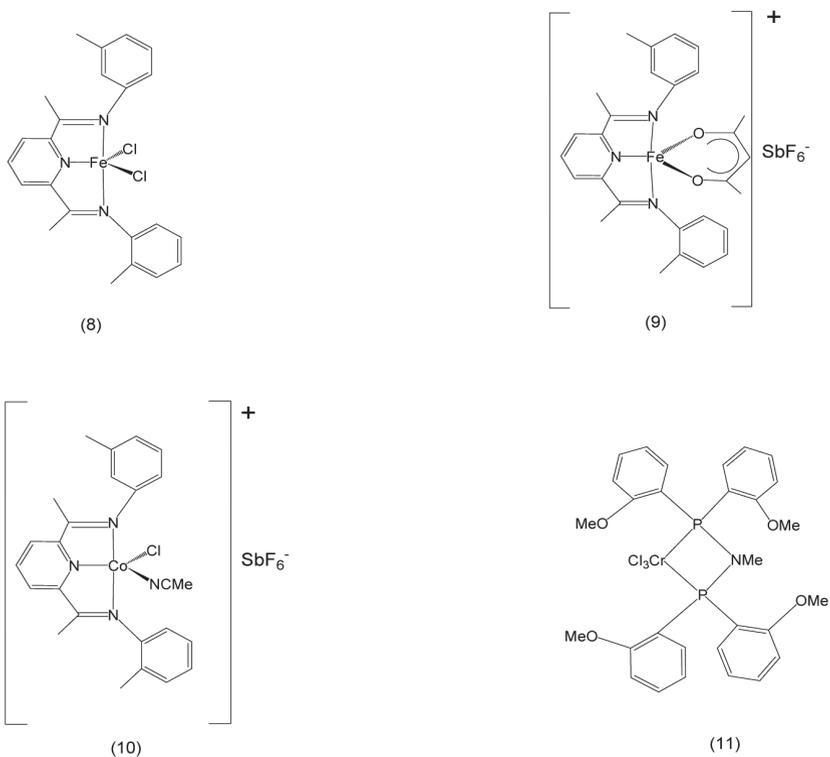


FIGURA 9. Complejos basados en Fe(II), Co(II) y Cr (III), 8-11

En todos los casos el complejo **8** exhibió una muy baja actividad catalítica con una distribución de oligómeros del tipo Shulz-Flory ($\alpha = 0,80$; $\beta = 0,20$). A una relación Al/Fe = 1000 y utilizando [BMIM][PF₆] como solvente se aislaron trazas de polímeros. Un resultado similar se obtuvo bajo la utilización de un sistema bifásico compuesto por [BMIM][PF₆]/Tolueno 2/1 vol. (Chirinos, 2004). El valor de α determinado para el sistema bifásico fue similar al encontrado en el líquido iónico. Estos resultados indican que la reacción de polimerización se lleva a cabo exclusivamente en la fase iónica, como resultado de una mejor solvatación de la especie activa, en vez de ser el resultado de una pequeña proporción de especie activa en la fase orgánica. La baja actividad podría ser el resultado de una fuerte coordinación entre la especie activa y los componentes iónicos.

Los precatalizadores neutro **9** y catiónico **10** fueron activados con co-catalizadores alquilantes y combinaciones de estos con no alquilantes, B(ArF), en líquidos iónicos de diferentes naturaleza resultando poco activos.

No obstante **9** y **10** produjeron polietilenos con masas molares $M_w = 1.200$ y 3.900 y con $M_n = 700$ y 800 correspondientes a C_nH_{2n} con n = 50-57, respectivamente. Estos polietilenos resultaron ser lineales (sin ramificaciones), acorde con el análisis de ¹³C{¹H} RMN. Además, la relación entre las terminaciones de cadena de tipo metilo y vinilo fue aproximadamente 1. Estos resultados soportan la β -H transferencia como el principal mecanismo de terminación.

Interesantemente, el catalizador de cromo derivado de **11**, en [BMIM][Cl₄] ($x_{Al} = 0,57$, ajustado con EDAC), produce polietilenos bajo condiciones suaves de reacción, contrariamente a los productos obtenidos con este mismo catalizador cuando se emplean solventes orgánicos (trímeros y oligómeros de etileno). Para esta reacción no es necesario la adición de MAO debido a que el pre-catalizador es activado directamente por el alquilo de aluminio presente en el

líquido iónico, ya que este forma parte de su composición.

En tolueno y empleando EDAC como cocatalizador también se obtuvieron polietilenos. Ambos polímeros presentaron un promedio de cinco (5) ramificaciones por mil (1000) átomos de carbono, indicando que en ambos casos los polietilenos obtenidos fueron lineales (Chirinos, 2004).

Los valores de actividades en el mismo orden de magnitud y las mismas características de los polímeros obtenidos, sugieren que el cocatalizador modifica la especie activa hacia la reacción de polimerización de etileno indistintamente del solvente usado.

Como puede verse la oligomerización catalizada de olefinas en líquidos iónicos en forma selectiva permanece como un reto científico y tecnológico con un alto potencial de aplicación industrial.

Conclusiones

El empleo de líquidos iónicos ha despertado un gran interés en los últimos años, debido a que estos compuestos presentan una gran utilidad como potenciales reemplazos de compuestos orgánicos volátiles tradicionalmente usados como disolventes. En general, se logran mayores velocidades de reacción y selectividades en reacciones que involucran sustratos orgánicos. En adición a estas ventajas, la no volatilidad, no inflamabilidad y potencial reciclabilidad de estos compuestos los convierten en un medio de reacción alternativo.

Los líquidos iónicos se han descrito como disolventes de diseño, ya que sus propiedades pueden ser adaptadas para satisfacer los requerimientos de un proceso en particular. Variando las características de los iones participantes se pueden fabricar un altísimo número de combinaciones diferentes, comparada con el limitado número de disolventes orgánicos más usados en la industria química.

Las reacciones catalizadas de dimerización, oligomerización y polimerización de olefinas revisten una alta importancia económica, industrial y científica. Sin embargo la exploración de sistemas catalíticos para estas reacciones, en líquidos iónicos, se ha basado principalmente en la utilización de complejos metálicos que han mostrado ser activos en solventes orgánicos. Dada las diferencias de propiedades químicas y fisicoquímicas de los líquidos iónicos y los solventes orgánicos la estrategia actual de exploración no parece ser la más apropiada para el desarrollo de sistemas catalíticamente activos y selectivos.

En general, los desarrollos científicos y tecnológicos en el uso de líquidos iónicos, van orientados a la obtención de nuevos y mejores procesos que sean más respetuosos con el medio ambiente, que resulten más económicos y que utilicen menos cantidad de energía y de materia prima; en definitiva lo que se pretende es la optimización de los mismos para alcanzar los máximos rendimientos posibles con los menores impactos sobre el medio ambiente.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) y a FUNDADESARROLLO-LUZ por financiamientos otorgados durante la ejecución de esta investigación.

Referencias

- Anastas P. y Kirchhoff M. (2002). "Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry", *Acc. Chem. Res.*, 35 (9), 686–694.
- Anderson, J.; Ding, R.; Ellern, A.; Armstrong, D. (2005). "Structure and Properties of high stability germinal dicationic ionic liquids", *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 593-604.

Atkins, M.; Seddon, K.; Swadzba-Kwasny, M. (2011). "Oligomerisation of linear 1-olefins using a chlorogallate(III) ionic liquid", *Pure and Applied Chemistry*.

Baker, G.; Baker S.; Pandey, S.; Bright, F. (2005). "An analytical view of ionic liquids", *Analyst*, 130, 800-808.

Chauvin, Y.; Gilbert, B.; Guibard, I. (1990). "Catalytic dimerization of alkenes by nickel complexes in organochloroaluminates molten salts", *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, 1715-1716.

Chauvin, Y.; Einloft, S.; Olivier, H. (1995). "Catalytic Dimerization of Propene by Nickel-Phosphine Complexes in 1-Butyl-3-methylimidazolium Chloride/ $AlEt_xCl_{3-x}$ ($x = 0, 1$) Ionic Liquids", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 1149-1155.

Chauvin, Y. y Olivier-Bourbigou, H. (1995). "Nonaqueous ionic liquids as reaction solvents", *Chem. Tech*, 27, 26-30.

Chiappe C. y Pieraccini D. (2005). "Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity", *J. Phys. Org. Chem.*, 18, 275-297.

Chirinos, J. (2004). "Oligomerización de olefinas en líquidos iónicos", Trabajo de Ascenso Categoría de Profesor Asociado, Dpto. de Química-FEC. LUZ.

Coelho, L.; Dupont, J.; Souza, F. (1998). "Two-phase n-butenes dimerization by nickel complexes in molten salt media", *Applied Catalysis A: General*, 175, 215-220.

Commereuc D.; Forestiere A.; Hugues F.; Olivier-Bourbigou H. (2003). "Sequence of processes for olefin oligomerisation". US 6.646.173.

Corma, A.; Martinez, C.; Daskocil, E.; Yaluris, G. (2008). "Alkene oligomerization process". EP 2 272 939 B1.

- Dötterl, M. y Alt, H. (2011). "Heavy Metal with a Heavy Impact: Olefin Dimerization Reactions in Triphenylbismuth Buffered Chloroaluminate Ionic Liquids", *ChemCatChem*, 3(11), 1799-1804.
- Dötterl, M. y Alt, H. (2012). "Buffered Aluminum Chloride as a Highly Efficient Cocatalyst for Olefin Dimerization and Polymerization", *ChemCatChem*, 4(3), 370–378.
- Dötterl, M.; Alt, H.; Schmidt, R. (2012). "Buffered ionic liquids for olefin dimerization" Patente No. US 20120136189 A1.
- Dötterl, M. y Alt, H. (2012). Nickel-Catalyzed Propene Dimerization Reactions in Triphenylbismuth-Buffered Chloroaluminate Ionic Liquids: High Performance with Unconventional Cations", *Advanced Synthesis & Catalysis*, 354(2-3), 399-407.
- Dötterl, M. y Alt, H. (2012). "Silica Based Cocatalysts for Heterogeneous Olefin Dimerization and Ethene Polymerization Reactions with Nickel Complexes". *ChemCatChem*, 4(5), 660-667.
- Dupont, J. ; De Souza, R. ; Paulo, A. (2002). "Ionic Liquid (Molten Salt) Phase Organometallic Catalysis ", *Chem. Rev.*, 102, 3667-3692.
- Dzyuba S. y Bartsch R. (2002). "Influence of structural variations in 1-alkyl(aralkyl)-3-methylimidazolium hexafluorophosphates and bis-(trifluoromethylsulfonyl)imides on physical properties of the ionic liquids", *Chem. Phys. Chem.*, 3, 161-166.
- Elomari, S.; Krug, R.; Miller, S. (2011). "Process to make base oil from thermally craked Wasi feed using ionic liquids catalyst". US 7,973,204 B2.
- Elomari, S. y Miller, S. (2012). "Oligomerization of propylene to produce base oil products using ionic liquids-based catalysis". US 8,124,821 B2.

- Fannin, A.; Floreani, D.; King, L.; Landers, J;Piersma B., Stech D., Vaughn R., Wilkes J., Williams J. (1984). "Properties of 1,3-dialkylimidazolium chloride-aluminium chloride ionic liquids: phase transitions, densities, electrical conductivities, and viscosities", *J. Phys. Chem.*, , 88, 2614-2621.
- Fuller, J.; Carlin, R.; Delong, H., Haworth D. (1994). "Structure of 1-ethyl-3methylimidazolium hezafluorophosphate-model for room-temperature molten-salts", *Chem. Commun*, 299-300.
- Gilbert, B.; Chauvin, Y.; Di-Marco-van. (1995). "Disproportionation of polynuclear chloroethylaluminat anions in acidic 1-butyl-3-methylimidazolium chloride-AlEtCl₂ molten salts in the presence of a hydrocarbon phase", *J. Chem.Soc. Dalton Trans*, 23, 3867-3871.
- Ibarra, D. y Chirinos J. (2009). "Reacciones de dimerización, oligomerización y polimerización en líquidos iónicos", Seminario Calificador de Doctorado en Química. División de Estudios para Graduados. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.
- Kärkkäinen, J. (2007). "Preparation and characterization of some ionic liquids and their use in the dimerization reaction of 2-ethylpropene", *Acta Univ. Oul. A.*, 480, 1-14.
- Kenneth, H.; Donald, T.; Donald, S.; Barry, C. (2012). "Method for manufacturing high viscosity polyalphaolefins using ionic liquid catalysts". EP 2 272 814 A2
- Kubisa, P. (2004). "Application of ionic liquids as solvents for polymerization processes", *Progress in Polymer Science*, 29, 3-12.
- Lall, S.; Mancheno, D.; Castro, S.; Behaj, V.; Cohen, J.; Engel, R. (2000). "Polycations. Parte X. LIPs, A new category of room

temperature ionic liquid based on polyammonium salts ", *Chem Commun.*, 2413-2414.

Lecocq, V. y Olivier-Bourbigou, H. (2007). "Biphasic Ni-catalized ethylene oligomerization in ionic liquid", *Oil & Gas Science and Technology*, 62, 761-773.

Ligabue, R.; De Souza, R.; Dupont, J. (2001). "Liquid-liquid two-phase cyclodimerization of 1,3-dienes by iron-nitrosyl dissolved in ionic liquids ", *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 169, 11-17.

Liu, S.; Shang, J.; Zhang, S.; Yang, B.; Deng, Y. (2012). "Highly efficient trimerization of isobutene over silica supported chloroaluminate ionic liquid using C4 feed", *Catalysis Today*, En prensa (disponible vía web desde el 24 de julio 2012).

Nikiforidis, I.; Görling, A.; Hieringer, W. (2011). "On the regioselectivity of the insertion step in nickel complex catalyzed dimerization of butene: A density-functional study", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 341 (1-2), 63-70.

Ochędzan-Siodłak, W. (2011). "Ionic Liquids in Biphasic Ethylene Polymerisation"(Ed. Alexander Kokorin), In Tech, Croacia. 20-44.

Olivier-Bourbigou, H.; Magna, L.; Morvan, D. (2010). "Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications", *Applied Catalysis A: General*, 373(1-2), 1-56.

Patil, A. y Bodige S. (2012) "Process for synthetic lubricant production". US 8,143,467 B2.

Plechkova N. y Seddon K. (2008). "Applications of ionic liquid in the chemical industry", *Chem. Soc. Rev.*, 37, 123-150.

- Qinghua, Z.; Shiguo, Z.; Youquan, D. (2011). "Recent advances in ionic liquid catalysis", *Green Chem.*, 13, 2619-2637.
- Ray, S.; Rao, P.; Choudary, N. (2012). "Poly- α -olefin-based synthetic lubricants: a short review on various synthetic routes", *Lubrication Science*, 24(1), 23-44.
- Seddon, K.; Hardacre, C.; McAuley, B. (2003). "Catalyst comprising indium salt and organic ionic liquid and process for Friedel-Crafts reactions", Patent WO 2003028883.
- Sheldon, R. (2001). "Catalytic reactions in ionic liquid", *Chem. Commun.*, 2399-2407.
- Silvana, M.; Suarez P.; De Souza, R.; Dupont, J. (1998). "Selective linear dimerization of 1,3-butadiene by palladium compounds immobilized into 1-n-butyl-3-methyl imidazolium ionic liquids", *Polymer Bulletin*, 40, 401-405.
- Souza, R.; Leal, B.; Oberson, M.; Thiele, D. (2007). "Nickel-catalyzed propylene dimerization in organochloroaluminate ionic liquids: Control of the isomerization reaction", *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 272, 6-10.
- Timken, H. y Elomari S. (2009). "Isomerization of butene in the ionic liquid catalyzed alkylation of Light isoparaffins and olefins". US 20090192339 A1.
- Van Doorslaer, C.; Wahlen, J.; Mertens, P.; Binnemans, K.; De Vos, D. (2010). "Immobilization of molecular catalysts in supported ionic liquid phases", *Dalton Trans.*, 39, 8377-8390
- Wang, X.; Sobota, M.; Kohler, F.; Morain, B.; Melcher, B.; Laurin, M.; Wasserscheid, P.; Libuda, J.; Meyer, K. (2012). "Functional

nickel complexes of N-heterocyclic carbene ligands in pre-organized and supported thin film materials", *J. Mater. Chem.*, 22, 1893-1898.

Wasserscheid P y Keim W. (2000). "Ionic liquid- New "solutions" for Transition Metal Catalysis", *Angew Chem. Int. Ed.*, 39, 3772-3789.

Wasserscheid, P; Gordon, Ch.; Hilgers, C.; Muldoon, M.; Ian, R. (2001). "Ionic liquids: polar, but weakly coordinating solvents for the first biphasic oligomerisation of ethene to higher α -olefins with cationic Ni complexes", *Chem. Commun.*, 1186–1187.

Welton, T. (1999). "Room-Temperature ionic liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis", *Chem. Rev*, 99, 2071-2083.

Welton, T. (2004). "Ionic liquid in catalysis", *Coordination Chemistry Reviews*, 48, 2459-2477.

Williams, S.; Schoebrechts, J.; Selkirk, J., Mamantov, G. (1987). "A new room temperature molten salt solvent system: organic cation tetrachloroborates", *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 2218-2219.

Yang, S.; Liu, Z.; Meng, X.; Xu, C. (2009). "Oligomerization of Isobutene Catalyzed by Iron(III) Chloride Ionic Liquids", *Energy & Fuel*, 23, 70–73.

Zenon, J. y Osteryoung, R. (1984). "Determination of equilibrium constants for the tetrachloroaluminate ion dissociation in ambient-temperature ionic liquids", *Inorg. Chem.*, 23, 1491-1494.

Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta)

Díaz-Borrego Laugeny¹
Vera, Alexandra¹
Marín, Julio²
Aiello-Mazzarri, Cateryna³
Briceño, Beltrán¹
Morales, Ever¹

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto combinado del queroseno y la concentración de nutrientes (Nitrofoska®, NPK) en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (*Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* sp.), aisladas de una fosa petrolera. Se realizaron cuatro tratamientos: queroseno 0,5%-NPK 1 mL/L (Q0,5-1), queroseno 0,5%-NPK 3 mL/L (Q0,5-3), queroseno 1%-NPK 1 mL/L (Q1-1), queroseno 1%-NPK 3 mL/L (Q1-3) y se utilizaron dos controles: sin queroseno-NPK 1 mL/L (C-1), sin queroseno-NPK 3 mL/L (C-3). Los cultivos se evaluaron cada 4 días, midiendo el pH, peso seco, densidad celular, pigmentos e hidrocarburos totales (TPH). Con Q0,5-1 se inhibió el crecimiento de *Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* sp. en un 32,99 y 42,29%, respectivamente. Con Q0,5-1, Q0,5-3 y Q1-1 no se afectó la producción de pigmentos, pero si el crecimiento mi-

¹Laboratorio de Micro-organismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo 4001, Venezuela. E-mail: laugeny@yahoo.com

²Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA), Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Civil, Universidad del Zulia, Maracaibo 4001, Venezuela.

³Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo 4001, Venezuela.

croalgal. El peso seco no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). En Q1-3 la inhibición de las poblaciones fue mayor (53,01 y 61,49%) al igual que los pigmentos. No obstante, la biodegradación de TPH fue de 68% en Q0,5-1 y Q0,5-3 y del 42,71 y 56,73% en Q1-1 y Q1-3, respectivamente. Los cultivos mixtos de microalgas y bacterias asociadas pueden utilizarse para la remoción de hidrocarburos con el fertilizante NPK a 1 mL/L destacándose su potencial biorremediador.

PALABRAS CLAVE: cultivo mixto, microalgas, nutrientes, queroseno.

Effect of kerosene and the concentration of nutrients in the growth of a mixed culture of microalgae (Chlorophyta)

ABSTRACT

In this research the combined effect of kerosene and the nutrient's concentration (Nitrofoska®, NPK), in the growth of a mixed culture of microalgae (*Coenochloris* sp. and *Chlorococcum* sp.) isolated from an oil pit was evaluated. Four treatments were applied to the samples: 0.5% kerosene-NPK 1 ml / L (Q0,5-1), NPK kerosene 0.5%, 3 mL/L (Q0,5-3), NPK kerosene 1%-1 mL/L (Q1-1), NPK Kerosene 1%, 3 mL/L (Q1-3) and two controls: no-NPK kerosene 1 mL/L (C-1), NPK without kerosene-3 mL/L (C-3). Cultures were evaluated every 4 days by measuring pH, dry weight, cell density, pigments and total hydrocarbons (TPH). With Q0,5-1 the growth of *Coenochloris* sp. and *Chlorococcum* sp was inhibited by 32.99% and 42.29%, respectively. With Q0,5-1, Q0,5-3 y Q1-1 the production of pigments was not affected, but the microalgae growth was affected significantly. The dry weight showed no significant differences between treatments ($p < 0.05$). In Q1-3 the inhibition of the populations was higher (53.01% and 61.49%) as the production of pigments. However, the biodegradation of TPH was 68% in Q0,5-1 and Q0,5-3, and 42.71 and 56.73% in Q1-1 and Q1-3, respectively. Mixed cultures of microalgae and associated bacteria can be used for the removal of hydrocarbons with fertilizer NPK to 1 mL/L with potential for bioremediation.

KEYWORDS: kerosene, microalgae, mixed culture, nutrients.

Introducción

La industria petrolera venezolana es una de las más importantes del mundo, estimándose en el año 2011 una producción de crudo de 2.991 mil barriles diarios (MBD), una capacidad de refinación de 1.155 MBD y de exportación de 2.469 MBD (PDVSA, 2011). Esta intensa actividad petrolera ha condicionado la aparición de fosas petroleras, que constituyen un sistema ambiental con características propias, donde se han observado crecimiento de microalgas, cianofitas, bacterias, plantas e invertebrados, entre otros (Sulbarán, 2005).

Pocos han sido los trabajos publicados en Venezuela sobre el uso de consorcios de microalgas para la recuperación de ambientes contaminados con petróleo, puesto que la mayoría han sido relegados a favor de las bacterias. No obstante, se ha documentado que los hidrocarburos en ambientes naturales o artificiales, pueden ser atacados para su biotransformación y biodegradación por la acción de diversas microalgas y cianobacterias. Éstas proveen de carbono reducido y nitrógeno a la microbiota presente en los ecosistemas acuáticos, actuando también en la remoción de nutrientes, metales pesados y patógenos (Muñoz y Guieysse, 2006), lo que incrementa el potencial de degradación y eliminación de contaminantes por parte de estas comunidades microbianas (Ferrera-Cerrato et al, 2006).

El queroseno ha sido utilizado como sustrato modelo en estudios de biodegradación debido a que contiene una elevada concentración de saturados y aromáticos que son las fracciones orgánicas mayormente degradadas por los microorganismos; así los microorganismos capaces de crecer en queroseno serán capaces de emplear al menos una de las fracciones de hidrocarburos contenidas en la mezcla del petróleo (Altamirano y Pozo, 2001).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto combinado del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de

un cultivo mixto de microalgas (*Chlorophyta*), aisladas de una fosa petrolera venezolana.

1. Metodología

1.1. Microalgas

Las microalgas de la División Chlorophyta (*Chlorococcum* sp. y *Coenochloris* sp.) se aislaron de muestras de agua de una fosa petrolera ubicada la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, en las coordenadas N 10° 44' 197'' y W 71° 38' 795'' a una altura de 16,5 m. Estas microalgas forman parte del cepario del Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, de la Universidad del Zulia. Ambas microalgas pertenecen a la División Chlorophyta, que tiene en común la presencia de un único cloroplasto en forma de copa con un solo pirenoide. *Chlorococcum* es unicelular con células esféricas o ligeramente ovaladas de tamaño variable, pueden estar solitarias o en agrupaciones irregulares; mientras que, *Coenochloris* forma colonias de cuatro, ocho, 16 o más células planctónicas dentro de una estructura mucilaginososa y con un tamaño aproximado de 8 μm (Needham y Needham, 1978).

1.2. Evaluación del crecimiento microalgal en queroseno

Las microalgas (en cultivos unialgales) se escalaron a 2,5 L hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento y se cultivaron en frascos de vidrio con 100 mL de un medio orgánico elaborado con agua destilada estéril suplementada con fertilizante () y queroseno. Se emplearon dos concentraciones de fertilizante (1 y 3 mL/L) y dos concentraciones de queroseno (0,5 y 1,0% v/v). Los cultivos se mantuvieron durante 32 días, con fotoperíodo luz: oscuridad de 12:12h, agitación manual diaria y temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (Briceño et al, 2003). Para la siembra de los frascos se utilizó un inóculo de $2,5 \times 10^6$ cel/mL de cada microalga.

Se realizaron cuatro tratamientos: Q0,5-1: queroseno 0,5% + NPK 1 mL/L; Q0,5-3: queroseno 0,5% + NPK 3 mL/L; Q1-1: queroseno 1% + NPK 1 mL/L y Q1-3: queroseno 1% + NPK 3 mL/L, y se ensayaron dos controles C-1: sin queroseno + NPK 1 mL/L; C-3: sin queroseno + NPK 3 mL/L. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

1.3. Estimación de parámetros de crecimiento

Para determinar la densidad celular del cultivo se realizaron recuentos celulares en cámara Neubaüer, calculando la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de acuerdo a Lobban et al (1988). Se realizaron determinaciones de biomasa (peso seco) (Utting, 1985), pigmentos (clorofila total (a+b) y carotenoides) (Jeffrey y Humphrey, 1975), y se cuantificó la flora bacteriana asociada mediante el recuento en placas (APHA et al, 2005). Adicionalmente, se determinó el contenido de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) al inicio y al final de las experiencias realizando extracciones con cloroformo (APHA et al, 2005).

1.4. Análisis estadístico

Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos y se aplicó un diseño completamente al azar (ANOVA de una vía). También se aplicó la Prueba de Tukey para estimar diferencias significativas entre los tratamientos.

2. Resultados y discusión

2.1. Crecimiento de las microalgas *Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* sp. en queroseno

En la Tabla 1 se presentan los parámetros de crecimiento y en las Figuras 1 y 2 se presenta el perfil de crecimiento de las microalgas en queroseno a las diferentes concentraciones de nutrientes.

TABLA 1. Parámetros de crecimiento de *Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* sp., bajo las condiciones de cultivo establecidas en el presente estudio.

Tratamiento	μ (div.días ⁻¹)	t_d (días)	Densidad celular (cel x 10 ⁶ /mL)	Inhibición (%)
<i>Coenochloris</i> sp.				
C-1	0,36	1,92	4,94±1,88	-
C-3	0,22	3,15	3,98±1,33	-
Q0,5-1	0,28	2,47	3,31±0,88	32,99
Q0,5-3	0,22	3,15	2,46±0,92	38,19
Q1-1	0,16	4,33	2,54±1,15	48,58
Q1-3	0,11	6,30	1,87±1,05	53,01
<i>Chlorococcum</i> sp.				
C-1*	0,07	9,90	8,19±6,24	-
C-3**	0,04	17,32	5,61±2,92	-
Q0,5-1	0,04	17,32	4,73±2,26	42,24
Q0,5-3	0,03	23,10	3,16±0,74	43,67
Q1-1*	0,03	23,10	3,21±0,87	60,80
Q1-3**	0,05	13,86	2,16±1,05	61,49

μ : velocidad de crecimiento, t_d : tiempo de duplicación. **C-1**: control I sin queroseno suplementado con fertilizante (1 mL/L), **C-3**: control II sin queroseno suplementado con fertilizante (3 mL/L), **Q0,5-1**: tratamiento con queroseno al 0,5% y fertilizante (1 mL/L), **Q0,5-3**: tratamiento con queroseno al 0,5% y fertilizante (3 mL/L), **Q1-1**: tratamiento con queroseno al 1,0% y fertilizante (1 mL/L), **Q1-3**: tratamiento con queroseno al 1,0% y fertilizante (3 mL/L), * y ** indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

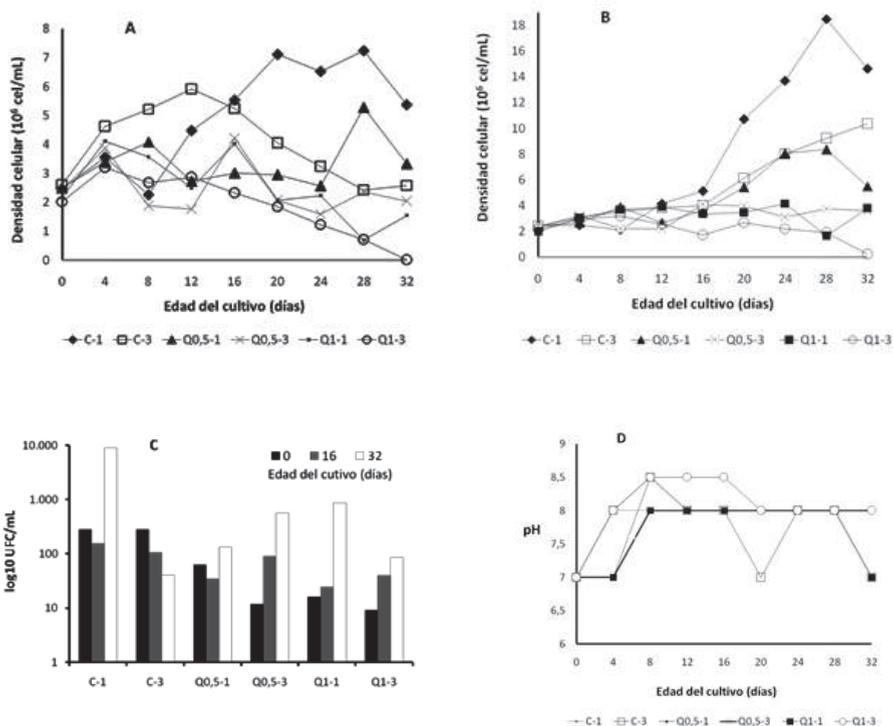


FIGURA 1. Dinámica de crecimiento poblacional de *Coenochloris* sp. (a) y *Chlorococcum* sp. (b), recuento de bacterias asociadas al cultivo mixto (c) y comportamiento del pH (d). C-1: control I sin queroseno suplementado con fertilizante (1 mL/L), C-3: control II sin queroseno suplementado con fertilizante (3 mL/L), Q0,5-1: tratamiento con queroseno al 0,5% y fertilizante (1 mL/L), Q0,5-3: tratamiento con queroseno al 0,5% y fertilizante (3 mL/L), Q1-1: tratamiento con queroseno al 1,0% y fertilizante (1 mL/L), Q1-3: tratamiento con queroseno al 1,0% y fertilizante (3 mL/L).

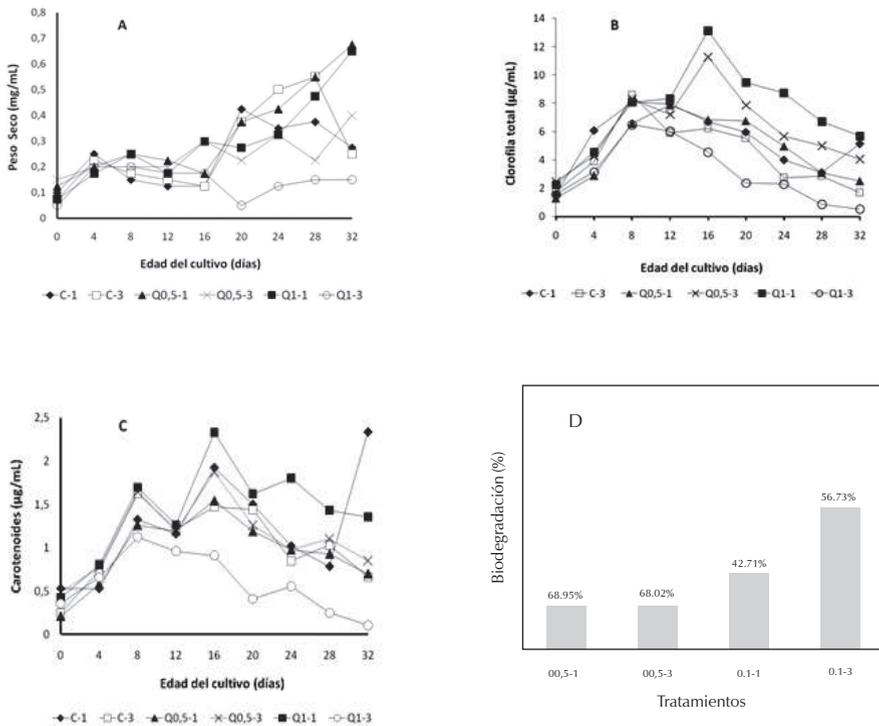


FIGURA 2. Comportamiento del peso seco (a), Clorofila total (b), carotenoides (c) por el cultivo mixto de *Coenochloris* sp. y *Chlorococcum* sp. Biodegradación de queroseno (d). C-1: control I sin queroseno suplementado con fertilizante (1 mL/L), C-3: control II sin queroseno suplementado con fertilizante (3 mL/L), Q0,5-1: tratamiento con queroseno al 0,5% y fertilizante (1 mL/L), Q0,5-3: tratamiento con queroseno al 0,5% y fertilizante (3 mL/L), Q1-1: tratamiento con queroseno al 1,0% y fertilizante (1 mL/L), Q1-3: tratamiento con queroseno al 1,0% y fertilizante (3 mL/L).

La mayor inhibición del crecimiento microalgal, con diferencias significativas ($p < 0,05$), se observó en Q1-1 y Q1-3. Sin embargo, la concentración de nutrientes aparentemente no afecta el crecimiento de las microalgas (Figura 1, Tabla 1). La mayor densidad celular, tanto para *Coenochloris* sp., como para *Chlorococcum* sp., se obtuvo en los controles C-1 y C-3.

También se aprecia que la μ disminuye y el t_d aumenta en presencia de queroseno al 1,0%; indicando su efecto tóxico sobre las microalgas, similar a lo obtenido por Briceño et al (2003) en las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. que inhibieron su crecimiento en un 60% en queroseno, y por Morales-Loo y Goutx, (1990) quienes reportan un crecimiento retardado de poblaciones de microalgas como *Nitzschia*, *Asterionella*, *Rhodomonas* y *Dunaliella* en presencia de fracción soluble de petróleo.

Al comparar las curvas de crecimiento en *Coenochloris* sp. (Figura 1a) se aprecia un acortamiento de la fase exponencial de crecimiento en presencia de queroseno, que se inicia desde el día 0 y se extiende por 4 a 8 días, en comparación con *Chlorococcum* sp. (Figura 1b), que presentó una fase de adaptación de unos 16 días. Momento en que inicia la fase exponencial de crecimiento, exhibiendo ligeras fluctuaciones en los recuentos celulares culminando la curva con un decaimiento de la población. Sin embargo, *Chlorococcum* sp. mostró la mayor densidad celular promedio en los tratamientos (Tabla 1).

Es posible que se haya generado algún tipo de competencia entre las microalgas en los controles sin queroseno, porque cuando decae la población de *Coenochloris* sp. comienza a incrementarse la de *Chlorococcum* sp. Esto parece indicar que *Coenochloris* sp. puede liberar algún factor inhibitorio como producto de su metabolismo sobre *Chlorococcum*. En el fitoplancton las poblaciones compiten por nutrientes, así como por la luz, llegando algunas especies a desarrollar habilidades para mejorar su capacidad de utilizar esas fuentes de nutrientes y mejorar su actividad competitiva en el ambiente con efectos negativos directos en otras especies competidoras, como lo puede ser a través de la liberación de compuestos químicos, fenómeno conocido como alelopatía (Fistarol et al, 2004). Las alelopatías presentadas en el fitoplancton pueden llegar a tener efecto en más de una microalga, tal como lo observaron Mahmoud y Rahman (2005), al evaluar el efecto de extractos crudos

de dos cianobacterias (productoras de toxinas) sobre el crecimiento y algunas actividades fisiológicas de dos microalgas unicelulares (*Chlorella vulgaris* y *Chlorococcum humicola*). Zhang et al (2007), por su parte, establecen el comportamiento de un consorcio microalgal, demostrando que la actividad metabólica de *Microcystis aeruginosa* se vio inhibida, como resultado de la limitación de la luz (ensombrecimiento) provocado por la población de *Coenochloris pyrenoidosa*.

2.2. Bacterias asociadas al cultivo mixto de las microalgas

No se encontró diferencias significativas en los recuentos bacterianos en los diferentes tratamientos ($p > 0,05$); sin embargo, estos incrementaron a través del tiempo; excepto en el control C-3. Por lo que, es posible que la mayor concentración de nutrientes cause inhibición en el crecimiento bacteriano (Figura 1c), quizás debido a la saturación de enzimas encargadas de la asimilación de esos nutrientes. Sin embargo, en presencia de queroseno la concentración de nutrientes parece ser importante para mantener los niveles de las poblaciones bacterianas, es decir que aumenta la biodisponibilidad, lo cual estaría en función de las enzimas degradadoras de estas fuentes de carbono y así posteriormente hacerlas más disponibles a las mismas bacterias para su crecimiento (Safonova et al 1999).

La mayor densidad bacteriana ocurre hacia el final del ensayo, donde ya muchas células de las microalgas han muerto, formando parte del detritus. La degradación de células microalgales lisadas resulta en la conversión de compuestos de fósforo y nitrógeno orgánico a inorgánico, liberando nutrientes solubles que pueden retomar nuevamente las microalgas, y a cambio, las bacterias degradan los hidrocarburos reduciendo su toxicidad (Riquelme y Avendaño, 2003; Abed y Koster, 2005; Sigeo, 2005).

Se encontraron correlaciones positivas entre el crecimiento de ambas microalgas y los recuentos bacterianos ($r=0,640$, $p<0,01$ para *Coenochloris* y $r=0,656$, $p<0,01$ para *Chlorococcum*). Safonova et al (1999) señalan que la combinación de bacterias alcalinotróficas con cepas representativas de microalgas (*Stichococcus*, *Chlorella* y *Scenedesmus*), y de cianobacterias (*Nostoc* y *Phormidium*) restauraron la reproductividad de microalgas sensibles al petróleo y estimularon el crecimiento de cepas tolerantes. Así el consorcio establecido entre bacterias y microalgas potencia la biodegradación de los hidrocarburos.

2.3. Comportamiento del pH

El mayor pH fue el obtenido por el tratamiento Q1-3 con 8,05, en comparación con Q1-1, que estuvo en 7,66. En promedio, el pH de los cultivos (Figura 1d) se mantuvo de neutro a alcalino, lo cual favorece el crecimiento microalgal y la producción de clorofila total ($r=0,440$, $p<0,01$), probablemente por la asimilación de fuentes de nitrógeno que favorecen el aumento del pH (Yépez y Morales, 1998). Se ha establecido que el principal mecanismo de remoción de nutrientes en aguas residuales incluyen captura al interior celular y liberación de amonio, elevándose el pH (Aslan y Kapdan, 2006).

2.4. Peso seco

Este parámetro permite estimar la asimilación de los hidrocarburos y nutrientes por las microalgas y sus bacterias asociadas. Los valores de peso seco oscilaron entre $0,14\pm 0,05$ y $0,33\pm 0,18$ mg/L en los tratamientos y controles; sin diferencias significativas entre estos ($p>0,05$). En la Figura 2a se observa que el peso seco en los tratamientos Q0,5-1, Q1-1 y en el control C-3, la mayor producción se estimó a partir de los 16 días del cultivo, pero en C-3 el peso seco decae el día 28. Mientras que, los tratamientos Q0,5-3 y Q1-3 presentaron un peso seco relativamente constante a través del tiempo, siendo la menor producción la estimada para Q1-3,

presumiéndose que la mayor concentración de nutrientes afecta el peso seco del cultivo mixto.

Se encontraron correlaciones positivas entre el peso seco y la densidad celular de *Chlorococcum* ($r=0,477$, $p<0,01$) y los recuentos bacterianos ($r=0,656$, $p<0,01$) por lo que estos pueden ser determinantes en el incremento del peso seco en los tratamientos.

2.5. Producción de pigmentos

La producción promedio de pigmentos, en la forma de clorofila total (Figura 2b) incrementó con la concentración de queroseno ($7,44\pm 0,30$ $\mu\text{g/mL}$ en Q1-1 y $6,24\pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$ en Q0,5-3) en comparación con los controles ($5,40\pm 0,36$ $\mu\text{g/mL}$ en C-1 y $4,35\pm 0,14$ $\mu\text{g/mL}$ en C-3) y con el tratamiento Q0,5-1 ($4,76\pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$), similar a lo obtenido por Gamila et al (2003) con las cianobacterias *Anabaena sphaerica* y *Oscillatoria agardhii* en petróleo crudo. No obstante, la mayor concentración de nutrientes (3 mL/L) parece inhibir significativamente ($p<0,05$) la concentración de clorofila total ($3,10\pm 0,37$ $\mu\text{g/mL}$) y de carotenoides ($0,59\pm 0,39$ $\mu\text{g/mL}$) en 28,73 y 42,71%, respectivamente.

En la Figura 2b se puede apreciar que el día 16 los tratamientos Q1-1 y Q0,5-3, alcanzan su máxima producción de pigmentos. Es posible que en este punto de la curva (final de fase exponencial), las bacterias asociadas hayan estimulado el crecimiento y la producción de pigmentos de las microalgas en presencia de queroseno, comportamiento similar a lo ocurrido con el peso seco. Así lo demuestra la correlación positiva establecida entre los recuentos bacterianos y la producción de carotenoides ($r=0,607$, $p<0,01$)

El aumento en la concentración de pigmentos a partir del día 28 en el tratamiento C-1, coincide con el momento en que la microalga *Chlorococcum* sp. alcanzó el máximo crecimiento exponencial. Es notable, además, que en la mayoría de los tratamientos la producción

de pigmentos de los cultivos decae entre los 16 y 20 días de edad del cultivo, tornándose cloróticos, por la presencia de pigmentos carotenoides (color amarillento), especialmente en C-1 donde la producción de carotenoides se dispara al final del ensayo. Algunas veces se induce una clorosis con la degradación de la clorofila, dejándose expuestos a los carotenoides, que no necesariamente se incrementan (Yépez y Morales, 1998). En la Figura 2c se muestra el comportamiento de los carotenoides, cuya producción es similar a la obtenida con la clorofila total, sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Tukaj (1987), indicó que la fracción soluble de petróleo y de combustible afectó disminuyendo el número de células, peso seco y producción de clorofila *a* en la microalga *Scenedesmus quadricauda*. Del mismo modo, Morales-Loo y Goutx (1990) obtuvieron que en mayoría de las microalgas planctónicas acusaron disminución del contenido de clorofila *a*, pigmentos lipídicos, glicolípidos y triglicéridos, mientras se acumulan los esteroides e hidrocarburos.

2.6. Biodegradación de queroseno por el cultivo mixto de las dos microalgas

Se evidenció una eficiente biodegradación de queroseno por el cultivo mixto de las dos microalgas y bacterias asociadas (Figura 2d), cercano a un 68% en Q0,5-1 y Q0,5-3, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) y entre el 42,71 y 56,73% en Q1-1 y Q1-3, con diferencias significativas ($p < 0,05$). Sin embargo, deben realizarse estudios adicionales para establecer la vía de degradación de hidrocarburos por el cultivo mixto. Las pérdidas por evaporación estimadas en un control no inoculado contaminado con queroseno fueron del 5%.

Comparativamente, Raghukumar et al (2001), al emplear un cultivo mixto con las cianobacterias *Oscillatoria salina*, *Plectonema terebrans* y *Aphanocapsa* sp. removieron más del 40% del crudo formando un tapete microbiano en los glóbulos de petróleo cuando conformaron

un cultivo mixto. Mientras que, Lima et al (2004) pudieron remover 100% de *p*-clorofenol a una concentración de 150 mg/mL adsorbido a zeolita, mediante un cultivo mixto de microalgas conformado por las microalgas *Chlorella* sp. y *Coenochloris pyrenoidosa*.

Conclusiones

El queroseno afectó el crecimiento de cultivo mixto, pero no la biomasa ni la producción de pigmentos de las microalgas; mientras que, la flora bacteriana asociada fue estimulada en su presencia. El crecimiento del cultivo mixto fue similar con ambas concentraciones de nutrientes, por lo que se sugiere el uso de la menor concentración empleada (1 mL/L), a fin de minimizar los costos relacionados con el cultivo. Finalmente, el consorcio de las microalgas con sus bacterias asociadas fue capaz de degradar el queroseno eficientemente en un 68% para los tratamientos con queroseno al 0,5% y entre el 42,71 y 56,73% en queroseno al 3%, destacándose el potencial biorremediador del consorcio microbiano establecido.

Referencias

- Abed, R. M. M., Koster, J. (2005). The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 55: 29-37.
- APHA, AWWA, WEF. (2005). American Public Health Association. Standard methods for examination of water and wastewater. 21th Edition. New York, USA. 1427 p.
- Aslan, S., Kapdan, K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*. 28: 64-70.

- Altamirano, M. G., Pozo, M. G. (2001). III-31-Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburohílicas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVI Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Brasil.
- Briceño, B., Jonte, L., Ortega, J., Rosales, N., Morales, E. (2003). Respuesta de las Cianobacterias tropicales *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. a derivados del petróleo. *Acta Biológica Venezuelica*. 23(4): 31-41.
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N., Poggi-Varaldo, H., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2):179-187.
- Fistarol, G., Legrand, C., Rengefors, K., Granéli, E. (2004). Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology*. 6(8): 791-798.
- Gamila, A. H., Ibrahim, M.B.M., El-Ghafar, A. (2003). The role of cyanobacterial isolated strains in the biodegradation of crude oil. *International Journal of Environmental Studies*. 60(5): 435-444.
- Jeffrey, S., Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c23 in higher plants, algae and natural populations. *Biochemical Physiology Pflanzan*. 167:191-194.
- Lima, S. A. C., Raposo, F. M., Castro, M. L., Morais, R. M. (2004). Biodegradation of *p*-chlorophenol by a microalgae consortium. *Water Research*. 38: 97-102.

- Lobban, C., Chapman, D., Kremer, B. (1988). *Experimental Phycology: a Laboratory manual*. New York, USA. Cambridge University Press. 295 p.
- Mahmoud, H., Rahman, A. (2005). Effects of Cyanobacteria crude extracts on growth and related physiological activities of *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Arab Journal of Biotechnology*. 8(1): 9-18.
- Morales-Loo, M. R., Goutx, M. (1990) Effects of water-soluble fraction of the Mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of chlorophyll *a*, and lipid composition of planktonic microalgae. *Marine Biology*. 104: 503-509.
- Muñoz, R., Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*. 40(15): 2799-2815.
- Needham, J., Needham, P. R. (1978). *Guía de estudio de los seres vivos de las aguas dulces*. Editorial Reverté, S. A. Nápoles, Barcelona. 123 p.
- Petróleos de Venezuela, S.A (PDVSA) y sus Filiales. (2011). *Informe de Gestión Anual 2011*. Período del 01 de enero al 31 de diciembre de 2011. 241 p.
- Raghukumar, C., Viparty, V., David, J. J., Chandramohan, D. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(3): 433-436.
- Riquelme, C., Avendaño, R. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76: 725-736.
- Safonova, E. Th., Dmitrieva, I. A., Kvitko, K. V. (1999). The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition. *Resources, Conservation and Recycling*. 27: 193-201.

- Sigeo, C. (2005). Freshwater microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. Manchester U.K. John Wiley & Sons Ltd.
- Sulbarán, S. (2005). Microalgas presentes en fosas de desechos petrolizados del estado Zulia. Tesis (Licenciatura en Biología). Maracaibo, Venezuela. Universidad del Zulia. Venezuela. 105 p.
- Tukaj, Z. (1987). The effects of crude and fuel oils on the growth, chlorophyll a content and dry matter production of a green alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. *Environmental Pollution*. 47: 9-24.
- Utting, S. (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture Engineering*. 4:175-190.
- Yépez, M., Morales, E. (1998). Efecto de la concentración de nitrato y cloruro de sodio sobre la densidad celular y contenido de pigmentos y proteínas de *Dunaliella viridis*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. 32(1): 1-12.
- Zhang, M., Kong, F., Xing, P., Tan, X. (2007). Effects of interspecific interactions between *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* on their growth and physiology. *International Review of Hydrobiology*. 92 (3),281-290.

Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de zábila (*Aloe vera* L.) *in vivo*

Andrea Sánchez
Ángela Matos Acurero*

RESUMEN

En plantas tratadas con colchicina 0,05% y 0,10% durante 48 horas se indujo un 58% y 53%, respectivamente, de células aneuploides y fenotípicamente se logró un incremento en la altura de la planta, longitud, ancho y espesor de las hojas y del volumen foliar comparado con las plantas controles y plantas de los tratamientos pertenecientes a 24 horas, tanto en plantas tratadas como en hijuelos de estas. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el uso de la colchicina como inductor de poliploidía en zábila es una herramienta valiosa para la obtención de plantas con mayor biomasa, lo que permite aumentar la materia prima para la exportación y elaboración de productos medicinales y cosméticos.

PALABRAS CLAVE: *Aloe vera* L., citogenética, morfología, aneuploidía.

*Laboratorio de Citogenética Vegetal, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apdo. 526, Maracaibo-Venezuela. Telefax: +58-261- 4127755. E-mail: amatos@fec.luz.edu.ve, civefeculuz@gmail.com

Recibido: 05/10/2012 Aceptado: 25/11/2012

Effects of the use of colchicine as an inducer of polyploidy in aloe plants

ABSTRACT

As the result we found 58% and 53% of aneuploid cells in plants treated with 0.05% and 0.10% colchicine for 48h. Treatment with colchicine for 48 hours has resulted the increase in plant height, length, width and thickness of leaves and leaf volume compared to controls and plants with during 24 hours, both treated plants and in shoots. Results obtained from this study demonstrate that the use of colchicine is a valuable tool for obtaining plants with increased biomass, allowing for increased raw materials for export and processing of medicinal and cosmetic products.

KEYWORDS: *Aloe vera* L., cytogenetics, morphology, aneuploidy.

Introducción

La zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.], es una planta de amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales, con enorme importancia económica y medicinal (Oliveira et al, 2007; Silveira et al, 2008). Posee múltiples aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Vega et al, 2005; Chen et al, 2007; Maenthaisong et al, 2007; Jia et al, 2008; Ndhlala et al, 2009). Es de gran importancia para Venezuela pues por su metabolismo ácido crasuláceo se adapta en las zonas áridas y semiáridas del país por lo que no presenta grandes exigencias y permite obtener productos de calidad que son cotizados a nivel internacional (Fuentes et al, 2007).

Sin embargo, la baja tasa de propagación de la planta y el crecimiento lento de ésta no permiten cubrir la demanda actual del mercado nacional e internacional. Asimismo, los productores

tradicionales deben esperar hasta 3 años para que la planta alcance la madurez y pueda ser vendida. Ello ha impulsado el desarrollo de alternativas para la obtención de mayores volúmenes de producción, a través de programas de selección y mejoramiento genético (Quintero et al., 2009).

En este sentido, la inducción de poliploidía es una alternativa utilizada para incrementar la producción de biomasa en *A. vera*, debido a la tendencia que presentan las plantas poliploides de mostrar un mayor crecimiento de sus partes vegetativas en comparación a sus progenitores diploides, por lo que se puede lograr el aprovechamiento de la mayor cantidad de biomasa producida en la parte vegetativa de interés de esta planta (Molero y Matos, 2008). De hecho, se ha observado que las plantas poliploides presentan mayor vigor y tejidos que pueden duplicar la biomasa de las plantas originales (Imery y Cequea, 2001).

La gran importancia económica que posee en la actualidad la explotación de *A. vera* en el mundo y en diversas regiones en Venezuela, ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas con la finalidad de obtener cultivares con mayores volúmenes de producción, siendo la inducción de poliploidía en *A. vera*, mediante el uso de colchicina, una opción relativamente rápida para lograr plantas que posean hojas con mayor biomasa, permitiendo altos márgenes de producción a los productores.

Basados en lo anterior, se llevó a cabo una caracterización morfológica, anatómica y citogenética de las plantas tratadas con colchicina a diferentes concentraciones (0,05% y 0,10%) y tiempos de exposición (24 y 48 horas) con el propósito de evaluar el uso potencial de la misma en la obtención de plantas poliploides con mayor volumen y grosor foliar, y por tanto, con mayor biomasa producida en la parte vegetativa de interés de esta planta, como son las hojas.

1. Métodos

Para esta investigación existió una planta parental adquirida en un vivero comercial del municipio Maracaibo (Venezuela). Todas las plantas sometidas a tratamiento (plantas tratadas) se obtuvieron a partir de esta planta parental; poseían 4 meses de edad aproximadamente con una altura entre 10 y 15 cm. El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Citogenética Vegetal (Civefecluz) y Biotecnología Vegetal (Bioveluz). Todas las plantas, tanto la planta parental, como las plantas tratadas y los hijuelos de estas, fueron mantenidas en los alrededores del Departamento de Biología, Bloque A1 de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela; caracterizado por ser una zona de bosque muy seco con temperatura media anual promedio de 30°C, humedad relativa del 79% y precipitación media anual de 500 mm/año (Ewel y Madrid, 1976).

Para determinar el efecto de la concentración y tiempo de exposición a la colchicina se siguió la metodología empleada por Imery y Cequea (2001). Cuando las raíces de las plantas alcanzaron una longitud de 1,5 a 2 cm, se sumergieron los rizomas de *A. vera* en solución acuosa de colchicina a concentraciones de 0,05% y 0,10% p/v y a dos tiempos de exposición, 24 y 48 horas (Tabla 1). Los tratamientos se llevaron a cabo en una cámara oscura. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, incluyendo plantas controles (sumergidas en agua destilada) para un total de 60 plantas. Las plantas tratadas se sembraron en bolsas de polietileno de 1 kg con tierra desinfectada con abono orgánico.

1.1. Estudio citogenético

El procesamiento del tejido radical para el estudio citogenético se realizó según lo descrito por Matos y Molina (1997). Para este estudio se seleccionaron hijuelos de las plantas tratadas, los cuales fueron separados y llevados al laboratorio. Se estudiaron tres raíces

por planta, empleando el método de aplastamiento de los tejidos o “squash” para la preparación de las láminas microscópicas. Se evaluó una sola generación de hijuelos y se determinó el número de cromosomas, la descripción de la morfología de éstos se realizó basándose en la metodología establecida por Levan et al (1964).

1.2. Estudio morfológico

El estudio morfológico se llevó a cabo pasados los cinco meses después de los tratamientos con colchicina, tanto en las plantas tratadas como en los hijuelos de estas, siguiendo la metodología empleada por Imery (2006) considerándose características como: altura de la planta (AP), número de hojas (NH), longitud foliar (LH), ancho (AH) y espesor foliar (EH), volumen foliar, empleando la fórmula $V = \pi \cdot LH \cdot AH \cdot EH / 12$.

1.3. Estudio histológico

Se realizaron cortes transversales de hojas de hijuelos provenientes de las plantas tratadas con las diferentes concentraciones, que fueron seleccionadas previamente basándose en los valores obtenidos de las características morfológicas. Se montaron muestras *in vivo* y se tiñeron con Azul de metileno y Sudán III y otra porción de las muestras se procesó siguiendo la metodología empleada por Roth (1964) con modificaciones en las concentraciones de alcohol etílico utilizadas para la deshidratación de los tejidos (50%, 60%, 70%, 85%, 96% y 100%, 2 cambios), seleccionándose la zona de la hoja cercana a los 10 cm de longitud, medidos desde la base, para realizar el corte de las mismas. Los cortes (de 2 micras de grosor) de los bloques de parafina con el tejido incluido, se realizaron en micrótopo, se tiñeron con safranina y hematoxilina y los portaobjetos se sellaron con una gota de Martex y un cubreobjetos del tamaño del tejido.

1.4. Análisis estadístico

Para los datos provenientes del estudio morfológico se evaluaron diferencias entre tratamientos mediante una comparación de variable en conjunto con un análisis de variables (ANOVA). Las diferencias entre medias se verificaron a través de la comparación pareada de muestras independientes con $p \leq 0,05$, utilizando el programa estadístico SPSS, versión 17.0.

Los datos del estudio citogenético se ilustraron mediante el uso gráficas de barras, resaltando los porcentajes de las células obtenidas con una comparación de proporciones para resaltar las diferencias significativas entre los tratamientos, con un 95% de confiabilidad.

Para el cálculo del número, estadísticamente representativo, de células metafásicas a estudiar, se empleó la fórmula: $n = Z^2_{\alpha/2} \times S^2 / e^2$, de Snedecor y Cochram (1984), donde $Z^2_{\alpha/2}$ tiene un valor de 1,96 según la estadística tabulada de la normal estándar y S^2 , que significa la varianza muestral, la cual es de 13,66. El error del muestreo (e^2) será de 0,05. En base a esta fórmula se estudiaron 50 células/raíz microscópico a 100X, lo cual expresó el valor mínimo de células que se deben analizar para obtener resultados confiables.

2. Resultados

2.1. Estudio morfológico

En el estudio de las características morfológicas en plantas de *A. vera* bajo condiciones *in vivo* se encontró que los tratamientos con colchicina por 48 horas causaron efectos diferenciales con respecto a los tratamientos pertenecientes a 24 horas y a los controles.

En cuanto a las características foliares, el tratamiento con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto fue T6 (0,10%, 48 h), con valores de: 33,05 cm (AP), 33,67 cm (LH), 3,18 cm (AH)

Tratamientos	Concentraciones de colchicina	Tiempo de exposición (horas)
1	Control	24
2	0,05%	24
3	0,10%	24
4	Control	48
5	0,05%	48
6	0,10%	48

TABLA 1. Tratamientos de Aloe vera con colchicina durante dos tiempos de inmersión y bajo diferentes concentraciones.

y 1,46 cm (EH), siendo similar para hijuelos, obteniéndose 25,93 cm (LH), 1,69 cm (AH), excepto en EH donde el valor más alto fue 1,2 cm (T2). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los hijuelos con valores de: 27,33 cm (AP), 6,1 hojas (NH), 25,93 cm (LH) (Figuras 1, 2 y 3).

El volumen foliar es una de las características de mayor importancia en términos de producción; las plantas que presentaron los más altos valores fueron aquellas pertenecientes a T6 tanto en el caso de las plantas tratadas como de hijuelos, con un promedio de 42,47 cm³ y 12,17cm³ respectivamente, lo cual resultó en diferencias significativas ($p = 0,05\%$) al comparar con otros tratamientos como se muestra en la Figura 4.

2.2. Estudio citogenético

Como era de esperarse, los tratamientos T1 y T4 (controles), presentaron los porcentajes más altos de células diploides en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 5). En este sentido, entre las plantas tratadas con colchicina se encontró un alto

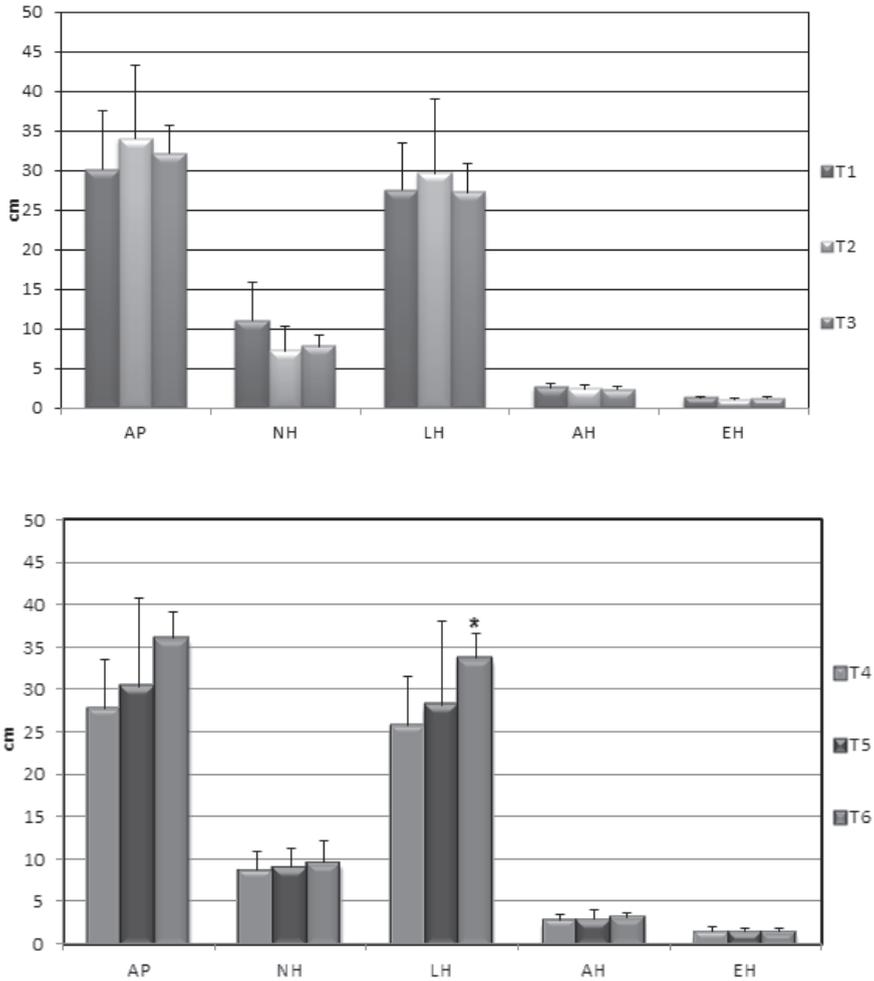


FIGURA 1. Plantas de *Aloe vera L.* tratadas con colchicina (0,05% y 0,10%). A) 24 horas y B) 48 horas. T1 (Control), T2 (0,05%), T3 (0,10%), 24 horas. T4 (Control), T5 (0,05%) y T6 (0,10%). Altura de la planta (AP), Número de hojas (NH), longitud foliar (LH), ancho y espesor de la hoja (AH y EH). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar.

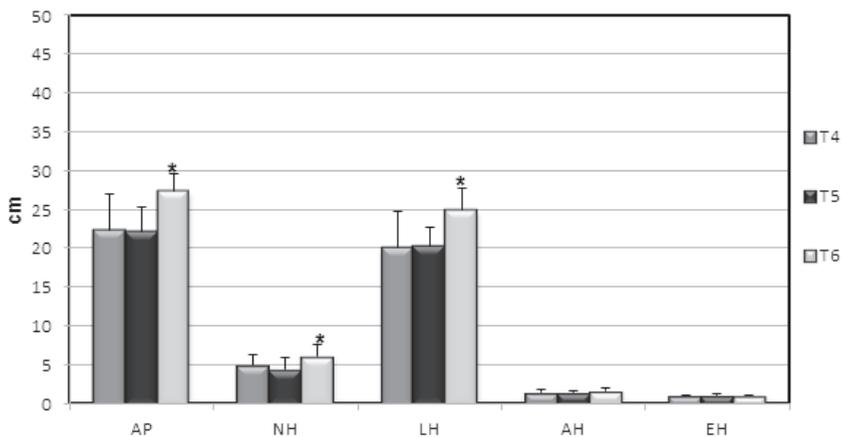
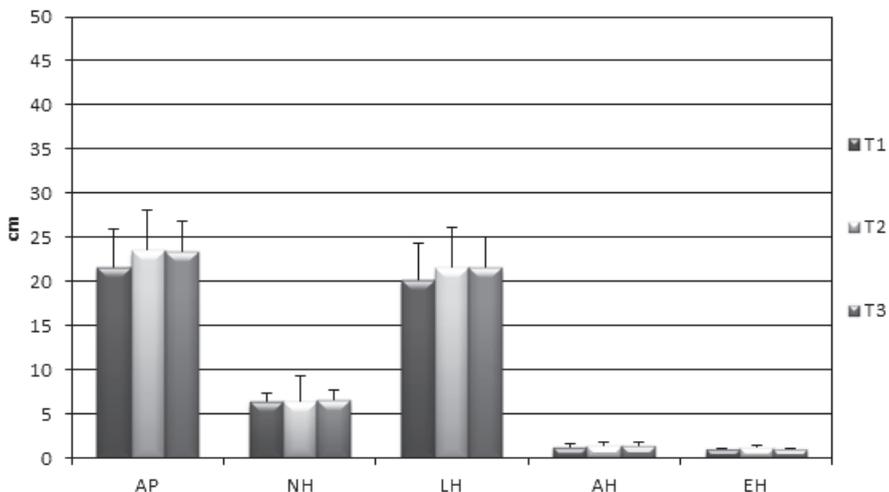


FIGURA 2. Hijuelos de plantas de *Aloe vera* L. tratadas con colchicina (0,05% y 0,10%). A) 24 horas y B) 48 horas. T1 (Control), T2 (0,05%), T3 (0,10%), T4 (Control), T5 (0,05%) y T6 (0,10%). Altura de la planta (AP), Número de hojas (NH), longitud foliar (LH), ancho y espesor de la hoja (AH y EH). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar.



FIGURA 3. Plantas sometidas a diferentes tratamientos de colchicina y tiempos de exposición. A) Control, B) 0,05% de colchicina y C) 0,10% de colchicina y 24 horas de exposición, D) Control, E) 0,05% de colchicina y F) 0,10% de colchicina y 48 horas de exposición.

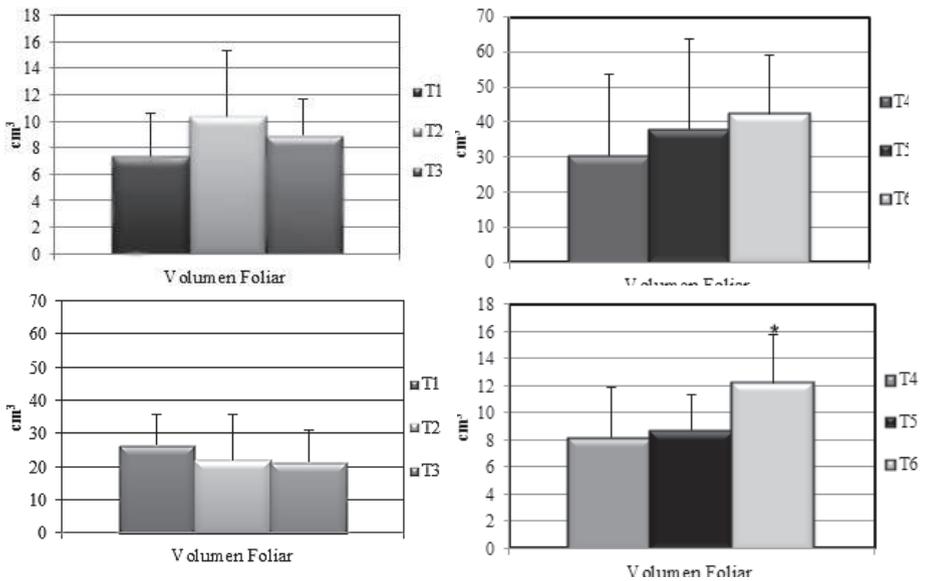


FIGURA 4. Volumen foliar de plantas de Aloe vera L. (tratadas –A y B- e hijuelos –C y D-). Control (T1 y T4), tratamientos de 0,05% (T2 y T5) y 0,10% de colchicina (T3 y T6) 24 horas (A-C) y 48 horas (B-D). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar.

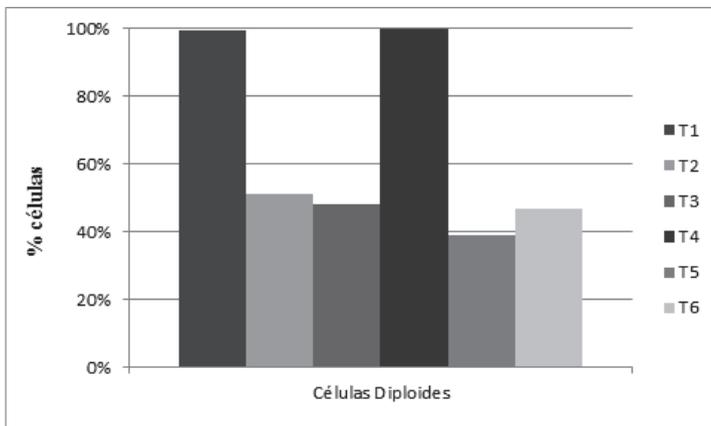


FIGURA 5. Porcentaje de células diploides en hijuelos de plantas tratadas de Aloe vera. Control (T1 y T4), 0,05% (T2 y T5) y 0,10% de colchicina (T3 y T6). T1-T3, 24 horas y T4-T6, 48 horas de exposición

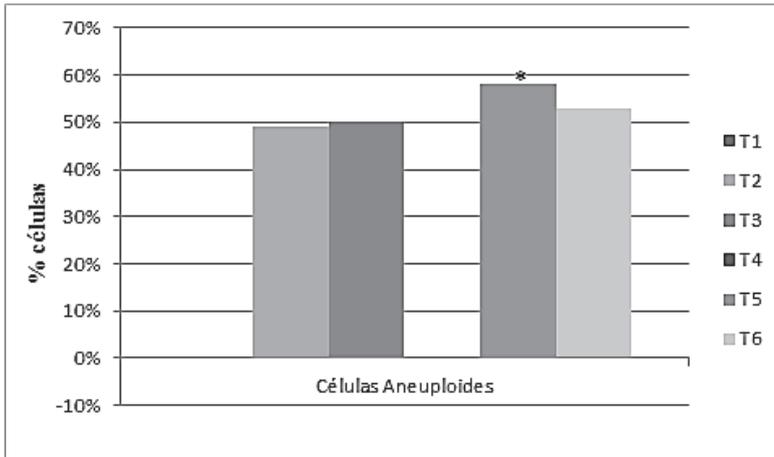


FIGURA 6. Porcentaje de células aneuploides en hijuelos de plantas tratadas de *Aloe vera*. Control (T1 y T4), 0,05% (T2 y T5) y 0,10% de colchicina (T3 y T6). T1-T3, 24 horas y T4-T6, 48 horas de exposición. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios.

porcentaje de células con un cariotipo estándar de $n = 7 \pm 1$, es decir, aneuploides, en ningún momento se observaron células triploides o tetraploides, por lo cual, no pueden considerarse poliploides.

Los más altos porcentajes se observaron en T5 (0,05%, 48 h) y T6 (0,10%, 48 h) con 58% y 53% respectivamente. T5 presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros tratamientos (Figura 6).

2.3. Estudio anatómico

Los estudios anatómicos realizados a los hijuelos provenientes de las plantas tratadas mostraron una epidermis uniestratificada; recubierta por una cutícula gruesa, haz vascular colateral, células secretoras grandes en las hojas de T6 formando casquete sobre el floema rodeados por una vaina parenquimática, parénquima

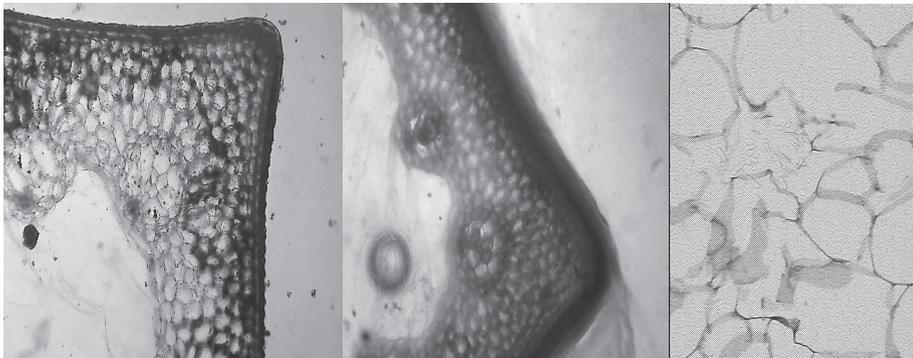


FIGURA 7.- Cutícula y epidermis de hojas de hijuelos de plantas de *Aloe vera* L. de tratamientos 0,10% de colchicina, 48 horas (a) 0,05% de colchicina, 48 horas y (b) 0,05% de colchicina, 24horas (c) rafidios, 0,10% de colchicina, 48h. h.v: Haz vascular, cu: cutícula, raf: rafidios. Magnificación de 1000X.

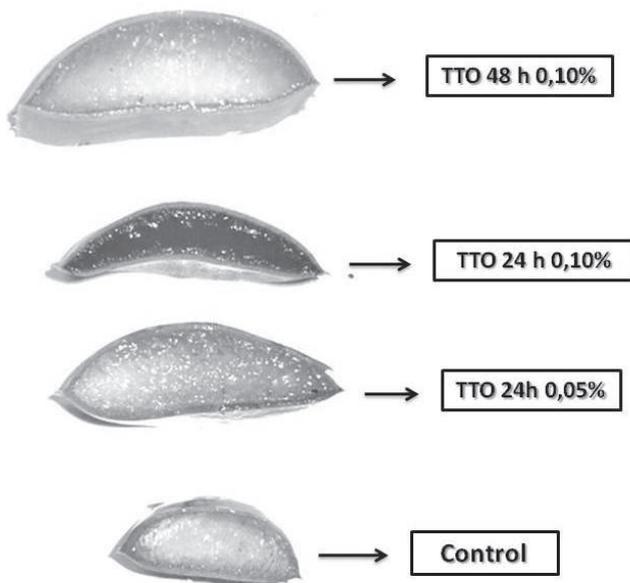


FIGURA 8. Cortes transversales en hojas de hijuelos de *Aloe vera* L. provenientes de las plantas tratadas con las diferentes concentraciones de colchicina (0,05% y 0,10%) a tiempos de exposición de 24 y 48 horas

clorofiliano homogéneo, con abundantes cloroplastos, con rafidios de oxalato de calcio en cantidades elevadas para las plantas de los tratamientos 0,10% y 0,05% 48 horas. Estomas sin elevaciones o invaginaciones de la epidermis (Figura 7).

Las hojas de las plantas pertenecientes al T6 presentaron mayor grosor, con un valor promedio de 8mm para el máximo y de 2mm para el menor grosor. El resto de los valores se encontraron entre 3 y 4 mm para los tratamientos de 24 horas (T2 para el primero y T3 para el segundo) y de 4 a 7mm para los de 48 horas (T4 el primero y T5 el segundo valor) (Figura 8).

3. Discusión

3.1. Estudio morfológico

Los valores obtenidos en este estudio demuestran que una mayor concentración de colchicina y un período más largo permitieron cambios a nivel morfológico en la planta. Aunque todos los tratamientos arrojaron diferencias a nivel morfológico, los más resaltantes se observaron en el T6 (48 h y 0,10%), tanto para la longitud, el ancho, espesor foliar, así como el volumen foliar. Esto podría estar relacionado a una variación a nivel de tejidos, aumentando el diámetro de las células que los componen. Muchos autores reportan las características de giga como un resultado de la autoploidía en plantas (Escandón et al, 2007) donde explica cómo se manifiestan los tetraploides con diferencias significativas en relación al control, sobre todo en relación al área foliar y el tamaño de las flores en el caso de *Mecardonia tenella*.

Aunque las plantas de *Aloe vera* normalmente presentan un crecimiento lento, el desarrollo de las mismas fue totalmente distinto al comportamiento normal de una silvestre, pues los hijuelos alcanzaron alturas cercanas a las de las plantas tratadas, llegando a tener el tamaño de una planta con 3 años de edad en

un menor tiempo (aproximadamente 12 meses después de haber sido tratadas con colchicina) y expuestas a condiciones ambientales con temperaturas entre 35 y 42°C, según datos climatológicos aportados por la Base Aérea Nacional de Venezuela (citados por Querales, 2009). Es posible que las plantas tratadas en el presente trabajo, desarrollaran cierta resistencia a condiciones extremas de temperatura, tal como lo describe Baltzer (2005). En este sentido, estas plantas podrían haber desarrollado la capacidad de adaptarse a condiciones adversas y aún así incrementar los valores de las características foliares como longitud, ancho, espesor y volumen, siendo éstas las deseables para su venta y distribución.

3.2. Estudios citogenéticos

Los resultados citogenéticos del presente trabajo pueden explicarse de acuerdo a lo indicado por Imery y Cequea (2001); según estos autores, con un mayor tiempo de exposición a la colchicina las plantas alcanzan un mayor nivel de ploidía que se transmite de forma vegetativa, a diferencia de los tratamientos con tiempos de exposición cortos donde la probabilidad del efecto directo de la colchicina sobre las células meristemáticas se reduce debido a la poca acción en las capas superficiales y contacto con las células de la interfase en la que la colchicina no ejerce ninguna actividad antimitotática.

Con los tratamientos ensayados en este trabajo no se logró la obtención de individuos triploides o tetraploides puesto que aunque se observaron células con número cromosómico mayor al normal ($n=14$), estas no alcanzaron dichas categorías; por lo cual, no pudieron ser clasificadas como poliploides.

Las células diploides encontradas en los tratamientos coincidieron con las características descritas por Kumari y Roy (2010) mostrando que las plantas silvestres de esta especie poseen un número cromosómico $n=7$, con 8 cromosomas largos y 6 cortos,

predominando los centrómeros subterminales y submedios. La presencia de este tipo de células en gran número en plantas control era de esperarse pues éstas no estuvieron sometidas a ninguno de los tratamientos con colchicina.

La presencia de 7 Lst (Lst=cromosoma largo subtelocéntrico, por sus siglas en inglés, Levan et al, 1964) y 7 Ssm (cromosoma corto submetacéntrico) en el tratamiento de 0,05% de colchicina a 24 horas de exposición (T2) coincide con lo explicado por Imery (2006) acerca de los desbalances genéticos ocasionados por la pérdida o adición de cromosomas, lo cual puede ser usado como indicador, ya que permitiría la detección de cambios en cromosomas largos o cortos. Según este autor, las plantas que presentan disminución de un cromosoma largo (L) y presencia de uno corto (S) extra, poseen lo que se conoce como aneuploidía positiva, que promueve la expresión de características a nivel morfológico como ligeros aumentos en las dimensiones foliares de las plantas, pero sin tener ningún efecto visible en el incremento de la acumulación de biomasa; tal como se observó en el grupo perteneciente a este tratamiento (T2). De esta manera se puede decir que este comportamiento de las plantas en cuanto a la duplicación del cromosoma, ya sea largo (L) o corto (S), es una consecuencia de anomalías durante la mitosis y que este fenómeno es de alta importancia para la evolución de las plantas (Otto y Whitton, 2000; Liu y Adams, 2007).

En este estudio, el uso de las concentraciones de colchicina indujo la formación de células con aneuploidía. Esto podría derivarse de varias causas metabólicas y antropogénicas operando por separado o en conjunto, tales como el estado nutricional del suelo, riego por agua contaminada, patogénesis de las plantas y factores ambientales como pH y temperatura (Sharma, 1990).

Los casos de aneuploidía resaltan del resto debido a que el cariotipo de estas plantas es bastante estable. Vidali et al (2009) sugirió que hasta el cambio más mínimo o moderado en las condiciones ambientales pueden tener un efecto grande sobre la estabilidad genética de las plantas y por ende en su morfología.

3.3. Estudios anatómicos

El diámetro de los cortes demuestra que la exposición de las células meristemáticas al agente antimitótico (colchicina), indujo un incremento en el tamaño de las células del parénquima acuífero, siendo en este caso el tiempo lo que influyó en el cambio a nivel de tejido y no la concentración utilizada. Aun cuando la epidermis es uniestrada, la cutícula que la recubre es gruesa, típico de plantas de ambientes xerofíticos.

Algunas especies de *Aloe* son conocidas como calciotrofas debido a los altos niveles de Ca^{+2} , por lo cual existen una serie de teorías sobre la producción y número de cristales de oxalato en estas plantas (Fuentes et al, 2007). Esto podría explicar la gran cantidad de rafidios presentes dentro de las hojas de zábila estudiadas, ya que muchas de las plantas superiores producen cristales de oxalato de calcio. Arnott y Webb (2000) observaron que los rafidios se forman dentro de las vacuolas de células especializadas, aumentando el tamaño de éstas, lo cual concuerda con lo encontrado por Imery (2006) quienes mencionan que las plantas en las cuales se experimenta un incremento de ploidía tienden a sufrir un aumento de las dimensiones celulares y alteraciones en la expresión de los rasgos morfológicos.

Asimismo, estos cristales son de gran importancia para estas plantas ya que son los encargados de absorber el exceso de calcio, además de servir como mecanismo de defensa contra herbívoros y permitir mayor rigidez y protección a la planta de las condiciones climáticas presentes (Arnott y Webb, 2000).

Conclusiones

El uso de la colchicina a concentraciones de 0,05% y 0,10% aplicada durante 48 horas permite inducir cambios a nivel morfológico, citogenético y anatómico, observándose una mayor cantidad de células aneuploides y variaciones a nivel de tejidos más acentuados para estos tratamientos (T5 y T6) en relación al resto, tanto para el caso de plantas tratadas como para el de hijuelos.

Los resultados de este estudio demuestran que el uso de la colchicina es una herramienta valiosa para la obtención de plantas con mayor biomasa, lo que permite aumentar la materia prima para la exportación y elaboración de productos medicinales y cosméticos.

Referencias

- Arnott, H; Webb, M. (2000). Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): Implications for crystal stability and function. *Int. J. Plant Sci.* 161(1):133–142.
- Baltzer, J. (2005). Leaf optical responses to light and soil nutrient availability in temperate deciduous trees. *American Journal of Botany* 92 (2): 214-223.
- Chen, S., Lin, K., Chang, C., Fang, C. (2007). Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 45 (11): 2296-2303.
- Escandón, A; Alderete, L; Hagiwara, J. (2007). *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. *Scientia Horticulturae* 115: 56–61
- Ewel, J., A. Madrid. (1976). *Zonas de vida en Venezuela. Memorias explicativas sobre el mapa ecológico*. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), Caracas, 264 pp.

- Fuentes R., J. González, J. Vílchez, C. Colmenares, B. Bracho. (2007). *Efecto del ácido indolbutírico y el tipo de sustrato en el enraizamiento ex vitro de zábila (Aloe vera L.)*. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Departamento de Estadística. Cátedra de Investigación Agropecuaria. Maracaibo, Venezuela, 36pp.
- Imery, J., H. Cequea (2001). Colchicine-induce autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66: 409-413.
- Imery, J. (2006). Caracterización genética de parentales e híbridos de diploides (VS) y triploides (VVS) entre *Aloe vera* (L.) Burm. f. (2V, 4V) y *Aloe saponaria* Haw. (2S) (Aloaceae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Postgrado de Botánica, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 147 pp.
- Jia, Y., G. Zhao, J. Jia (2008). Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* 20 (2):181-189.
- Kumari, G., Roy, B.K. (2010). Karyotype studies in dominant species of *Aloe* from eastern India. *Caryologia* 63(1): 41-49.
- Levan, A., K. Fredga, A. Sandberg (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 206–218.
- Liu Z., Adams K.L. (2007). Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. *Current Biology* 17: 1669-1674.
- Maenthaisong, R., N. Chaiyakunapruk, S. Niruntraporn, C. Kongkaew (2007). The efficacy of *Aloe vera* used for burn wound healing: A systematic review. *Burns* 33 (6): 713-718.

- Matos, A., Molina, J. (1997). Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. *Rev. Fac. Agron. LUZ.* 14: 173-182.
- Molero, T., Matos, A. (2008). Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de *Aloe vera* (L.). *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 42 (1): 111–133.
- Ndhlala, A., S. Amoo, G. Stafford, J. Finnie, J. Van Staden (2009). Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe (*Aloe barberae*). *Journal of Ethnopharmacology* 124 (3):404-408.
- Oliveira, F.Q., B. Gobira, C. Guimarães, J. Batista, M. Barreto, M. Souza (2007). Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17: 466-476.
- Otto, S.P., Whitton, J. (2000). Polyploidy: incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Querales, Y. (2009). Variación temporal de la producción y descomposición de hojarasca de *Rhizophora mangle* presente en el manglar de punta Capitán Chico, estado Zulia. Trabajo de grado. Universidad del Zulia. 83pp.
- Quintero, M., R. Behar, C. García, D. Pupo, M. Hernández, J. Díaz, F. Pérez (2009). *Aloe* gel viscoso® en el tratamiento de pacientes con úlcera duodenal y *Helicobacter pylori* positivo. *Rev. Cubana Plant. Med.* 14 (4):1-6.
- Roth, I. (1964). *Microtecnia vegetal*. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 87pp.
- Silveira P., M. Bandeira, P. Arrais (2008). Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18: 618-626.

Snedecor, G., Cochran, W. (1984). *Métodos estadísticos* (10 ed.). Editorial continental S.A.

Vega, A., C. Ampuero, L. Díaz, R. Lemus (2005). Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, El *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Rev. Chil. Nutr.* 32: 1-14.

Vidali L., Augustine R.C., Fay S.N., Franco P., Pattavina K.A., Bezanilla M. (2009). Rapid screening for temperature sensitive alleles in plants. *Plant Physiol.* 151:506-514

Coexistencia de anemia, depleción de las reservas de hierro y deficiencia de vitamina A en niños con síndrome de Down

*Jorymar Leal*¹
Pablo Ortega
Carlos Chávez
Tania Romero
Carolina Escalona
Yanneris Medina

RESUMEN

Con el objeto de determinar la prevalencia de anemia, Depleción de las Reservas de hierro (DRFe) y Deficiencia de Vitamina A (DVA) en niños con Síndrome de Down (SD), se realizó un estudio transversal, descriptivo en 87 individuos normales ($10,3 \pm 3,9$ años) y 77 con SD ($9,1 \pm 4,2$ años). Se consideró anemia: hemoglobina $< 110\text{g/L}$ < 5 años, $< 115\text{g/L}$ 5-11 años y $< 120\text{g/L}$ 12-14 años; DRFe=ferritina $< 15\mu\text{g/L}$; riesgo de DRFe (RDRFe)= $15-20\mu\text{g/L}$ y DVA=retinol sérico $< 20\mu\text{g/dL}$; Riesgo de DVA (RDVA)= $20-30\mu\text{g/dL}$. Los datos fueron analizados con SAS, $p < 0,05$. En niños con SD la prevalencia de afectación del hierro (22,08%) y vitamina A (33, 36%) fue superior que en niños CN (14,94% y 31,03% respectivamente), $p < 0,01$. El 75% de los

¹ Laboratorio de Investigación en Malnutrición Infantil del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.
E-mail: jyleal@hotmail.com

niños con SD anémicos con reservas de hierro normal mostraron afectación del estado de la vitamina A (DVA+RDVA). Los niños con SD con DVA+RDVA mostraron 6,40 veces mayor probabilidad de presentar anemia que los niños CN (OR=6,40; LC=95%; IC: 1,03-50,45).

PALABRAS CLAVE: anemia, deficiencia de vitamina A, síndrome de Down

Co-existence of anemia, depleted reserves of iron and vitamin a deficiency in children with Down syndrome

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the prevalence of anemia, Depleted Reserves of Iron (RID) and Vitamin A Deficiency (VAD) in children with Down Syndrome (DS). We conducted a cross-sectional, descriptive study. We analyzed 87 normal children (10.3 ± 3.9 years) and 77 with SD (9.1 ± 4.2 years). Was considered anemia: hemoglobin <110g/L <5 years, <115g/L 5-11years and <120g/L 12-14years; RID=ferritin <15 μ g/L; risk of RID=15-20 μ g/L and VAD= serum retinol <20 μ g/dL, risk of VAD (RVAD) =20-30 μ g/dL. Data were analyzed with SAS, $p < 0.05$. In children with DS the prevalence of iron (22.08%) and nutritional status of vitamin A (33,36%) was significantly higher than normal children (14.94% and 31, 03% respectively), $p < 0.01$. The 75% of children with DS anemic with normal iron reserves showed alteration of the nutritional vitamin A status. Children with DS and RVAD+VAD showed a risk 6.40 times more likely to have anemia than normal children (OR=6.40, LC=95% CI: 1.03-50.45).

KEYWORDS: anemia, vitamin A deficiency, Down syndrome.

Introducción

El hambre, la desnutrición y la deficiencia de micronutrientes son problemas serios de salud pública en los países en desarrollo por el impacto que ocasionan sobre la salud y el bienestar de la población

(CDC, 2008). Las deficiencias de micronutrientes conocidas como “Hambre Oculta” representan la forma de malnutrición más generalizada en el mundo. Las más frecuentes son las deficiencias de hierro, yodo y vitamina A, que afectan principalmente a niños y mujeres. Se estima que más de dos mil millones de personas en el mundo sufren distintas carencias (CNA, 2002).

La anemia es un problema de salud pública de proporciones endémicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que la prevalencia de anemia a nivel mundial es de 47% en preescolares, 42% en mujeres embarazadas y 30% en mujeres en edad fértil no embarazadas (WHO, UNICEF, ONU, 2001). En América Latina, 29% de los niños en edad preescolar, 24% de las mujeres embarazadas y 18% de las mujeres no embarazadas sufren de anemia (Gueri, 1993). En Venezuela, la prevalencia de anemia es variable, ésta oscila entre 14,92% y 78% (García-Casal, 2005; Solano et al., 2005; Landaeta-Jiménez, 2000; Gueri, 1993). Castejón y col. en el año 2004, han reportado en niños pre-escolares de Maracaibo una prevalencia de 38,11%.

La Deficiencia de hierro (DFe) y la Anemia por Deficiencia de Hierro (ADFe) son problemas de salud pública a nivel mundial que afectan principalmente a las mujeres gestantes y a los niños de escasa condición socioeconómica procedentes de los países en desarrollo (Black, 2012). La DFe es un desorden nutricional de alta prevalencia y la causa más común de anemia en todo el mundo. La OMS estima que 1.300 millones de personas están anémicas, de las cuales de 500 a 600 millones tienen DFe (WHO, UNICEF, ONU, 2001). En Venezuela, la prevalencia de deficiencia de hierro en preescolares, escolares y adolescentes varía entre 9% y 34,66% (García-Casal, 2005; Solano et al., 2005; Landaeta-Jiménez, 2000; Gueri, 1993).

Existen diversas causas de DFe, entre estas se encuentran una ingesta insuficiente, absorción inadecuada, o incremento en los requerimientos ocasionados por el crecimiento, el embarazo y la

lactancia (Boccio et al., 2003). Diferentes estudios indican que cuando el aporte de hierro es insuficiente para cubrir los requerimientos se producen etapas progresivas de severidad de la deficiencia de hierro, hasta llegar a su forma más severa la anemia microcítica hipocrómica (Forrelat-Barrios et al, 2000). El hierro es un elemento esencial en el metabolismo de la mayoría de los organismos vivos, necesario para la formación de la mielina, el metabolismo de las neuronas y la síntesis de neurotransmisores, por lo que afecta el crecimiento en la infancia, el desarrollo motor y la coordinación, el lenguaje y los logros educativos en los niños escolares (Black, 2012; Mahajan et al., 2011; Lozoff et al., 2006; Lozoff et al., 2001).

Tomando en consideración que la vitamina A es un micronutriente esencial requerido para mantener un nivel normal de hierro, aunque no se conoce de manera clara su papel específico, se cree que un déficit de ésta puede asociarse a la presencia de anemia aún con niveles de hierro normales. La interacción entre la ADFe y la Deficiencia de Vitamina A (DVA) ha sido estudiada en humanos y en animales, mostrándose que la baja ingesta de vitamina A en la dieta puede provocar anemia, debido a la participación de la vitamina A en la modulación del metabolismo del hierro y de la eritropoyesis (Semba y Bloem, 2002).

La DVA, afecta a 140 millones de niños y niñas en edad preescolar y más de 7 millones de mujeres embarazadas en 118 países del mundo (WHO, 2005). En Latinoamérica y el Caribe no es frecuente la DVA clínica (Mora et al, 1998). Sin embargo, la deficiencia subclínica de vitamina A se estima que afecta de 5 a 10 millones de niños y se ha asociado con el incremento en el riesgo de diarrea severa, infecciones respiratorias y de la mortalidad infantil por estas causas (Stephensen, 2001; Semba, 1999). En Venezuela, la prevalencia de DVA es variable, se han reportado cifras que van desde 0,5% hasta 60%, dependiendo de la condición socioeconómica, el grupo étnico, la región geográfica y el método de detección de la vitamina A (Castejón et al., 2004; Amaya-Castellano et al., 2002; Castejón et

al., 2001; Solano et al., 1998; Jaffe y Entrena, 1993). En el estado Zulia, la prevalencia de DVA subclínica se ubica entre 21,78% y 35,46% en niños de condición socioeconómica marginal (Castejón et al., 2004; Amaya-Castellano et al., 2002; Castejón et al., 2001).

Es evidente que las anemias nutricionales, por deficiencia de hierro y DVA, son problemas comunes en países en desarrollo, que coexisten a menudo; sin embargo, no existen estudios de determinen su coexistencia en niños con Síndrome de Down (SD), a pesar de que esta alteración cromosómica es la causa más común de deficiencia mental de origen genético en la población mundial (Montoya et al., 2008). Teniendo en consideración los antecedentes señalados, el objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de anemia, Depleción de las Reservas de hierro (DRFe) y DVA en niños con SD de Maracaibo-Venezuela.

1. Material y métodos

Se realizó un estudio transversal, descriptivo en una muestra probabilística de 169 niños entre 2 y 16 años, de ambos géneros, constituidos por 88 niños citogenéticamente normales (CN) y 81 niños con SD, seleccionados al azar en sus respectivas Unidades de Educación Primaria y Secundaria localizadas en Maracaibo – Venezuela durante el segundo semestre del año 2006 y primero del 2007. El presente estudio recibió la aprobación del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, CONDES-LUZ (Nº CC-0802-06), la Coordinación Regional de las Escuelas Bolivarianas de la Dirección Regional de Educación y la Junta Directiva de las respectivas Unidades Educativas. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres y/o representantes legales. Ambos grupos se encontraron ubicados en los estratos socio-económicos IV y V según la escala de Graffar modificada para Venezuela por Méndez Castellano y Méndez (Méndez-Castellano et al., 1994).

El criterio principal de inclusión estuvo constituido por individuos CN (46 XX o XY) e individuos con SD (47 XX o XY+21) según el análisis del cariotipo de los participantes en el estudio el cual fue realizado por especialista técnico en citogenética del Laboratorio de Citogenética de la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia.

La evaluación clínica fue realizada por personal médico capacitado, considerándose como criterios de exclusión: individuos con al menos un episodio de temperatura axilar $>37^{\circ}\text{C}$ durante los últimos 15 días, tres o más evacuaciones líquidas en menos de 24 horas y procesos infecciosos activos. Además, se realizó examen oftalmológico para detectar signos clínicos de DVA (xerosis conjuntival o corneal, manchas de Bitot, ulceración corneal) o conjuntivitis (Sommer y Davidson, 2002).

La extracción de sangre se realizó bajo un adecuado control de calidad para obtener resultados precisos y confiables. Todas las pruebas fueron realizadas en ayunas y según las condiciones requeridas. Se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa periférica teniendo en cuenta que hubiesen transcurrido por lo menos ocho horas de ayuno. La sangre fue recolectada en 3 tubos; el primer tubo sin anticoagulante, fue sometido a centrifugación (3000 rpm x 10 min) para la obtención de suero, separado en tubos ependorf para la determinación de ferritina sérica y proteína C reactiva. Un segundo tubo con EDTA fue utilizado para realizar la cuantificación de hemoglobina e indicadores hematimétricos y un tercer tubo con heparina fue utilizado para procesar el cariotipo de los participantes del estudio. Las muestras fueron protegidas de la luz durante el procedimiento de extracción y procesamiento.

La proteína C reactiva fue analizada mediante la prueba semicuantitativa de aglutinación en placa (*Wiener Laboratorios S.A.I.C. Rosario–Argentina*). Fueron excluidos los individuos con proteína C reactiva positiva.

Las concentraciones de hemoglobina fueron determinadas con un contador hematológico automatizado Sysmex K-800. Para definir anemia se utilizó como puntos de corte los valores de hemoglobina inferiores a 110 g/L en menores de 5 años, 115 g/L entre 5 -11 años y 120 g/L entre 12-14 años según los criterios de la OMS. Valores de volumen corpuscular medio (VCM) menores a 80 fl fueron considerados como microcitosis y VCM mayor a 94 fl como macrocitosis. Con respecto a la Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) valores menores a 27 pg definieron hipocromía y HCM >32 pg definió hiperchromía (Nestel y Davidsson, 2004; Layrisse 1999).

La ferritina sérica fue cuantificada mediante el método de quimioluminiscencia. Se definieron Depleción de las reservas de hierro (DRFe) valores de ferritina <15 $\mu\text{g/L}$; Riesgo de depleción de las reservas de hierro (RDRFe) ferritina entre 15 y 20 $\mu\text{g/L}$ y Reservas de hierro normal (RFe normal) ferritina >20 $\mu\text{g/L}$, según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (Nestel y Davidsson, 2004).

El retinol sérico fue determinado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) según el método de Bieri y col. (Bieri et al., 1979), utilizando un equipo marca WATERS modelo 2695, USA, con columna de fase reversa (3,9 mm \times 150 mm), Novapak C18, de 60Å y 4 μm y un detector de absorbancia dual de rango UV, WATERS, modelo 2487, EE.UU.). Los valores obtenidos fueron expresados en $\mu\text{g/dL}$. De acuerdo al Grupo Consultivo Internacional de vitamina A (IVACG), se considera que existe DVA cuando las concentraciones séricas de retinol son < 20 $\mu\text{g/dL}$; valores entre 20 y 30 $\mu\text{g/dL}$ indican riesgo de deficiencia de vitamina A (RDVA); y valores 30 $\mu\text{g/dL}$ son considerados normales (De Pee y Dary, 2002). El procesamiento de los datos se realizó con el programa de sistema de Análisis Estadístico SAS/STAT, Versión 8.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA 2000). Los valores obtenidos fueron expresados como Media \pm Desviación Estándar ($X \pm DE$) y porcentajes. Para estimar las diferencias entre los valores promedio de las variables analizadas

de los individuos citogenéticamente normales y con SD, se utilizó la prueba t de Student y Análisis de la Varianza (ANOVA). Para el análisis de riesgo, se calculó odds ratio (OR) considerando como índice de confiabilidad estadística con una $p < 0,05$.

Resultados

En el presente estudio se evaluaron 169 individuos de ambos géneros (Femeninos=88 y Masculinos=81) y edades comprendidas entre 2 y 16 años. Fueron excluidos 5 casos: 3 con proteína C reactiva positiva y 2 niños en quienes no se obtuvo resultado del procesamiento de la ferritina. Se analizaron 87 individuos (46 XX o XY) CN ($10,3 \pm 3,9$ años) y 77 pacientes (47 XX o XY + 21) con SD ($9,1 \pm 4,2$ años). No se observaron síntomas o signos clínicos sugestivos de DVA o cuadros infecciosos activos en ambos grupos estudiados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la anemia, la afectación del estado nutricional del hierro y la vitamina A en los niños estudiados en relación con el género y la edad.

En la tabla 1 se observan los valores promedio de las variables estudiadas. Los niños CN mostraron una disminución estadísticamente significativa de los valores promedio de la hemoglobina ($p=0,0026$), hematocrito ($p=0,0066$), VCM ($p=0,0037$), HCM ($p=<0,0001$), CCMH ($p=0,0062$), cuenta roja ($p<0,0001$) y ferritina sérica ($p=0,028$), al comparar con los niños con SD. No observándose diferencias significativas en los valores promedio de retinol sérico. El retinol sérico mostró correlación estadísticamente significativa con la hemoglobina ($0,25$; $p=0,0009$); el hematocrito ($0,61$; $p=0,0066$) y el VCM ($0,243$; $p=0,0014$).

La tabla 2 muestra la prevalencia de anemia, depleción de las reservas corporales de hierro y deficiencia de vitamina A, en niños citogenéticamente normales y con Síndrome de Down. Nótese que la prevalencia total de anemia fue 20,12% ($n=33$); en niños CN

(28,74%) fue superior a la detectada en niños con SD (10,39%). Con respecto a la prevalencia total de afectación de las reservas corporales de hierro (RDRFe+DRFe) fue 18,29% y de afectación del estado nutricional de la vitamina A (RDVA+DVA) fue 33,54%. Obsérvese, que en los niños con SD la prevalencia de afectación del hierro (22,08%) y del estado nutricional de la vitamina A (33,36%) fue significativamente superior al compararla con la detectada en niños CN (14,94% y 31,03% respectivamente), $p < 0,01$.

La prevalencia de microcitosis en niños CN ($n=38$; No anémico=16; Anémicos=22) superior a la detectada en SD ($n=4$; No anémicos=3; Anémicos=1), $X^2=32,6$ $p < 0,0001$; no se observaron casos de macrocitosis; la prevalencia de hipocromía fue superior en CN ($n=58$; No anémicos 28; Anémicos=30) que en niños con SD ($n=15$; No anémico=9, Anémicos=6); además fueron detectados 6 casos de niños con SD no anémicos con hiperchromía, $X^2=39,67$ $p < 0,0001$ (Datos no mostrados en tablas).

La tabla 3 muestra en los niños no anémicos y anémicos estudiados la prevalencia de la depleción de las reservas corporales de hierro y deficiencia de vitamina A. Nótese que en los niños anémicos el 84,95% mostraron ferritina normal de los cuales el 45,45% presentaba afectación del estado nutricional de la vitamina A; sólo el 15,15% mostró RDRFe, no observándose casos con DRFe. Con respecto a los niños no anémicos la prevalencia de afectación del estado nutricional de la Vitamina A fue 25,19%, afectación de las reservas corporales de hierro (14,51%), RDRFe + Afectación del estado nutricional de la Vitamina A (3,81%) y RDVA+DRFe (0,76%).

En la Tabla 4, muestra en los niños CN y con SD no anémicos y anémicos estudiados, la prevalencia de la depleción de las reservas corporales de hierro y deficiencia de vitamina A. Obsérvese que los niños con Síndrome de Down anémicos, el 87,50% mostraron reservas corporales de hierro normal, de los cuales el 75,00% presentaron afectación del estado nutricional de la vitamina A, y

tan sólo 1 caso de RDRFe (12,50%). Estas prevalencias resultaron superiores a las detectadas en los niños con síndrome de Down no anémicos, en quienes la prevalencia de afectación del estado nutricional de la vitamina A fue 26,08%. Contrario a la prevalencia de RDRFe (15,94%), la cual resultó mayor. Al comparar con los niños citogenéticamente normales anémicos los resultados fueron más bajos que en los niños con SD, mostraron reservas corporales de hierro normal 84%, de los cuales el 36,00% presentaron afectación del estado nutricional de la vitamina A. En relación con la prevalencia de RDRFe esta fue superior que en los niños con SD anémicos y no anémicos (16%). Estas diferencias no mostraron ser estadísticamente significativas.

Se calculó el Odds Ratio (OR) = 0,64 ($1-0,64=0,36$), observándose que los niños con síndrome de Down que tienen un adecuado estado nutricional de la vitamina A tienen 36% menos chance de desarrollar anemia con respecto a los niños citogenéticamente normales. Se detectó un Riesgo relativo (RR)=0,68; por lo que los niños con síndrome de Down que tienen un adecuado estado nutricional de la vitamina A tienen un menor riesgo de presentar anemia que los niños con síndrome de Down que tienen afectación del estado nutricional de la vitamina A (RDVA o DVA). El Riesgo atribuible (RA) fue 0,61; RA%=61%, lo cual revela que el 61% de los casos de anemia en los niños con síndrome de Down puede ser atribuible a la alteración del estado nutricional de la vitamina A.

Tabla 1

Valores promedio de la edad, variables hematimétricas, ferritina y retinol sérico en niños citogenéticamente normales y con síndrome de Down

	TOTAL	CITOGENÉTICAMENTE NORMALES (n=87)	SÍNDROME DE DOWN (n=77)	p
EDAD (años)	9,7±4,1	10,3±3,9	9,1±4,2	0,54
VARIABLES HEMATIMÉTRICAS				
Hemoglobina (g/L)	124,2±11,8	120,9±9,4	127,8±13,1	0,0026
Hematocrito (%)	37,7±3,3	37,0±2,7	38,5±3,6	0,0066
VCM	83,2±6,2	80,4±4,6	86,3±6,4	0,0037
HCM	27,4±2,5	26,3±1,7	28,7±2,6	<0,0001
CCMH	32,9±1,0	32,7±0,8	33,2±1,1	0,0062
Cuenta Roja Plaquetas	4,5±0,4 335,4±90,2	4,6±0,3 325,8±85,3	4,4±0,5 346,0±94,8	<0,0001 0,33
FERRITINA SERICA (μg/L)	36,2±22,9	36,3±20,2	36,0±25,8	0,028
RETINOL SERICO (μg/dl)	36,6±14,0	36,9±14,6	36,2±13,5	0,48

VCM: Volumen Corpuscular Medio. HCM: Hemoglobina Corpuscular Media. CCMH: Concentración corpuscular media de hemoglobina

TABLA 2

Prevalencia de anemia, depleción de las reservas corporales de hierro y deficiencia de vitamina A, en niños citogenéticamente normales y con síndrome de Down.

	Niños citogenéticamente normales		Niños con Síndrome de Down		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
NO ANEMIA	62	71,26	69	89,61	131	79,88
ANEMIA	25	28,74	8	10,39	33	20,12
NO AFECTACION Fe	74	85,06	60	77,92	134	81,71
AFECTACION Fe	13	14,94	17	22,08	30	18,29
RDFe	12	13,79	15	19,48	27	14,46
DFe	1	1,15	2	2,60	3	1,83
NO AFECTACION VA	60	68,97	49	63,64	109	66,46
AFECTACION VA	27	31,03	28	36,36	55	33,54
RDVA	21	24,14	18	23,38	39	23,78
DVA	6	6,89	10	12,98	16	9,76
TOTAL	87	100,00	77	100,00	164	100,00

Tabla 3
 Prevalencia de depleción de las reservas corporales de hierro y deficiencia de vitamina A,
 en el total de niños no anémicos y anémicos estudiados.

	TOTAL		No anémicos		Anémicos	
	n	%	n	%	n	%
Ferritina normal	134	81,21	106	80,92	28	84,85
VA normal	86	52,12	73	55,73	13	39,40
Riesgo DVA	33	20,00	23	17,56	10	30,30
DVA	15	9,09	10	7,63	5	15,15
Riesgo DRFe	27	16,37	22	16,79	5	15,15
VA normal	21	12,73	17	12,98	4	12,12
Riesgo DVA	5	3,03	4	3,05	1	3,03
DVA	1	0,61	1	0,76	-	-
DRFe	3	1,82	3	2,29	-	-
VA normal	2	1,21	2	1,53	-	-
Riesgo DVA	1	0,61	1	0,76	-	-
DVA	-	-	-	-	-	-
TOTAL	164	100,00	131	100,00	33	100,00

TABLA 4

Prevalencia de anemia, depleción de las reservas corporales de hierro y deficiencia de vitamina A, en niños citogenéticamente normales y con síndrome de Down.

	TOTAL						CN (n=87)						Down (n=77)					
	No anémicos			Anémicos			No anémicos			Anémicos			No anémicos			Anémicos		
	n	%		n	%		n	%		n	%		n	%		n	%	
Ferritina normal	134	81,21		53	85,48		21	84,00		53	76,81		7	87,50				
<i>VA normal</i>	86	52,12		38	61,29		12	48,00		35	50,73		1	12,50				
<i>Riesgo DVA</i>	33	20,00		12	19,35		6	24,00		11	15,94		4	50,00				
<i>DVA</i>	15	9,09		3	4,84		3	12,00		7	10,14		2	25,00				
Riesgo DRFe	27	16,37		8	12,90		4	16,00		14	20,29		1	12,50				
<i>VA normal</i>	21	12,73		6	9,68		3	12,00		11	15,94		1	12,50				
<i>Riesgo DVA</i>	5	3,03		2	3,22		1	4,00		2	2,90		-	-				
<i>DVA</i>	1	0,61		-	-		-	-		1	1,45		-	-				
DRFe	3	1,82		1	1,62		-	-		2	2,90		-	-				
<i>VA normal</i>	2	1,21		1	1,62		-	-		1	1,45		-	-				
<i>Riesgo DVA</i>	1	0,61		-	-		1	4,00		1	1,45		-	-				
<i>DVA</i>	-	-		-	-		-	-		-	-		-	-				
TOTAL	164	100,00		62	100,00		25	100,00		69	100,00		8	100,00				

Odds ratio (OR): 6.409 Cornfield/Wolf (1.03 - 50.45).RR= 5.250 (1.13 - 24.28).Riesgo atribuible poblacional: 0.60

Consideraciones finales (Discusión)

La anemia es un problema generalizado de salud pública, asociado con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad, especialmente en las embarazadas y niños pequeños (Badham et al., 2007). La prevalencia mundial de la anemia en niños en edad preescolar es de 47,4%. En los países en desarrollo se calcula que 36% de la población sufre de anemia nutricional, en particular se estima que su prevalencia en escolares y adolescentes de 5 a 14 años es de 21,8% (Badham et al., 2007; Mora y Mora, 1998). En el presente estudio fue detectada una prevalencia de anemia de 20,12%, similar a la estimada para países en desarrollo, considerado por la OMS como problema moderado de salud pública (20–39%) (Badham et al., 2007), resultando más prevalente en niños CN (28,74%) que en niños con SD (10,39%).

La anemia es una enfermedad ocasionada por causas múltiples que ocurren con frecuencia, tanto nutricionales (deficiencia de vitaminas y minerales), como no nutricionales (infecciones, hemoglobinopatías y a diferencias étnicas de la hemoglobina normal). Uno de los factores subyacentes que contribuyen al problema con más frecuencia es la deficiencia de hierro, por lo que la anemia ferropénica es considerada como uno de las diez principales causas de morbilidad mundial (Badham et al., 2007).

A pesar de que la anemia por deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional y de micronutrientes más generalizada a escala mundial, en la presente investigación no se observaron casos de anemia con DRFe. En tanto que, el 15,15% de los niños anémicos mostró RDRFe. Además, nuestros resultados muestran que en niños CN la prevalencia de anemia y RDRFe (28,74% y 16%, respectivamente) fueron superior a la observada en niños con SD (10,39% y 12,50%, respectivamente). Asimismo, los niños CN mostraron una disminución estadísticamente significativa de los valores promedio de la hemoglobina ($p=0,0026$), hematocrito

($p=0,0066$), VCM ($p=0,0037$), HCM ($p=<0,0001$), CCMH ($p=0,0062$), cuenta roja ($p<0,0001$) y ferritina sérica ($p=0,028$), al comparar con los niños con SD. Nuestros resultados revelan una prevalencia de microcitosis e hipocromía en niños CN (43,68%; 66,66%, respectivamente) superior a la detectada en SD (5,19%; 19,48%, respectivamente) $p<0,0001$. Además, la prevalencia de microcitosis e hipocromía detectada en niños anémicos CN (25,29%; 34,48%, respectivamente) resultó superior a la detectada en niños anémicos con SD (1,30%; 7,79%) $p<0,0001$; revelando la presencia de trastornos ocasionados por afectación de las reservas de hierro.

Como hemos observado en el presente estudio los individuos con SD muestran una prevalencia menor de anemia y anemia + RDRFe que los niños CN. Contrario a lo señalados por Henry y col., quienes estudiaron el perfil hematológico de 159 recién nacidos con SD (0-7 días de edad), lo cual reveló una prevalencia de anemia que no difiere de la observada en la población neonatal general (Henry et al., 2007). Sin embargo, nuestra prevalencia de anemia en niños con SD (10,39%) resultó superior a las observadas por Tenenbaum y col (8,1%) (Tenenbaum et al., 2011). Resultados similares fueron observados por Awasthi y col, quienes investigaron los parámetro hematológicos de los pacientes con SD quienes presentaban manifestaciones iniciales de desordenes hematológicos, de los 239 niños con SD evaluados durante un período de 10 años, 6,2% mostraron desordenes hematológicos, de los cuales solo 1,7% presentaron anemia (Awasthi et al., 2005).

El SD es la más común de las aneuploidias, cuyas manifestaciones clínicas incluyen trastornos cognitivos, dimorfismos craneofaciales, anormalidades del tracto gastrointestinal, defectos cardiacos congénitos, anormalidades endocrinas, defectos inmunológicos y déficit neurológico asociado con demencia precoz (Roizen & Patterson, 2003). Además, pueden presentar trastornos del sistema hematopoyético como anormalidades en la cantidad de plaquetas

e incremento de la prevalencia de leucemias (Webb et al., 2007). A pesar de que en el presente estudio no se observaron casos de macrocitosis, ha sido reportado en niños con SD muestran una ocurrencia de 45-66% de elevación de volumen corpuscular medio o macrocitosis (David et al., 1996). Aunque la etiología de la macrocitosis es desconocida se ha asociado con deficiencia de vitamina B12, folato incremento de la concentración de la hemoglobina fetal, reticulocitosis e hipotiroidismo. Cabe destacar que la presencia simultánea de la carencia de hierro y deficiencia de vitamina B12, provoca a menudo una anemia normocítica, dificultando el diagnóstico, y en consecuencia el manejo terapéutico (Wachtel & Pueschel, 1991). Otros factores tales como la enfermedad celiaca, entre otras enfermedades crónicas prevalentes en individuos con SD, pueden contribuir a la anemia (Baydoun et al., 2012). Siendo necesarias otras investigaciones que permitan evaluar la presencia de estas condiciones en los niños con SD.

Por otro lado, estudios en países en desarrollo como Venezuela, revelan como una gran proporción de la población padecen deficiencia de hierro sin anemia (Taylor et al., 1993). En los países en vías de desarrollo se estima que entre el 30 al 40% de los niños padece de deficiencia de hierro (Cook, 199; Taylor et al., 1993). Los resultados de este estudio muestran una prevalencia total de afectación de la reservas corporales de hierro (RDRFe+DRFe) fue 18,29%, superior en los niños con SD (22,08%) al comparar con los niños CN (14,94%), $p < 0,01$. Nuestra prevalencia de afectación del hierro en niños con SD resultó superior a la detectada por Dixon y col, quienes analizaron perfil de células rojas y el estado nutricional del hierro en 114 niños con SD, detectando una prevalencia de anemia por deficiencia de hierro en 3% y de deficiencia de hierro en 10% (Dixon et al., 2010), pero inferior a la observada por Tenenbaum y col, quienes evaluaron los depósitos de hierro a través de la determinación de la ferritina sérica indicando que 26/27 niños con SD presentaban disminución por debajo de los valores considerados normales para la edad (Tenenbaum et al., 2011).

Como lo refiere Bear (2001), el hierro es necesario en el funcionamiento y desarrollo de las diversas células del Sistema Nervioso Central, como cofactor para un número de enzimas involucradas en las reacciones de oxidación-reducción, síntesis de neurotransmisores, especialmente serotonina, norepinefrina y dopamina, y catabolismo de otros neurotransmisores, y en el proceso de síntesis de mielina producida por los oligodendrocitos (Beard, 2001). Alteraciones en la dopamina mesolímbica y en el tejido nigro-estriado están asociadas con cambios en el control motor así como también la percepción, la memoria y la motivación (Beard, 2001).

Existen evidencias que sugieren que la deficiencia de hierro, particularmente si la deficiencia ocurre durante estados críticos del desarrollo, afecta el desarrollo cognitivo y conductual así como el funcionamiento cerebral (McCann y Ames, 2007; Lozoff et al., 2006; Lozoff et al., 2000). Adicionalmente, en recientes publicaciones, se ha postulado que la deficiencia de hierro puede ser considerado un factor de riesgo asociado con desordenes de hiperactividad y déficit de atención (Cortese et al., 2009; Konofal et al., 2008), Síndrome pediátrico de extremidades intranquilas y trastornos del sueño (Gozal y Kheirandish-Gozal, 2009) y niños con movimientos límbicos periódicos durante el sueño (Simakajornboon et al., 2003).

Además, la carencia de vitamina A puede aumentar el riesgo de padecer eritropoyesis deficiente en hierro y finalmente, anemia (Badham et al., 2007). La DVA es considerada un problema de salud pública en 60 a 78 países en desarrollo, y se estima que 78 a 253 millones de niños preescolares están afectados por la deficiencia de este micronutriente (WHO, 1995; WHO, 1996). En la presente investigación se observó una prevalencia de RDVA fue 23,78% y DVA 9,76%. En los niños con SD la prevalencia de afectación del estado nutricional de la vitamina A (33,36%) (RDA=23,38% y DVA=12,98%), significativamente superior al comparar con la detectada en niños CN (31,03%) (RDA=24,14% y DVA=6,89%),

$p < 0,01$. De acuerdo con la OMS, en la población infantil estudiada, la prevalencia de DVA $< 10\%$ detectada es indicativo de un problema leve de salud pública. Sin embargo, la prevalencia de DVA en niños con SD se ubica entre 10 a $< 20\%$ por lo que es indicativo de la existencia de un problema moderado de salud pública (Semba y Bloem, 2002).

Es importante señalar que, en la población estudiada, el retinol sérico mostró correlación positiva significativa con la hemoglobina ($p=0,0009$), el hematocrito ($p=0,0066$) y el VCM ($0,243$; $p=0,0014$). Al respecto, estudios clínicos a principios del siglo pasado, y numerosas encuestas entre la población en países en vías de desarrollo, a mediados del siglo XX, mostraron una correlación positiva y congruente, variando de 0,2 a 0,9, entre retinol sérico y la concentración de hemoglobina (Oski, 1995). Las encuestas en países en vías de desarrollo generalmente han revelado correlaciones positivas entre el retinol sérico y la concentración de hemoglobina, con asociaciones más fuertes en poblaciones con estado nutricional más pobre de vitamina A. Sin embargo, los datos de estudios en humanos que investigan la influencia de la vitamina A sobre la absorción del hierro son ambiguos y sugieren que se necesita más investigación para aclarar el efecto actual de la vitamina A sobre la absorción del hierro. (Oski, 1995).

Aunque no se observaron diferencias significativas en los valores promedio de retinol sérico entre niños CN y con SD, en los niños los niños con Síndrome de Down anémicos, el 87,50% mostraron reservas corporales de hierro normal, de los cuales el 75,00% presentaron afectación del estado nutricional de la vitamina A; estas prevalencias resultaron superiores a las detectadas en los niños con Síndrome de Down no anémicos, en quienes la prevalencia de afectación del estado nutricional de la vitamina A fue 26,08%. Además, los niños con síndrome de Down que tienen un adecuado estado nutricional de la vitamina A tienen 36% menos chance de desarrollar anemia con respecto a los niños citogenéticamente

normales (OR) = 0,64 (1-0,64=0,36) y menor riesgo de presentar anemia que los niños con síndrome de Down que tienen afectación del estado nutricional de la vitamina A (RDVA o DVA) (RR)=0,68; el 61% de los casos de anemia en los niños con síndrome de Down puede ser atribuible a la alteración del estado nutricional de la vitamina A (RA) = 0,61.

La deficiencia de vitamina A es conocida entre las causas de anemia (Semba y Bloem, 2002), sin embargo la epidemiología y patogénesis de la anemia por DVA no ha sido bien caracterizada. Diversos estudios han demostrado como la vitamina A influye en la anemia modulando la hematopoyesis, incrementando la inmunidad frente a las enfermedades infecciosas (Semba, 1998) y a través de la modulación del metabolismo del hierro (Bloem, 1995). Diversas investigaciones intentan dilucidar las interacciones entre vitamina A y hierro. Mientras la vitamina A puede reducir el riesgo de infecciones graves, su efecto al reducir la anemia asociada a la infección todavía requiere más investigación, ya que su influencia en el metabolismo del hierro puede ser ocultada por la gravedad y los tipos de infecciones a escala individual y poblacional. Sin embargo, no existen en niños con síndrome de Down estudios que evalúen la prevalencia de DVA y su asociación con la anemia.

En conclusión, la etiología de la anemia es compleja y multifactorial. La DRFe y la DVA son deficiencias nutricionales prevalentes en niños con síndrome de Down, por lo que este es un grupo de riesgo. Aunque la prevalencia de anemia en niños con SD es menor que en la población general, los niños con SD pueden ser más susceptibles a los efectos de la DRFe relacionados con el desarrollo motor y neurocognitivo, por ello, el diagnóstico temprano y la prevención de la anemia en niños con SD representa una herramienta importante para su control, siguiendo las mismas recomendaciones para la detección de deficiencia de hierro y anemia por deficiencia de hierro, que las aplicadas en la población infantil general, e incluir además, la detección de otras condiciones asociadas. Además,

en niños con SD, quienes muestran compromiso de su capacidad intelectual, requieren de especial atención la prevención de la anemia, deficiencia de hierro y sus potenciales efectos deletéreos en el desarrollo, así como la población infantil general. La prevención y el tratamiento de la DRFe y la anemia por deficiencia de hierro debe ser una medida urgente, que puede controlarse con una o más de estas medidas: 1) suplementación con hierro, 2) fortificación de alimentos y 3) diversificación de la dieta, promoviendo el consumo de alimentos ricos en hierro heme (hígado, carnes rojas, pescado y pollo), mejorando además la biodisponibilidad del mineral.

Por su parte la DVA, ocasionada principalmente por una dieta crónicamente baja en alimentos ricos en vitamina A preformada, o en sus precursores carotenoides (especialmente el β -caroteno), es un problema moderado de salud pública en niños con SD, que afecta a la visión, la resistencia a infecciones, el crecimiento y la sobrevivencia de esta población, situación que puede comprometer en mayor proporción los procesos de neurogénesis en el adulto. Por lo que, la asociación DVA y DRFe puede implicar un mayor compromiso en el desarrollo cerebral en niños con SD. Por lo tanto, la administración de múltiples vitaminas y minerales parece estar indicada en la prevención de la anemia nutricional, así como el mejoramiento general de la nutrición y la salud en la población infantil CN y con SD. Son necesarios otros estudios que permitan evaluar los fenómenos bioquímicos, hematológicos e inmunológicos que permitan explicar el riesgo de anemia en niños con DS quienes presentan afectación del estado nutricional de la vitamina A; además de comprobar el efecto de la suplementación con vitamina A sobre el estado del hierro en niños con SD, lo cual podría mejorar la calidad y esperanza de vida de esta población.

Referencias

- Amaya-Castellanos D, Vilorio-Castejón H, Ortega P, Gómez G, Urrieta JR, Lobo P, Estévez J. (2002). Deficiencia de vitamina A y estado nutricional antropométrico en niños marginales urbanos y rurales en el Estado Zulia, Venezuela. *Invest Clin*; 43: 89-105.
- Awasthi A, Das R, Varma N, Ahluwalia J, Gupta A, Marwaha RK, Garewal G. (2005). Hematological disorders in Down syndrome: ten-year experience at a Tertiary Care Centre in North India. *Pediatr Hematol Oncol*; 22(6): 507–512.
- Baydoun A, Maakaron JE, Halawi H, Abou Rahal J, Taher AT.(2012) Hematological manifestations of celiac disease. *Scand J Gastroenterol*; 6: 1-11
- Beard JL. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr*. 131(2S-2):568S-579S; discussion 580S.
- Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL. (1979). Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*; 32(10):2143-9.
- Black MM. (2012). Integrated strategies needed to prevent iron deficiency and to promote early child development. *J Trace Elem Med Biol.*; 26 (2-3):120-123.
- Bloem MW (1995). Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control. *Proc. Nutr. Soc.*; 54: 501 – 508.

- Boccio J, Salgueiro J, Lysionek A, Zubillaga M, Goldman C, Weill R, Caro R. (2003) Iron metabolism: current concepts of an essential micronutrient. *Arch Latinoam Nutr*; 53:119-132.
- Castejón HV, Ortega P, Amaya D, Gómez G, Leal J, Castejón OJ. (2004). Co-existence of anemia, vitamin A deficiency and growth retardation among children 24-84 months old in Maracaibo, Venezuela. *Nutr Neurosci*;7(2):113-119.
- Castejón HV, Ortega P, Díaz ME, Amaya D, Gómez G, Ramos M, Alvarado MV, Urrieta JR. (2001). Prevalencia de deficiencia subclínica de vitamina A y desnutrición infantil en niños marginales de Maracaibo-Venezuela. *Arch Latinoam Nutr*; 51:25-32.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Malnutrition and micronutrient deficiencies among Bhutanese refugee children-Nepal, 2007. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*; 57:370-373.
- Consejo Nacional de la Alimentación (CNA). Tercer Informe Nacional al Comité Mundial de Seguridad Alimentaria sobre la Aplicación del Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (2000- 2001). Caracas-Venezuela 2002; 1-18.
- Cook, J. (1999). The nutritional assessment of iron status. *Arch Latinoam Nutr.*; 49 (3 Suppl 2):11S-14S.
- Cortese S, Konofal E, Bernardina BD, Mouren MC, Lecendreux M. (2009). Sleep disturbances and serum ferritin levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry*; 18(7):393-399.
- David O, Fiorucci GC, Tosi MT, Altare F, Valori A, Saracco P, Asinardi P, Ramenghi U, Gabutti V. (1996) Hematological studies in children with Down syndrome. *Pediatr Hematol Oncol*; 13(3):271-275.

- De Pee S, Dary O. (2002). Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J. Nutr.*; 132(9 Suppl):2895S-2901S.
- Dixon NE, Crissman BG, Smith PB, Zimmerman SA, Worley G, Kishnani PS. (2010). Prevalence of iron deficiency in children with Down syndrome. *J Pediatr.*;157(6):967-971.
- Henry E, Walker D, Wiedmeier SE, Christensen RD. (2007). Hematological abnormalities during the first week of life among neonates with Down syndrome: data from a multihospital healthcare system. *Am J Med Genet A*;143(1):42-50.
- Forrellat-Barrios M, Gautier du Défaix Gómez H, Fernández-Delgado N. (2000). Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*; 16:149-160.
- García-Casal M. (2005). La deficiencia de hierro como problema de Salud Pública. *An Venez Nutr*; 18: 45-48.
- Gozal D, Kheirandish-Gozal L. (2009). Iron deficiency and periodic leg movement disorder of sleep. *Sleep Med*; 10(2):265.
- Gueri M. (1993). Deficiencia de hierro en América Latina y el Caribe. En: Gueri M. Memorias Tercer Taller Regional sobre deficiencias de vitamina A y otros nutrientes en América Latina y el Caribe. Recife, Brasil; 23-27.
- Badham J, Michael B. Zimmermann and Klaus Kraemer. Guía sobre Anemia Nutricional. (2007). SIGHT AND LIFE Imprenta. Pp. 62. Disponible en: http://www.sightandlife.org/fileadmin/data/Books/guidebook_spanish.pdf. Revisado 03-11-12
- Jaffe W, Entrena A. (1993). La situación de la vitamina A en Venezuela. *An Venez Nutr*; 6: 19-24.

- Konofal E, Lecendreux M, Deron J, Marchand M, Cortese S, Zaïm M, Mouren MC, Arnulf I. (2008) Effects of iron supplementation on attention deficit hyperactivity disorder in children. *Pediatr Neurol*; 38(1):20-26.
- Landaeta-Jiménez M, Nieves-García M, Bosch V. (2003). Principales deficiencias de micronutrientes en Venezuela. *Rev Esp Nutr Comunitaria*; 9:117-127.
- Landaeta-Jiménez M. (2000). Alimentación y nutrición en la Venezuela de 2000. *An Venez Nutr*; 13:143-150.
- Layrisse M. Anemia por deficiencia de hierro. En: *Hematología, fundamentos de medicina*. 4a ed. Medellín: Corporación para Ciencias Biológicas; 1999
- Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T (2006). Long lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutr Rev* 64:s34–s43
- Lozoff B, Jiménez E, Hagen J, Mollen E, Wolf A. (2000). Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*; 105(4): E51.
- Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. (1991). Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Engl J Med*; 5 (325):687–694.
- Mahajan G, Sikka M, Rusia U, Bhatia MS. (2011) Iron profile in children with behavioral disorders: a prospective study in a tertiary care hospital in north India. *Indian J Hematol Blood Transfus.* ;27(2):75-80.
- McCann JC, Ames BN (2007). An overview of evidence for a causal relation between iron deficiency during development and

deficits in cognitive or behavioral functions. *Am J Clin Nutr* 85(4):931–945

Méndez-Castellano H, Méndez MC. Sociedad y Estratificación Social. Método Graffar-Méndez Castellano. Ediciones Fundacredesa. Caracas 1994, 206 p.

Micronutrient Initiative=UNICEF=Tulane (1998): Progress in Controlling Vitamin A Deficiency. Ottawa: Micronutrient Initiative.

Montoya Villegas Julio César, Satizábal Soto José María, García Vallejo Felipe, Sánchez Gómez Adalberto. Perspectiva y comprensión bioquímica del síndrome de Down. *El Hombre y la Máquina* No. 30 • Enero - Junio de 2008. 118-129

Mora JO, Gueri M, Mora OL. (1998). Vitamin A deficiency in Latin America and the Caribbean: an overview. *Rev Panam Salud Pública*; 4:178-186

Mora JO, Mora OL. (1998). Deficiencias de micronutrientes en América Latina y el Caribe: anemia ferropriva. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, Agencia de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Roche Regional América Latina, Opportunities for Micronutrient Interventions Project (OMNI).

Nestel P, Davidsson L. Anemia, Deficiencia de Hierro y Anemia Ferropriva. Grupo Consultor Internacional de Anemia Nutricional (INACG), Oficina de Salud, Enfermedades Infecciosas y Nutrición, Oficina de Salud Global, Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos (USAID), Junio 2004. Washington, DC, 1-6.

- Oski FA. (1995). Anemia due to other nutritional deficiencies. In Williams' Hematology, 5th edn, ed. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller & TJ Kipps, pp 511 – 515. New York: McGraw-Hill.
- Roizen NJ and Patterson D. (2003). Down's syndrome. *The Lancet*; 361(9365): 1281–1289.
- Semba RD and Bloem MW. (2002). The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *European Journal of Clinical Nutrition*; 56: 271–281.
- Semba RD. (1999). Vitamin A as “anti-infective” therapy, 1920-1940. *J Nutr*; 129: 783-791
- Simakajornboon N, Gozal D, Vlastic V, Mack C, Sharon D, McGinley B. (2003) Periodic limb movements in sleep and iron status in children. *Sleep*; 26:735–738.
- Solano L, Barón M, del Real S. (2005). Situación nutricional de preescolares, escolares, y adolescentes de Valencia, Carabobo, Venezuela. *An Venez Nutr*; 18(1):72-76.
- Solano L, Meertens L, Peña E, Argüello F. (1998). Deficiencia de micronutrientes. Situación actual. *An Venez Nutr*; 11:48-54.
- Sommer A, Davidson FR. (2002). Annecy Accords. Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. *J Nutr.*; 132(Suppl9):S2845–50.
- Stephensen CB. (2001). Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr.*; 21:167-192
- Taylor, P., Martínez-Torres, C., Méndez-Castellano, H., Bosch, V., Leets, I., Trooper, E. and Layrissé, M. (1993). “The relationship between iron deficiency and anemia in Venezuelan children”, *American Journal of Clinical Nutrition* 58: 215-218.

- Tenenbaum A, Malkiel S, Wexler I, Levy-Khademi F, Revel-Vilk S, and Stepensky P. (2011). Anemia in Children with Down Syndrome. *International Journal of Pediatric*; 2011: 1-5.
- Wachtel TJ, Pueschel SM. (1991). Macrocytosis in Down syndrome. *Am J Ment Retard*; 95: 417– 420.
- Webb D, Roberts I, Vyas P. (2007). Haematology of Down syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 92(6):F503-507.
- WHO (1995). Global Prevalence of Vitamin A Deficiency. MDIS Working Paper 2. Geneva: WHO:1-34.
- WHO (1996). Indicators for assessing Vitamin A Deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. WHO/NUT/96.1. Geneva: WHO:5-13.
- World Health Organization Department of Nutrition for Health and Development /United Nations University/UNICEF. (2001). Iron deficiency anemia, assessment, prevention and control: a guide for programme managers. Geneva.

Pathology of nerve cell membranes in complicated and severe human brain traumatic injuries. An electron microscopic study using cortical biopsies.

*Orlando J. Castejón**

ABSTRACT

Cortical biopsies of ten patients with severe and complicated brain traumatic injuries were examined with transmission electron microscope to study the ultrastructural damage of nerve cell membranes. The non-pyramidal neurons, astrocytes and oligodendrocytes showed plasma membrane fragmentation and areas of focal necrosis, enlargement and degranulation of rough and smooth endoplasmic reticulum cisterns, Golgi complex membrane fragmentation, and irregular dilation and disassembly of nuclear envelope. The degenerated myelinated axons showed invaginations and fragmentation of axolemmal membrane, and myelin sheath vacuolization. Synaptic disassembly and disruption and disassembly of interastrocytic gap junctions were also found. Disruption of neuronal Ca^{2+} homeostasis, activation of phospholipases and calpain, peroxidative stress, hemoglobin cytotoxicity, glutamate cytotoxicity, and ischemia of brain parenchyma are discussed in relation with the nerve cell membrane damage.

KEYWORDS: nerve cell membranes, brain trauma, electron microscopy.

*Address for correspondence: Dr. Orlando J. Castejón. Instituto de Investigaciones Biológicas Drs. "Orlando Castejón y Haydée Vilorio de Castejón. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo.Venezuela. E-mail: ocastejo@cantv.net

Recibido: 15/10/2012 Aceptado: 02/01/2013

Introduction

Tissue surrounding hematomas, traumatic lesions, infective zones, and certain tumors undergo autocatalytic peroxidation (Cohadon, 1984), a lipidic disorder which greatly altered membrane functions. An interaction between lipid peroxidation and calcium was earlier formulated by Brauglher et al. (1985) in the pathogenesis of neuronal injury. Membrane damage during situations of acute or subacute cerebral aggression has been studied using experimental models (Cohadon, 1984; Saatman et al., 1996; Homayoun et al., 1997; Paschen and Doutheil, 1999; Hu et al., 2000; Mengesdorf et al., 2002). Castejón (1995) describes the synaptic degeneration in traumatic human brain edema. Povlishock (1986, 1992 a, b) found axolemmal damage in traumatically induced axonal damage. Glial membrane damage of glial axonal junction after diffuse axonal injury was reported by Maxwell et al. (1988). Traumatic brain injuries produce damage to nodal axolemma (Genarelli et al., 1993), and a widespread derangement to the neuronal cytoskeleton (Castejón, 1985; Hayes et al., 1995, Castejón and Acurero, 2004), delayed phospholipids degradation (Homayoun et al., 1997), and calpain-mediated spectrin breakdown (Saatman et al., 1996, 2003), leading to ischemic neuronal death. Glutamate excitotoxicity-induced damage of plasma membrane occurs in transient global cerebral ischemia and in traumatic brain injuries (Paschen, 1996).

The most obvious structural membrane damage, which is identified post-mortem by neuropathologists, may not be the most reliable alteration with regard to clinico-pathological alteration (Pat and Brodhun, 1999). Therefore, we have used human cortical biopsies taken during the neurosurgical treatment and immediately processed for transmission electron microscopy in the surgical room for obtaining well preserved brain material, and a detailed knowledge of ultrastructural damage of nerve cell membranes.

Torp et al. (2000) described association of fibrillar beta amyloid with neuronal membrane surface in aged dog brains. Similar findings were also reported by Yamaguchi et al. (2000) in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type, Alzheimer disease, and non-demented aged subjects. Haik et al. (2000) demonstrated that the putative transmembrane domains of prion protein induce neurotoxicity, and destabilize nerve cell membranes. Castejón and Castejón (2000) described the oligodendroglial cell changes in traumatic human brain edema.

Glutamate excitotoxicity-induced damage of plasma membrane occurs in transient global cerebral ischemia (Paschen, 1996), and in traumatic brain injuries. Peroxidative damage to cell membranes has been found following cerebral ischemia (Ginsberg et al., 1988; Traystman et al., 1991; Choi, 1993; Evans, 1993, Boldyrev et al., 2000, Pashen et al., 2001). Transient global cerebral ischemia triggers suppression of protein synthesis, a process controlled by endoplasmic reticulum function (Paschen and Doutheil, 1999; Paschen and Frandsen, 2001; Mengesdorf et al., 2002, Paschen, 2003).

Traumatic brain injuries involve direct mechanical damage, which may be aggravated by secondary insults such as ischemia (Engel et al., 2005). Membrane damage has been postulated as critical factor in mediating axonal degeneration and nerve cell death (Shi, 2004, Castejón and Acurero, 2004)

Protein aggregation analyzed by electron microscopy and laser-scanning confocal microscopy has been reported after focal brain ischemia (Hu et al., 2000). It has been suggested that nitric oxide may contribute to ischemia-induced cell injury acting upon endoplasmic reticulum, calcium homeostasis, protein synthesis, and energy metabolism (Doutheil et al., 2000).

Damaged of nerve cell plasma membranes, cytoskeleton, rough and smooth endoplasmic reticulum membranes, lysosomal limiting

membrane, and outer and inner mitochondrial membranes have been reported by Castejón and Castejón (2004), Castejón (2004), Castejón and Arismendi, and Castejón and Acurero (2004) in moderate and severe edema associated to congenital hydrocephalus, brain trauma and brain tumors. Recent studies have suggested that cholesterol, an important component of membranes that controls their physical properties and functions, plays a critical role in neurodegenerative diseases. Enrichment of neuronal plasma membrane with cholesterol protects cortical neurons from apoptosis induced by soluble oligomers of the Abeta (1-40) peptide. Conversely, cholesterol depletion renders cells more vulnerable to the cytotoxic effects of the Abeta soluble oligomers (Sponne et al., 2004). The binding of Abeta to membrane lipids facilitates Abeta fibrillation, which in turn disturbs the structure and function of membranes, such as membrane fluidity or the formation of ion channels (Verdier et al., 2004).

Recent reports also indicate that dysfunction of endoplasmic reticulum, which not only mediates proteins processing, but also regulates intracellular calcium homeostasis and cell death signal activation, occurs at an early stage after ischemia, and might be the initial step of apoptotic cascades in neurons (Hayashi and Abe, 2004). Singleton et al. (2002) and Singleton and Povlishock (2004) reported plasma membrane disruption in diffuse brain injury. Luo and Shi (2004) have found that acrolein, a byproduct of oxidative stress and lipid peroxidation, inflicts severe axolemmal disruption. The membrane damage is likely mediated by reactive oxygen species and lipid peroxidation, which are elevated after acrolein exposure. Shi (2004) has also reported axolemmal disruption in guinea pig spinal cord following compression. Kurnellas et al. (2005) have described plasma membrane calcium ATPase deficiency in multiple sclerosis and spinal cord injury, as a potential mechanism of neurodegeneration. Farkas et al. (2006) demonstrated mecanoporation or disruption of neuronal plasma membrane induced by diffuse traumatic brain injury. Thompson et al. (2006) described opening of neuronal gap junction hemichannels following ischemia after stroke. Yi et al. (2006)

have found after traumatic brain injury an increase in complexing I and complexing II, considered respectively markers of inhibitory and excitatory synapses. Sokka et al. (2007) reported kainic acid- induced disintegration of endoplasmic reticulum in hippocampal neurons. Tang et al. (2010) showed significant increase of AQP4 expression in astrocytic membranes following Intracerebral hemorrhage in AQP4(+ / +) mice. AQP4 deletion aggravated neurological deficits and brain edema contents of whole hemorrhagic ipsilateral hemisphere.

Sharma et al. (2011) reported at the ultrastructural level, perivascular edema together with neuronal, glial and endothelia cell damages is frequent in the brain areas showing albumin leakage. Damage to both pre- and post-synaptic membrane and myelinated axons is also common. Cullen et al. (2011) observed increased membrane permeability in a sub-population of cells in culture immediately upon deformation. Alterations in cell membrane permeability, however, were transient and biphasic over the ensuing hour post-insult, suggesting initial membrane damage and rapid repair, followed by a phase of secondary membrane degradation.

More recently, Harris et al. (2012) found altered cellular metabolic status after traumatic brain injury (TBI), with specific compounds proposed to reflect edema, excitotoxicity, neuronal and glial integrity, mitochondrial status and bioenergetics, oxidative stress, inflammation, and cell membrane disruption.

In the present paper we analyze the ultrastructural alteration of nerve cell plasma membrane, cytomembranes, synaptic membranes, and interastrocytary gap junctions in cortical biopsies of patients with complicated brain traumatic injuries. The brain parenchyma of these patients exhibits moderate and severe edema and sustained anoxic-ischemic conditions (Castejón et al., 2001).

1. Material and Methods

Samples of cerebral cortex of ten patients with traumatic complicated head injury were used in the present study. Cortical biopsy was performed during surgery according to the basic principles of the Helsinki Declaration. Clinical data, diagnosis, biopsy region and degree of brain edema appear listed in Table No. 1. Two to five mm thick cortical biopsies were immediately fixed at the surgical room in 4% glutaraldehyde-0.1M phosphate or cacodylate buffer, pH 7.4 at 4°C. Later, they were divided into 1mm fragments and immersed in a fresh, similar solution for periods varying from 2-72h, followed by secondary fixation in 1% osmium tetroxide-0.1M phosphate buffer, pH 7.4 for 1h. They were then rinsed 5 to 10 min in a buffer similar to that used in the fixative solution, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Araldite or Epon. For light microscopy thick sections of approximately 0.1 to 1 μ were stained with toluidine blue and examined with a Zeiss photomicroscope. Ultrathin sections obtained with a Porter-Blum and LKB ultramicrotomes, were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEOL 100B electron microscope. Observations were made using intermediate magnifications ranging from 30-90.000 X.

Table 1. Neurosurgical Study

Case No.	Age and Sex	Clinical Data	Diagnosis	Edema	Cortical Biopsy and Site of Injury	Evolution Time of Brain Injury
1.JP (CCG29)	14 y, M	Contusion and cave-in-fracture of frontal region, transitory loss of consciousness	Contusion and cave-in fracture of frontal region.	severe	Left frontal cortex. Focal Region.	1 day

Pathology of nerve cell membranes in complicated and severe human brain traumatic injuries. An electron microscopic study using cortical biopsies

174

2.HRF (CCH17)	18 y, F	Severe frontal contusion cave-in fracture in road accident, loss of consciousness. Convulsive crisis.	Severe frontal contusion	Severe	Left frontal cortex. Focal Region.	8 days
3.JRCR (CCH31)	69 y, M	Falling from his own height, chronic alcoholic patient presented headache, diminution of muscle strength of lower extremities and right arm, temporary loss of consciousness, dysarthria, anisocoria.	Brain trauma. Left frontoparietal occipital subdural hematoma	Severe	Left parietal cortex. Focal and Perifocal Regions.	16 days
4.JM (CCH21)	58 y, M	Road accident. Patient showing contusion and hematoma of left temporo-parietal region. Clouded sensorium, temporospatial disorientation. Left mydriasis.	Brain trauma Left parietooccipital subdural hygroma	Severe	Left parieto temporal cortex. Focal Region.	19 days
5 . OP (CCH30)	60 y, F	Head injury in traffic accident, fracture of both legs, state of coma, abolition of reflexes. Left mydriasis. After recovery showed disorders of behavior. (Post-traumatic confusional syndrome)	Brain trauma. Subdural hygroma	Severe	Right parietal cortex. Focal Region.	25 days
6. ANG (CCH18)	39 y, M	Loss of consciousness after falling from a running truck, headache. Left hemiparesis, papilledema.	Brain trauma. Right parieto temporal subdural hematoma	Severe	Right temporo parietal cortex. Focal Region.	8 months
7. LCS (CCH64)	20 y, F	Frontal headache	Brain trauma. Left frontal Subdural hematoma	Severe	Left parietal cortex. Focal Region.	6 days

8. IJA CCH61	27 y, F	Patient hit with a stick on a fighting street. Brain trauma. Biparietal fracture. Reintervened by biparietal craneoplastic surgery.	Biparietal trauma.	Severe	Right parietal cortex. Focal Region.	8 months
9. ASCR (CCH22)	26 y, M	Falling from his own height. Skull trauma in right temporo-parietal region, tonic clonic convulsion, and disorders of behavior	Brain trauma. Right parieto temporal. Subdural hematoma. Brain contusion.	Severe	Right temporo parietal cortex. Focal Region.	7 months
10. PDM. (CCH27)	21 y, M	Falling from a light post, coma, bilateral papilledema.	Brain trauma Right epidural hematoma.	Severe	Right temporal Cortex. Focal Region.	1 day

2. Results

In severe edema of traumatic brain injuries complicated with subdural hematoma, the non-pyramidal neurons, astrocytes and oligodendrocytes showed plasma membrane fragmentation and areas of focal necrosis, enlargement and degranulation of rough and smooth endoplasmic reticulum cisterns, Golgi complex membrane fragmentation, and irregular dilation and disassembly of nuclear envelope. The degenerated myelinated axons show invaginations of the axolemmal membrane and formation of endocytic vesicles. The myelin membranes appear separated forming large intraperiod vacuoles. (Figs.1 to 5).

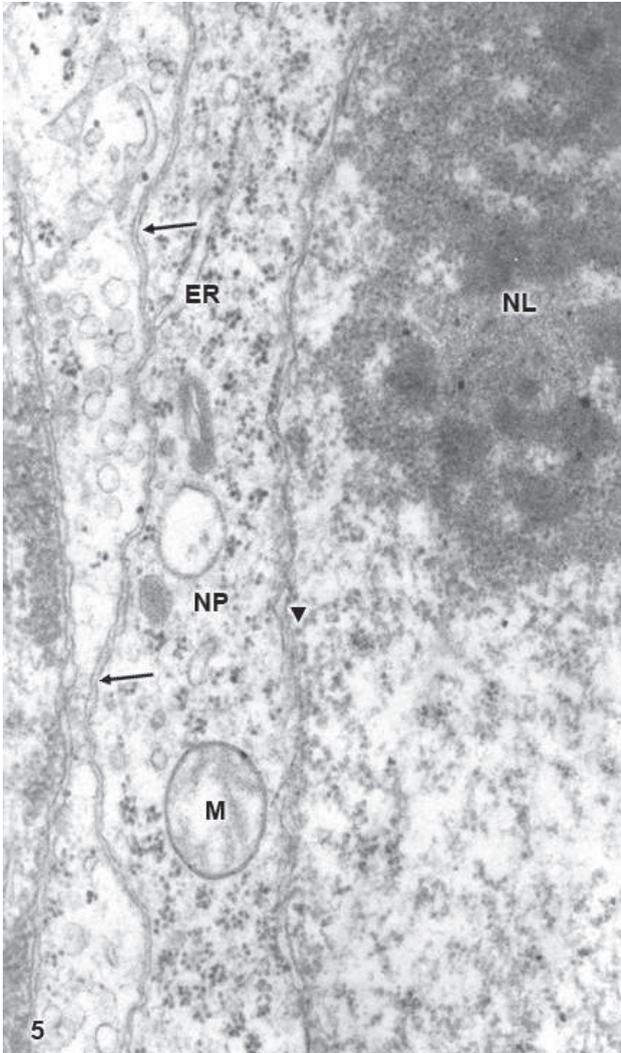


FIGURA 1. Brain trauma. Left frontal hematoma. Non-pyramidal neuron in an area of moderate perifocal edema bearing a continuous plasma membrane (arrows), a non dilated endoplasmic reticulum cistern (ER) and nuclear envelope (arrowhead), and a swollen mitochondrion (M). Note the well preserved nucleolar substructures (NL). X 30.000.

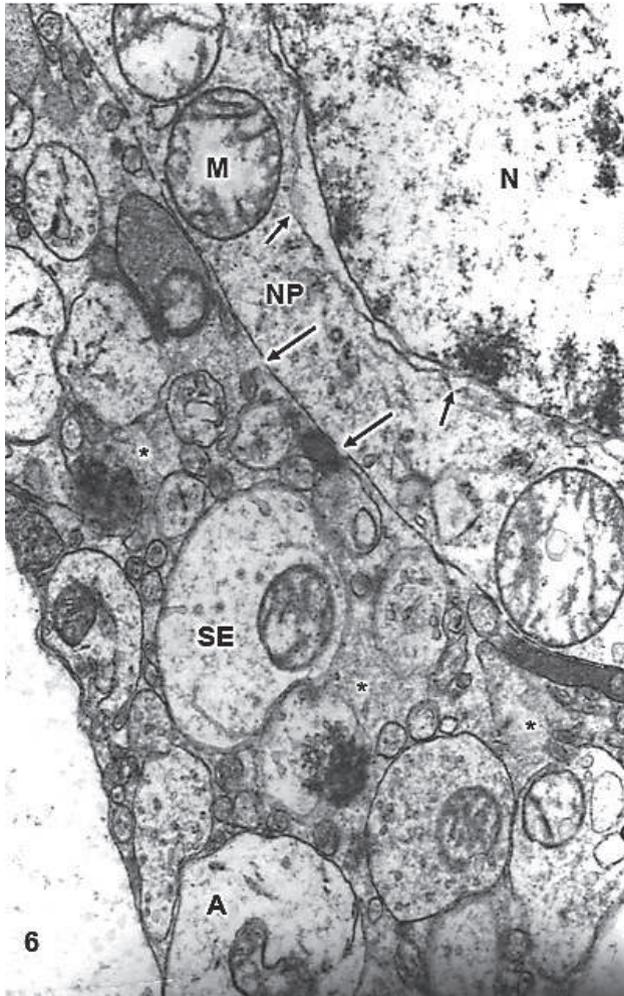


FIGURA 2. Brain trauma. Subdural hematoma. Left parietal cortex. Severe edema. Non-pyramidal neuron (NP) displaying disrupted plasma membrane (long arrows), irregularly dilated nuclear envelope (short arrows), and swollen mitochondria (M). In the neighboring neuropil, the asterisks label the enlarged extracellular space containing proteinaceous edema fluid, which separates degenerated synaptic endings (SE), and swollen astrocytic processes (A). Note the swollen nucleoplasm (N). X. 30.000.

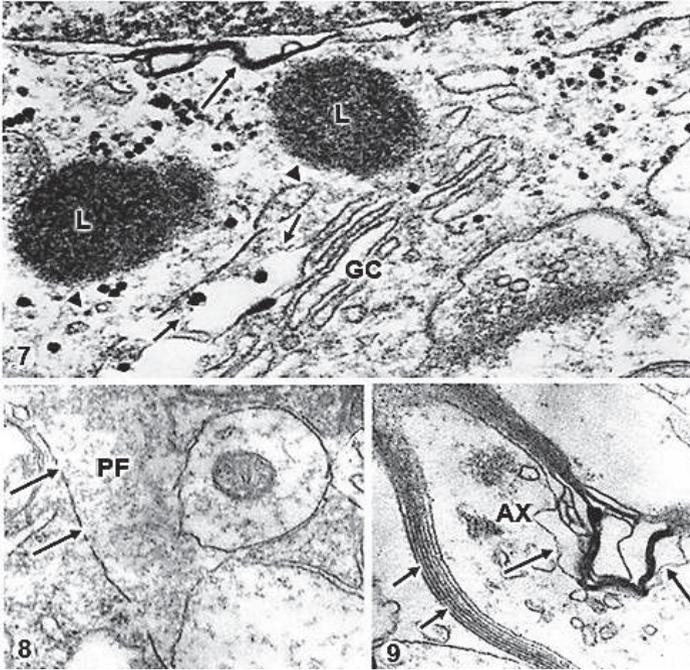


FIGURA 3. Brain trauma. Subdural hematoma. Right parietal cortex. Non-pyramidal neuron showing focal necrosis of nuclear envelope (long arrow) and of smooth Golgi complex (GC) membranes (short arrows). The lysosomes (L) show a discontinuous globular limiting membrane (arrowheads). X 75.000.

FIGURA 4. Severe frontal contusion. Left frontal cortex. Non-pyramidal neuron showing a high electron dense and fragmented plasma membrane (arrows) in contact with the proteinaceous edema fluid (PF) occupying the enlarged extracellular space. X 60.000.

FIGURA 5. Brain trauma. Right parieto-temporal hematoma. Right parietal cortex. Severely edematous neuropil showing a degenerated myelinated axon (AX). The myelin sheath lamellar arrangement appears disrupted and forming intramyelinic vacuoles (long arrows). Note the formation of axolemmal endocytic vesicles (arrowheads), and the apparently normal and compact arrangement of a segment of myelin sheath at the opposite side (short arrows). X 60.000.

The swollen and clear astrocytes display marked degenerative changes induced by brain edema in comparison with those exhibited by neurons. Areas of focal necrosis and fragmented limiting plasma membrane, over-distended rough endoplasmic reticulum cisterns with extended degranulated areas, and vacuoles of smooth endoplasmic reticulum with necrotic limiting membrane are found (Fig. 6).

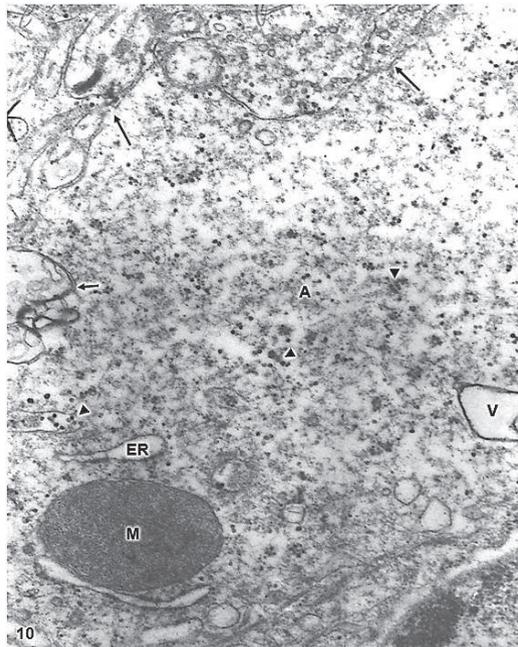


FIGURA 6. Brain trauma. Swollen and clear astrocyte cell (A) depicting fragmented plasma membrane (long arrows) and areas of focal necrosis (short arrow), degranulated and dilated rough endoplasmic reticulum cisterns (ER), glycogen granules (arrowheads), and a vacuole (V) limited by necrotic membrane. Note the degenerated and dense mitochondrion (M). X. 60.000.

Oligodendroglial cells also show marked edematous changes featured by lacunar enlargement of rough endoplasmic reticulum and nuclear envelope, detachment of membrane bound ribosomes, and discontinuous plasma membrane (Fig. 7).

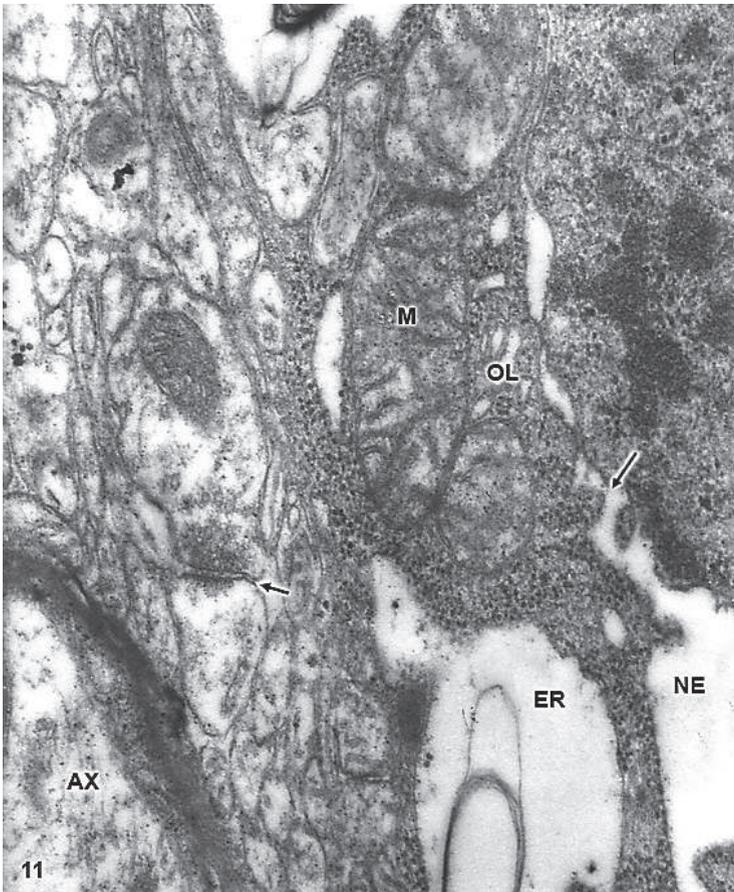


FIGURA 7. Brain trauma. Hydropic oligodendrocyte (OL) showing over-distended perinuclear (PN) and endoplasmic reticulum (ER) cisterns, disassembly of nuclear envelope (NE), and nuclear pores (long arrow). Note the swollen mitochondria (M). The neighboring neuropil exhibits degenerated axodendritic synapse (short arrow) and myelinated axon (AX). X 60.000.

In severe edematous regions of complicated traumatic brain injuries, synaptic disassembly occurs featured by wide separation of pre- and post synaptic membranes and lost of perisynaptic astrocytic glial ensheathment (Fig. 8).



FIGURA 8. Brain trauma. Subdural hematoma. Left parietal cortex. Severely edematous neuropil showing synaptic disassembly and disappearance of pre- and postsynaptic densities (long arrow) of an axospinodendritic contact. The short arrow labels another spine synapse exhibiting partial vestiges of the postsynaptic density, and irregular profile of presynaptic membrane (arrowhead). Note the expansion of extracellular space (asterisks), and the detachment of perisynaptic astrocytic cytoplasm (A). X. 60.000.

2. The damage of interastrocytary gap junctions

In severe traumatic brain injuries, astrocytic gap junction disruption and disassembly are observed. Gap junction disassembly is characterized by wide separation of astrocytic end- feet confronted membranes (Fig. 9).

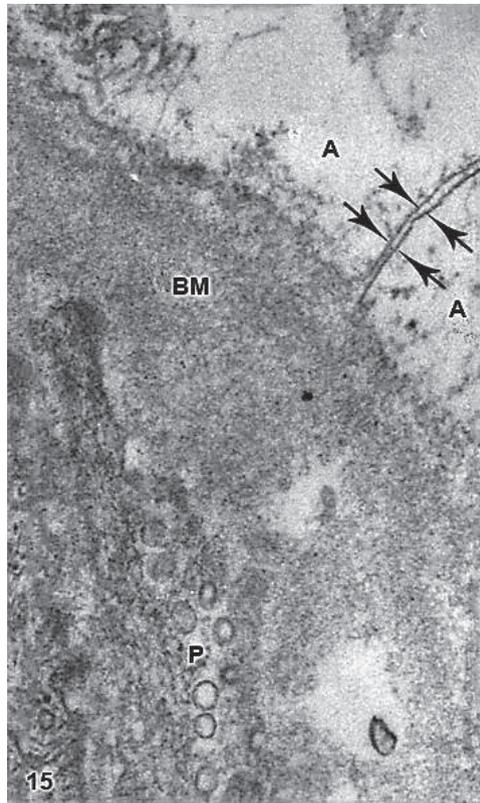


FIGURA. 9. Brain trauma. Subdural parieto-temporal hematoma. Left parietal cortex. Severe edematous region showing disassembly of interastrocytic gap junctions featured by wide separation of confronted astrocytic (A). end-feet membranes (arrows) Note the swollen and vacuolated basement membrane (BM), and the increased vesicular transport in the pericytal cytoplasm (P). X 90.000.

3.The changes of endothelial cell luminal membrane of cerebral capillaries

In severe and complicated traumatic brain injuries, the endothelial cell luminal membrane of brain capillaries undergo profound

activity changes that characterize the increased cerebrovascular permeability. Such changes are increased formation of micro- and macropinocytotic vesicles and clathrin-coated vesicles, deep invaginations and formation of incomplete transendothelia channels, and emission of pseudopods to form endothelial vacuoles (Fig.10).

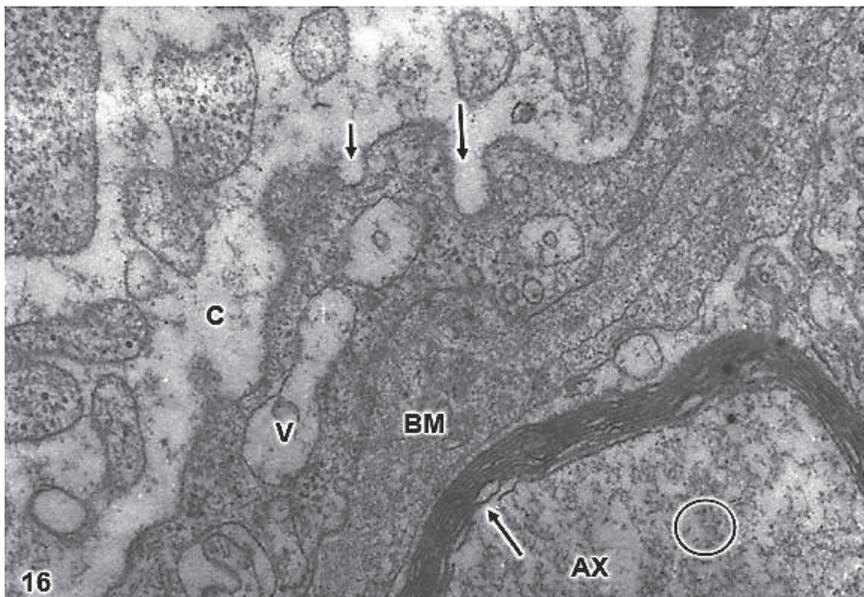


FIGURA 10. Brain trauma. Right epidural hematoma. Right temporal cortex. Capillary (C) showing the increased activity of endothelial cell luminal membrane, which exhibits the formation of pinocytotic vesicle (short arrow), deep invagination (long arrow), and formation of endothelial vacuoles (V). Note the swollen basement membrane (BM), and the degenerated myelinated axons (AX) in the neighboring neuropil. The arrow indicates the disrupted axolemmal membrane, and the circle the granular degeneration of neurofilaments. X 36.000.

4. Discussion

The present paper reports the fragmentation of nerve cell plasma membrane, enlargement and degranulation of rough endoplasmic reticulum, fragmentation of Golgi complex membranes, disassembly of nuclear envelope, damage of myelin sheath membranes, and synaptic disassembly.

Traumatic damage of axolemmal membrane was earlier reported by Castejón (1985), Genarelli et al. (1993), Erb and Povlishock (1998), and Maxwell et al. (1999). Singleton and Povlishock (2004). More recently Farkas et al. (2006) and Castejón (2008) also demonstrated disruption of neuronal somatic plasmalemma in diffuse traumatic brain injury, and in severe and complicated traumatic brain injuries.

4.1. Endoplasmic reticulum dysfunction

The endoplasmic reticulum is a subcellular compartment playing a fundamental role in the folding and processing of newly synthesized membranes and secretory processes, reactions which are strictly calcium/dependent (Lodish and Kong, 1990). Severe disruption of neuronal Ca^{2+} homeostasis leading to a lethal Ca^{2+} overload as occurs in brain ischemia, can initiate a cascade of destructive processes which lead to the death of neurons during cerebral ischemia (Morley et al., 1999; Paschen, 2000). Endoplasmic reticulum function is disturbed in many acute and chronic diseases of the brain, such as Parkinson's and Alzheimer's diseases (Paschen and Frandsen, 2001). Therefore endoplasmic reticulum dysfunction is basically important to elucidate the pathogenetic mechanisms of neurodegeneration.

4.2. Biochemical and molecular basis of nerve cell plasma membrane damage

Peroxidative stress has been implicated in mechanism leading to neuronal cell injury (Evans, 1993; Choi, 1993; Paschen et al., 2001;

Boldyrev et al., 2000). One source of free radicals in ischemic cells is arachidonic acid released by membrane phospholipids under the action of Ca^{2+} -activated phospholipase A_2 (Keuhl and Egan, 1980). Several oxygen radical species besides superoxide radicals are produced following hypoxia. Superoxide radicals have been shown to change phospholipid and protein structure. Hydroxyl radicals are the most reactive and are known to initiate lipid peroxidation and protein oxidation (Ginsberg et al., 1988; Siesjo et al., 1989; Traystman et al., 1991; Spuler et al., 1996; Wilberger, 1996). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids damages cell membranes and disrupts transmembrane ionic gradients. The products of lipid peroxidation are aldehydes, hydrocarbon gases, and other metabolites that cause cytotoxic and vasogenic oedema, as observed in our electron micrographs. Iron derived from hemoglobin of intraparenchymatous hemorrhages can serve as a catalyst for free radical mediated oxidation leading to enhanced secondary tissue damage (Wilberger, 1996).

Marked alterations of phospholipids structures of different cell membranes have been observed in experimental models during acute or subacute cerebral aggression. Tissue surrounding haematomas, traumatic lesions, infective zones and certain tumors undergo autocatalytic peroxidation, which attacks fatty acid chains that include double bonds (Cohadon, 1984).

Alterations of astrocytic gap junctions have been widely reported in a variety of experimental conditions. According to Hossain et al. (1994), rat astrocytes respond to ischemic insult by reorganizing their gap junction, and increasing the junctional protein connexin 43. Ochalski et al. (1995) reported extensive gap junctions, disruption and gap junction disassembly in kainic lesion sites of rat brain. Theriault et al. (1997) described gap junction remodeling in rat spinal cord after acute compression injury. Li et al. (1998) found astrocytic gap junction internalization in rat brain after cerebral focal ischemia. Soroceanu et al. (2001) reported that high-grade brain

tumors show reduced intercellular communication, and a decrease in connexin-43 protein levels. Aronica et al. (2001) found high expression of connexin proteins in low grade tumors, and in the peritumoral reactive astrocytes. Nakase et al. (2003 a,b) reported a protective role of astrocytic gap junctions in ischemic stroke reducing apoptosis and inflammation following ischemic insult. According to Perez- Velazquez et al. (2006), the actions of gap junctional coupling during injuries may be causally related to oxidative stress.

In the mammalian CNS, excessive release of glutamate and overactivation of glutamate receptors are responsible for the secondary (delayed) neuronal death following neuronal injury, including ischemia, traumatic brain injury (TBI), and epilepsy. The coupling of neurons by gap junctions (electrical synapses) increases during neuronal injury. These Authors reported that the ischemic increase in neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate via group II metabotropic glutamate receptors (mGluRs). (Cullen et al., 2012).

Concluding Remarks

In moderate brain edema a continuous plasma membrane is observed in some neurons, but the cytoplasmic membranes, such as smooth and rough endoplasmic reticulum membranes appear damaged. In severe edema, fragmentation of plasma membrane, enlargement and focal necrosis of rough endoplasmic cisterns and nuclear envelope, detachment of membrane-bound ribosomes, and reduction of polysomes are found. Shallow and deep invaginations of plasma membrane, and the formation of endocytic and clathrin-coated vesicles are seen. In astrocyte cells, areas of focal necrosis and fragmented limiting plasma membrane, overdistended rough endoplasmic reticulum cisterns with extense degranulated membrane domains, and vacuoles of smooth endoplasmic reticulum with necrotic limiting membrane are observed. Oligodendroglial

cells show also notably edematous changes featured by lacunar enlargement of rough endoplasmic reticulum and nuclear envelope, detachment of membrane bound ribosomes, and discontinuous plasma membrane. Plastic changes and damage of synaptic membranes are found. Synaptic vesicle exocytosis at the synaptic active zone, and endocytosis at the non specialized regions of presynaptic ending limiting membrane are frequently observed at activated synapses. In severe brain edema, synaptic disassembly occurs featured by wide separation of pre- and post synaptic membranes, and lost of perisynaptic astrocytic glial ensheathment. Disruption, fusion and disassembly of interastrocytary gap junctions have also been observed. The endothelial cell luminal membrane of brain capillaries shows profound activity changes that characterize increased cerebrovascular permeability, such as increased formation of micro- and macropinocytotic vesicles, deep invaginations, clathrin coated vesicles, and emission of pseudopods to form endothelial vacuoles.

The alterations of nerve cell plasma membranes and cytomembranes are related with the anoxic-ischemic conditions of brain parenchyma. The role of free radical and lipid peroxidation, disturbed energy metabolism, altered metabolic cascades, glutamate excitotoxicity, hemoglobin toxicity, protein aggregation, and presence of extracellular edema fluid are discussed in relation with the derangement of nerve cells membranes.

References

- Aronica, E., Gorter, J.A., Jansen, G.H., Leenstra, S., Yankava, B., Troost D. (2001). Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. *Acta Neuropathol.*, 101,449-459.

- Boldyrev, A., Song, R., Dyatlov, V.A., Lawrence, D.A., Carpenter, D.O. (2000). Neuronal cell death and reactive oxygen species. *Cell Mol. Neurobiol.*, 20, 433-450.
- Braugher, J.M., Duncan, L.A, Chase RL (1985). Interaction of lipid peroxidation and calcium in the patogénesis of neuronal injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2, 269-28.
- Castejón, O.J. (1985). Electron microscopic study of central axonal degeneration in traumatic human brain edema. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17, 703-718.
- Castejón, O.J. (1998.) Morphological astrocytic changes in complicated human brain trauma. A light and electron microscopy study. *Brain Injury*, 12, 409-427.
- Castejón, O.J., Valero, C., Diaz, M. (1995). Synaptic degenerative changes in human traumatic brain edema. An electron microscopic study of cerebral cortical biopsies. *J. Neurosurg. Sci.*, 39, 47-65.
- Castejón, O.J., Castejón, O.J., Castejón H.V. (2000). Oligodendroglial cell behaviour in traumatic oedematous human cerebral cortex: a light and electron microscopic study. *Brain Injury*, 14, 303-317.
- Castejón, O.J., Castejón, O.J., H.V., Diaz, M., Castellano, A. (2001). Consecutive light microscopy, scanning-transmission electron microscopy and transmission electron microscopy of traumatic human brain oedema and ischaemic brain damage. *Histol. Histopathol.*, 16, 1117-1134.
- Castejón, O.J., Castejón, H.V., Zavala, M., Sanchez, M.E., Diaz, M. (2002). A light and electron microscopic study of oedematous human cerebral cortex in two patients with post-traumatic

seizures. *Brain Injury*, 16, 331-346.

Castejón OJ, Acurero G. (2004). Traumatic axolemmal and cytoskeletal derangement in myelinated axons of human oedematous cerebral cortex and loss of consciousness. An electron microscopic study using cortical biopsies. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 36, 285-293.

Castejón, O.J., Castejón HV. (2004). Structural patterns of injured mitochondria in human oedematous cerebral cortex. *Brain Injury*, 18, 1107-1126.

Castejón O.J. (2004). Lysosome abnormalities and lipofuscin content of nerve cells of oedematous human cerebral cortex. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36, 263-271.

Castejón, O.J., Arismendi, G.J. (2004). Nerve cell nuclear and nucleolar abnormalities in the human oedematous cerebral cortex. An electron microscopic study using cortical biopsies. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36, 273-283.

Castejón, O.J. (2008). Electron Microscopy of Human Brain Edema. *Astrodata*. Maracaibo. pp17-34.

Choi, B.H. (1993). Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. *Yonsei Med. J.*, 34, 1-10.

Cohadon, F. (1984). Cell membrane alterations during situations of acute stress to the cerebral parenchyma. Mechanisms, consequences and therapeutic perspectives. *Neurochirurgie*, 30, 69-83.

Cohadon, F., Rigonlet, M., Averet, N., Alligoni, E. (1989). Membrane damage in acute brain trauma. *Italian J. Neurol. Sci.*, 10, 147-155.

- Cullen DK, Vernekar VN, LaPlaca MC. (2011). Trauma-induced plasmalemma disruptions in three-dimensional neural cultures are dependent on strain modality and rate. *J Neurotrauma*, 28, 2219-2233.
- Engels, D.C., Siemmer, J.E., Vlug A.S., Maas, A.I., Weber, J.T. (2005). Combined effects of mechanical and ischemic injury to cortical cells: secondary ischemia increases damage and decreases effects of neuroprotective agents. *Neuropharmacology*, 49, 985-995.
- Doutheil, J., Althausen, S., Treiman, M., Paschen, W. (2000). Effect of nitric oxide on endoplasmic reticulum calcium homeostasis, protein synthesis and energy metabolism. *Cell Calcium*, 27, 107-115.
- Evans, P.H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Med. Bull.* 49 (Suppl 3), 577-587.
- Erb, D.E., Povlishock, J.T. (1988). Axonal damage in severe traumatic brain injury: an experimental study in cat. *Acta Neuropathol.* (Berl.), 76, 347-358.
- Farkas O., Lifschitz J., Povlishock J.T. (2006). Mechanoporation induced by diffuse traumatic brain injury: an irreversible or reversible response to injury? *J. Neurosci.* 26, 3130-3140.
- Gennarelli, T.A., Thibault, L.E., Adams, H., Graham, D.I., Thompson, C.J., Marcincin, R.P. (1985). Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. In Dacey, R.G., Winn, H.R., Rimel, R.W., & Jane, J.A. (Eds.), *Trauma of the Central Nervous System* (pp. 169-193). New York: Raven Press.

- Gennarelli, T.A. (1993). Mechanisms of brain injury. (1993). *Emergency Med.*, 1, 5-11.
- Ginsberg, M.D., Watson, B.D., Busto, R. (1988). Peroxidative damage to cell membranes following cerebral ischemia. A cause of ischemia brain injury. *Neurochem. Pathol.*, 9, 171-173.
- Haik, S., Peyrin, J.M., Lins, L., Rosseneu, M.Y., Brasseurs, R., Langeveld, J.P., Tagliavinio, F., Deslys, J.P., Lasmezas, C., Dormont, D. (2000). Neurotoxicity of the putative transmembrane domain of the prion protein. *Neurobiol. Dis.*, 7, 646-656.
- Harris JL, Yeh HW, Choi IY, Lee P, Berman NE, Swerdlow RH, Craciunas SC, Brooks WM. (2012). Altered neurochemical profile after traumatic brain injury: (1)H-MRS biomarkers of pathological mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Aug 15. doi: 10.1038/jcbfm.2012.114. [Epub ahead of print]
- Hayashi, T., Abe, K. (2004). Ischemic neuronal cell death and organelle damage. *Neurol. Res.* 26, 827-834.
- Homayoun, P., Rodriguez, De Turco, E.B., Parkins, N.E., Lane D.C., Soblosky, J., Crey, J., Bazan, N.G. (1997). Delayed phospholipid degradation in rat brain after traumatic brain injury. *J. Neurochem.*, 69, 199-205.
- Hossain, M.Z., Peeling, J., Sutherland, R., Hertzberg E.L., Nagy J.I. (1994). Ischemia-induced cellular redistribution of the astrocytic gap junctional protein connexin43 in rat brain. *Brain Res.*, 652:311-322.
- Hu, B.R., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Liu, C.L. (2000). Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.*, 20, 3191-3199.

- Keuhl, F.A., Egans, R.N. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid., and inflammation. *Science*, 210, 978-984.
- Kurnellas, M.P., Nicot, A., Shull, G.E., Elkabes, S. (2005). Plasma membrane calcium ATPase deficiency causes neuronal pathology in the spinal cord: a potential mechanism for neurodegeneration in multiple sclerosis and spinal cord injury. *Faseb J.* 19, 298-300.
- La Placa, M.C., Thivault, L.E. (1998) Dynamic mechanical deformation of neurons triggers an acute calcium response and cell injury involving the N-methyl-D- aspartate glutamate receptor. *J. Neurosci. Res.* 52, 220-229.
- Li W.E., Ochalski P.A., Hertzberg E.L., Nagy J.I. (1998). Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. *Eur. J. Neurosci.*, 10:2444-2463.
- Lodish, H.F., Kong, N. (1990). Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 265, 10893-10899.
- Luo, J., Shi, R. (2004). Acrolein induces axolemmal disruption, oxidative stress, and mitochondrial impairment in spinal cord tissue. *Neurochem. Int.* 44, 475-486.
- Maxwell W.L., Kansagra A.M., Graham D.I., Dams J.H., Gennarelli T.A.(1988). Freeze-fracture studies of reactive myelinated nerve fibres after diffuse axonal injury. *Acta Neuropathol.*, 76, 395-406.
- Mengesdorf, T, Proud, C.G., Mies, G., Paschen, W. (2002). Mechanisms underlying suppression of protein synthesis induced by transient focal cerebral ischemia in mouse brain. *Exp. Neurol.*, 177, 538-546.

- Morley, P., Tauskela, J.S., Hakim, A.M. (1999). Calcium Overload. In W. Walz (Ed.), *Cerebral Ischemia*, (pp. 69-104). New Jersey: Humana Press.
- Ochalski P.A., Sawchuk M.A., Hertzberg E.L., Nagy J.I., 1995. Astrocytic gap junction removal, connexin-3 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia*, 14:279-294.
- Nakase T., Fushiki S., Naus C.C. (2003a). Astrocytic gap junctions composed of connexin 43 reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. *Stroke*, 34, 1987-1993.
- Nakase T., Fushiki s., Sohl G., Theis M., Willecke K., Naus C.C. (2003b). Neuroprotective role of astrocytic gap junctions in ischemic stroke. *Cell Commun. Adhes.* 10, 413-417.
- Paschen, W. (1996). Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 56, 313-322.
- Paschen, W., Doutheil J. (1999). Disturbance of endoplasmic reticulum functions: A key mechanism underlying cell damage? In Baethmann, A., Glesnila, N., Ringel, F., Eriskat, J (Eds.) *Current Progress in the Understanding of Secondary Brain Damage from trauma and Ischemia*. (pp1-5). *Acta Neurochirug. (Supplement.)* 73; Wien: Springer.
- Paschen, W. (2000). Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res. Bull.*, 53, 409-413.
- Paschen, W. Frandsen A. (2001). Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J. Neurochem.*, 79, 719-725.

- Paschen, W., Mengesdorf, T., Althausen, S., Hotop, S. (2001). Peroxidative stress selectively down-regulates the neuronal stress response activated under conditions of endoplasmic reticulum dysfunction. *J. Neurochem.*, 76, 1916-1924.
- Paschen, W. (2003). Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* 34, 365-383.
- Patts, S., Brodhum, M. (1999). Neuropathological sequelae of traumatic brain injury in the brain. An overview. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 51: 119-123.
- Perez Velazquez, J.L., Kokarovtseva, L., Sarbazih, R., Jeyapalan Z., Leshchenko Y., (2006). Role of gap junctional coupling in astrocytic net works in the determination of global ischaemia-induced oxidative stress and hippocampal damage. *Eur. J. Neurosci.*, 23:1-10. 29.
- Povlishock, J.T. (1986). Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. *Acta Neuropathol.*, (Berl) 70, 53-59.
- Povlishock, J.T. (1992a). Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. *Brain Pathol.*, 2, 1-12.
- Povlishock, J.T. (1992b). Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. *Journal of Neurotrauma*, 11, 173-186.
- Saatman, K.E., Bozyczko-Coyne, D., Marcy, V., Siman, R., McIntosh, T.K. (1996). Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.*, 55, 850-860.

- Saatman, K.E., Abai, B., Grosvenor, A., Vorwerk, C.K., Smith, D.H., & Meaney, D.F. (2003). Traumatic axonal injury results in biphasic calpain activation and retrograde transport impairment in mice. *J. Cerebral Blood Flow Metab.* 23, 34-42.
- Sharma, H.S., Miclescu, A., Wiklund, L. (2011). Cardiac arrest-induced regional blood-brain barrier breakdown, edema formation and brain pathology: a light and electron microscopic study on a new model for neurodegeneration and neuroprotection in porcine brain. *J. Neural Transm.* 118, 87-114
- Shi R (2004). The dynamics of axolemmal disruption in guinea pig spinal cord following compression. *J Neurocytol* 33, 203-211.
- Singleton, R.H., Zhu, J., Stone, J.R., Povlishock J.T. (2002). Traumatically induced axotomy adjacent to the soma does not result in acute neuronal death. *J. Neurosci.*, 22, 701-802.
- Singleton, R.H., Povlishock. J.T. (2004). Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. *J. Neurosci.* 24, 3543-3553.
- Siesjo, B.K., Gar, C.D., & Bengtson, F. (1989). Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1, 165-171.
- Sokka, A. L., Putkonen, N., Mudo, G., Pryaznikov, E. Reijonen, S. Khiroug, L., Belluardo N., Lindjelm, D., Korhonen, L. (2007). Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J. Neurosci.* 24, 901-908.
- Soroceanu, L., Manning, T.J. Jr., Sontheimer H. (2001). Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia*, 33, 107-117.

- Spuler, A., Tan, W.K.M., Mayer, F.B. (1996). Molecular events in cerebral ischemia. In Raffel, C., Hars G.R. (Eds.), *The Molecular Basis of Neurosurgical Disease* (pp. 248-269). Baltimore: William and Wilkins.
- Sponne, I., Fifre, A., Koziel, V., Oster, T., Olivier, J.L., Pillot, T. (2004). Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB J.* 18, 836-838.
- Tang, Y., Wu, P, Su, J., Xiang, J., Cai, D., Dong, Q. (2010). Effects of Aquaporin-4 on edema formation following intracerebral hemorrhage. *Exp. Neurol.*, 223, 485-495.
- Theriault E-, Frankenstein U.N., Hertzberg E.L., Nagy J.I. (1997). Connexin43 and astrocytic gap junctions in the rat spinal cord after acute compression injury. *J. Comp. Neurol.*, 382, 199-214.
- Thompson, R.J., Zhou, N., and MacVicar, B.A. (2006). Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, 924-927.
- Traystman, R.J., Kirsch, J.R., Koehler, R.C. (1991). Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.*, 71, 1185-1195.
- Verdier, Y., Zarandi, M., Penke, B. (2004). Amyloid beta-peptide interactions with neuronal interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J. Pept. Sci.* 10, 229-248.
- Wang Y, Song JH, Denisova JV, Park WM, Fontes JD, Belousov AB. (2012)

Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury. *J Neurosci.*, 32,713-725.

Wilberger, J., (1996). Molecular basis of head injury. In C. Raffel & G.R. Hars (Eds.), *The Molecular Basis of Neurosurgical Disease*. (pp. 296-03). Baltimore: William and Wilkins.

Yamaguchi, H., Maat-Schieman, M.L., van Duinen, S.G., Prins E.A., Neeskens P., Natta R., Roos R.A., (2000). Amyloid beta protein (A β) starts to deposit as plasma membrane-bound form in diffuse plaques of brains from hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type, Alzheimer disease and nondemented aged subjects. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60,105-106.

Yi, H.H., Hoover, R., McIntosh, T., Hazell, A.S. (2006). Early, transient increase in complexin I and complexin II in the cerebral cortex following traumatic brain injury is attenuated by N-acetylcysteine. *J. Neurotrauma*, 23, 86-96.

Estado de Salud periodontal y necesidad de tratamiento de una población escolar

Yrma Santana Pérez¹
Ivette Suárez Gómez²
Alexis Morón Borjas³
Mary Rincón Fernández⁴
Roberto García López⁵
Sirio Piletti Rincón⁶

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la condición de salud periodontal y necesidad de tratamiento de los niños y adolescentes del municipio Baralt. La muestra fue de 1.010

¹Profesora Titular. Instituto de Investigaciones. Área: Epidemiología y Práctica Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia. sanper67@yahoo.com

²Profesora Titular. Escuela de Odontología. Departamento de Rehabilitación Bucal. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia. ivettesuarez07@gmail.com.

³Profesora Titular. Instituto de Investigaciones. Área: Epidemiología y Práctica Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia. almoronb@gmail.com

⁴Profesora Titular. Escuela de Odontología. Departamento de Rehabilitación Bucal. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia. mcrinconf@yahoo.com.

⁵Profesor Titular. División de Estudios para Graduados. Programa de Postgrado: Odontopediatria. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia. robertogarcia20@hotmail.com.

⁶Estudiante de la Escuela de Odontología. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia. siriopiletti@gmail.com.

escolares. Se realizó una evaluación clínica y se aplicó el índice periodontal de la comunidad (OMS, 1997) y una encuesta socioeconómica al responsable del hogar. El diseño fue no experimental, transversal, prospectivo. Los resultados evidenciaron que el 65,5% de la muestra presentaban una condición periodontal sana. El mayor sangramiento gingival lo reflejaron las del género femenino (22.6%). Se concluye que la mayoría la población estudiada, presentan condiciones periodontales favorables y la necesidad de tratamiento esta relacionado con el mejoramiento de su higiene bucal.

PALABRAS CLAVE: salud periodontal, tratamiento, niños, adolescentes

Periodontal health status and treatment needs of a student population

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the periodontal health status and treatment needs of children and adolescents in the municipality Baralt. The sample was of 1,010 school children. We conducted a clinical evaluation where the community periodontal index (WHO, 1997) was applied and a socio-economic survey to the head of household. The design was not experimental, transversal, and prospective. The results showed that 65.5% of the sample had a healthy periodontal condition. The more reflected of the gingival bleeding were female (22.6%). We conclude that most study population, presented favorable periodontal conditions and the need for treatment is related to the improvement of their oral hygiene.

KEYWORDS: health periodontal, treatment, children, adolescents

Introducción

La investigación odontológica vista desde la perspectiva colectiva, busca conocer las condiciones de salud bucal de la población bajo un pensamiento crítico, histórico, integral, holístico, multidisciplinario, multisocietario, pluriétnico y multisectorial, respetando la diversidad cultural, el quehacer y las costumbres de los pueblos, para ofrecer respuestas y alternativas confiables con valor académico – científico, que generen cambios y transformaciones, que permitan fortalecer la práctica odontológica en sus componentes producción de conocimiento, talento humano y servicio, con el fin último de incrementar los niveles de salud y contribuir en el mejoramiento del modo y la calidad de vida de la mayoría de las personas.

Partiendo de esta premisa, se puede entender que las condiciones periodontales de los grupos humanos se encuentran determinadas por una serie de elementos culturales, económicos, geográficos, educativos, étnicos, laborales, sociales, demográficos, prácticas, hábitos y particularidades socio – históricas entre otros, que intervienen de forma favorable o desfavorable y que tienen relación con la presencia de la salud y/o la enfermedad periodontal.

En este orden de ideas es necesario mencionar, que una vez iniciada la alteración de los tejidos periodontales sin la atención oportuna, pudiera llegar a estadios más avanzados trayendo como consecuencia la destrucción ósea y la pérdida dentaria. Algunos estudios han afirmado que la periodontitis puede aparecer en edades tempranas, pudiendo alcanzar daños considerables en corto tiempo. Así pues, ante la aparición de una alteración periodontal en niños y adolescentes, es fundamental la prevención, el diagnóstico y el tratamiento oportuno para coadyuvar la cronicidad de la morbilidad en los adultos, tal como lo refiere (Oh et al, 2002), este planteamiento fue reafirmado por la Organización Mundial de la Salud (2004), pudiendo conllevar a la pérdida de los dientes en forma prematura (Esquivel et al, 2007).

Más aún, investigaciones realizadas en población escolar por la Sociedad de Periodontología publicados en la *Research Science and Therapy Comité of the American of Periodontology*, reportó que la prevalencia de gingivitis en niños en edad escolar en E.E.U.U está en un rango de 40% a 60%. Así mismo, (Colina et al, 2007), reflejó en su estudio realizado en una población de 12 años en Cienfuegos (Cuba) que la enfermedad periodontal, fue más frecuente en los niños que en las niñas con un 54,9% y 30,8% respectivamente y que el 80,9% de los segmentos se encuentran sanos y en los afectados, el cálculo predominó en un 11,7%.

En Venezuela el tercer estudio nacional realizado por (Morón et al, 2008), reportó que el 69.3% de los niños y adolescentes en edades comprendidas de 5 a 14 años presentaban una condición periodontal sana.

Sintetizando, la morbilidad periodontal en edades escolares pre-dispone la presencia de la misma en adultos, lo cual amerita realizar estudios para contar con datos susceptibles de proyectar a la población y así poder realizar acciones preventivas. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue conocer la condición de salud periodontal y la necesidad de tratamiento de los niños y adolescentes del municipio Baralt – estado Zulia.

1. Materiales y Métodos

Se realizó un estudio epidemiológico, con un diseño no experimental de tipo transversal sobre una muestra aleatoria simple, representativa del total de la población estudiada. La muestra estuvo conformada por 1.010 niños y adolescentes escolarizados de las parroquias San Timoteo, Rafael Urdaneta y Libertador del municipio Baralt – estado Zulia, en edades comprendidas de 5 a 15 años y de ambos géneros. Se utilizaron métodos directos de observación. Para la recolección de la información se aplicó una encuesta socioeconómica y se realizó la evaluación clínica a todos los niños y adolescentes seleccionados.

Se realizó entrenamiento y calibración de los examinadores clínicos y encuestadores sociales durante una semana, tiempo en el cual se determinó los niveles de aceptación de los índices y el coeficiente de concordancia intra e ínter examinador, siendo 98 y 96 % respectivamente.

La encuesta socioeconómica se realizó al responsable del hogar de los niños y adolescentes participantes en el estudio y contempló aspectos relacionados con la ubicación geográfica y características socioeconómicas. Para la aplicación de la encuesta y la evaluación bucal se solicitó el consentimiento informado a los participantes después de explicarles el propósito del estudio el cual se elaboró de acuerdo a los principios éticos establecidos en el tratado de Helsinki, 2000.

Para la evaluación bucal se cumplieron los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1997) y se utilizó para el examen clínico la sonda periodontal de la OMS y un espejo bucal plano N° 5. El índice que se utilizó para medir las condiciones periodontales fue el periodontal de la comunidad (IPC), que se registra a través de los siguientes códigos y criterios: 0= tejido periodontal sano, 1= presencia de sangrado al sondaje 2= presencia de cálculo dental supragingival /subgingival.

Para la evaluación clínica se realizó el registro por sextantes a saber: 17-14, 13-23, 24 – 27, 37-34, 33-43 y 44-47, que determinó los hallazgos de dientes índices específicos: 16, 11, 26. 46, 31, 36, recomendados para diagnosticar las condiciones periodontales de la población de 15 años y menos edad, con el fin de evitar el registro de alteraciones asociadas al proceso de exfoliación y erupción dentaria. Es necesario señalar que solo fueron considerados las categorías sano, sangramiento y cálculos.

Para el procesamiento y análisis de la información se utilizó el programa estadístico SPSS donde se aplicó la estadística descriptiva. Así mismo se realizaron las pruebas de significancia correspondien-

tes para conocer el nivel de confianza de los datos y/o resultados de la investigación.

TABLA 1. Caracterización de la muestra según edad y género

Características	Número de individuos	%
Edad		
5-6	112	11.1
7-8	299	29.6
9-10	280	27.7
11-12	227	22.5
13-14	89	8.8
15	3	0.3
Género		
Masculino	468	46.3
Femenino	542	53.7

En cuanto a las características socioeconómicas se puede observar en la tabla 2 que el 43.6% de los responsables del hogar presentan educación básica y el 22.3% educación media. Sólo un 8.4% tiene educación universitaria. El ingreso mensual del 73.7% es de uno o menos de un salario mínimo. El 45.3% no trabaja en este momento y el 84.6% manifestó que la vivienda donde habitan es tipo casa.

TABLA 2. Características socioeconómicas del grupo familiar de niños y adolescentes del municipio Baralt

Características	Número de individuos	%
Nivel de instrucción del responsable principal del sostén del hogar		
Universitaria	85	8.4
Diversificada y profesional	46	4.6
Media	225	22.3
Básica	440	43.6
Alfabeta	141	14.0
No respondió	73	7.2
Ingreso mensual según salario mínimo		
Menos de uno	401	39.7
Uno	343	34.0
Dos	53	5.2
Menos de dos	4	0.4
Tres	18	1.8
Menos de tres	6	0.6
Cuatro a más	2	0.2
No respondió	183	18.1
Situación laboral del responsable principal del sostén del hogar		
Trabajando	503	49.8
Sin Trabajar	458	45.3
No respondió	49	4.9
Tipo de vivienda		
Quinta	4	0.4
Casa	854	84.6
Rancho	102	10.1
Otro tipo	21	2.1
No respondió	29	2.9

FI: Instrumento epidemiológico (P < 0.05)

El gráfico 1 muestra que el 65.5% de la población estudiada presentó condición periodontal sana. Observándose que un 14.7% presentó cálculo dental y un 19.8% presencia de sangrado al sondaje.

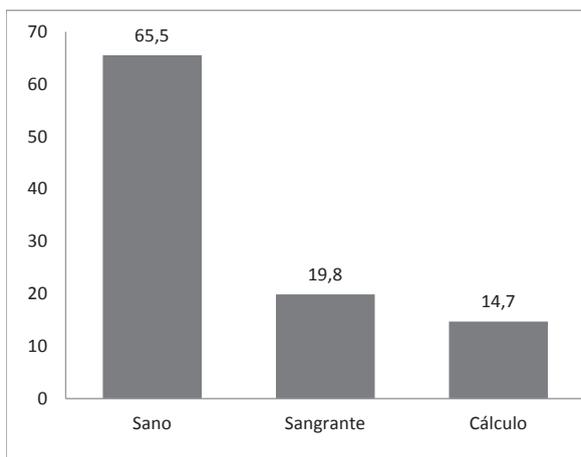


GRÁFICO 1

La tabla N° 3 refleja que entre las edades de 7 a 12 años presentan cálculo dental incrementando a medida que avanza en edad. Que los niños y adolescentes del género masculino en mayor proporción tienen sus tejidos periodontales sanos (72.7%) que el femenino (64.9%). Igualmente se observa que las niñas tienen mayor presencia de cálculo que los varones con un 13.7% y 5.9% respectivamente. También se evidencia que el sextante 2 y 5, es decir los sextantes anteriores superior e inferior son los que presentan la mejor condición periodontal (77.9 y 74.6%).

TABLA 3. Estado periodontal de niños y adolescentes del municipio Baralt

Característica	Sano	Sangrante	Cálculo	Total
Edad				
5	66.7	33.3	0.0	3
6	88.9	3,7	7.4	27
7	76.1	21.7	2.2	46
8	59.3	29.6	11.1	54
9	54.0	24.0	22.0	50
10	48.7	28.2	23.1	39
11	72.1	11.6	16.3	43
12	71.4	17.9	10.7	28
13	75.0	0.0	25.0	12
14	100	0.0	0.0	2
15	0.0	0.0	100	3
Prevalencia	65.5	19.8	14.7	307
Género				
Masculino	69.1	16.5	14.4	139
Femenino	62.5	22.6	14.9	168
Dientes índices/ sextantes				
16 (1)	68.4	20.2	9.8	307
11 (2)	77.9	16.9	1.6	307
26 (3)	70.0	17.3	11.1	307
36 (4)	71.0	19.5	7.2	307
41 (5)	74.6	18.6	4.2	307
46 (6)	73.0	17.9	7.2	307

FI: Instrumento epidemiológico OMS. Chi cuadrado de Pearson: (P < 0.05)

El gráfico 2 muestra que entre el 68.4 al 77.9% de los niños y adolescentes estudiados no necesitan tratamiento periodontal en ninguno de los 6 sextantes y la proporción afectada requieren como tratamiento la mejora de la higiene bucal.

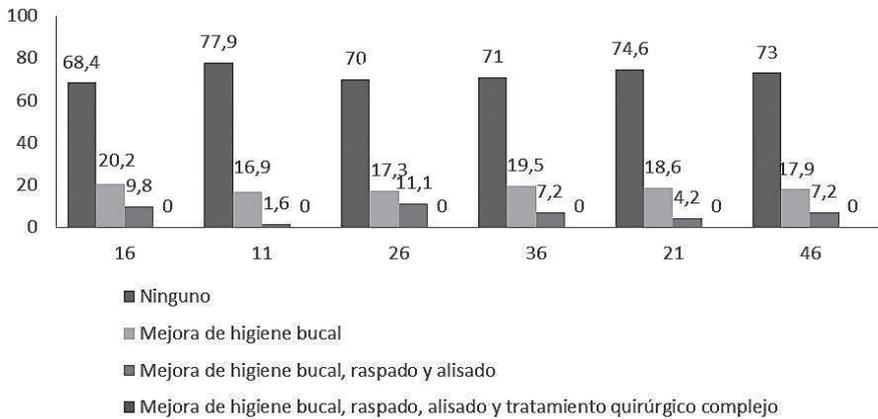


GRÁFICO 2. Necesidad de tratamiento periodontal de niños y adolescentes del municipio Baralt

3. Discusión de los resultados

La Enfermedad Periodontal es la segunda morbilidad bucal mas frecuente después de la caries dental, convirtiéndose en un problema de salud colectiva. Se encuentra asociada a la edad, género, condición socioeconómica, etnia, hábito de fumar y algunos problemas sistémicos como la diabetes entre otros. Aunque es más prevalente en adultos, se han reportado casos de niños y adolescentes aunque en menor proporción.

Bajo esta premisa podemos mencionar que los hallazgos de este estudio develan que el 65.5% de la muestra estudiada presenta el tejido periodontal sano. Al contrastar los resultados encontramos diferencias con lo reportado por la Sociedad Americana de Periodontología (2005) y (Vásquez, 2009) donde refiere que en un rango de 40 al 60% los niños en edad escolar tenían gingivitis y el 59.3% de los escolares mostraban una condición sangrante. Pero coinciden con lo reportado por (Morón et al, 2008) que manifiesta que el grupo poblacional entre las edades de 5 a 14 años mostraron el tejido periodontal sano en un 72.23%. Pudiendo presumir entonces

que la situación de salud periodontal de los niños y adolescentes del municipio Baralt es debido al programa de fluoración y de higiene bucal dirigido a este grupo etario. Asimismo, la prevalencia de cálculo dentario en nuestra investigación fue de 14.7% para las edades de 5 a 15 años encontrando diferencias con los resultados de (Vásquez. 2009), donde presenta valores de 20.6%.

En relación al estado periodontal según el género en este estudio se reflejo una mayor proporción de personas con tejido periodontal sano masculino que femenino. Igualmente arroja que en cuanto a la condición sangrante existe un mayor numero del femenino afectado en relación al masculino. No existiendo diferencias significativas con la condición cálculo para ambos géneros. Coincidiendo con los resultados por Vásquez (2009) donde manifiesta en su estudio que los escolares del sexo femenino mostraron mayor frecuencia de código 1 sangrante. Al analizar los resultados con el estudio nacional "Perfil Epidemiológico Bucal de las Etnias Venezolanas" realizado por (Morón et al, 2008) existen diferencias al reportar para la condición sangrante y cálculo valores similares para ambos género.

En cuanto a la necesidad de tratamiento periodontal este estudio refirió que una proporción mayoritaria de la muestra no necesita tratamiento periodontal en ninguno de los seis sextantes y para el porcentaje afectado el tratamiento necesario es mejorar la higiene bucal, el cual coincide con el planteamiento de (Colina, 2007) que manifiesta que el 80.9% de los sextantes se encuentran sanos y que el cálculo predominó en un 11.7%.

En este orden de ideas, estos resultados nos permiten referir que la morbilidad periodontal es un problema de orden mundial y colectivo. Afectando en mayor proporción a las comunidades con mayor inequidad social y que los niños y adolescentes son afectados sin distinción de genero, edad, condición socioeconómica y etnia, probablemente producto de un sistema de atención en Salud que invierte en enfermedad y no ha desviado su mirada a

fortalecer el fomento y promoción de la salud y la prevención de las enfermedades, con el fin de incrementar la calidad de vida del venezolano. Así pues para el caso de los niños y adolescentes que habitan en el municipio Baralt están afectados en menor proporción en su condición periodontal, pero es conocido que los problemas bucales incrementan a medida que se avanza en edad, aunado a unas condiciones socioeconómicas y educativas desfavorables de su grupo familiar, que pueden convertirse en un determinante de la salud bucal colectiva.

Conclusiones

Con la evidencia científica reportada se puede sintetizar, que se hace necesario dirigir medidas preventivas y programas de salud bucal específicos, con el fin de mantener, fomentar e incrementar los niveles de salud de los niños y adolescentes y, por ende, su calidad de vida.

Agradecimiento

Al Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación; y Comunidad del municipio Baralt – estado Zulia.

Referencias

Colina Sánchez, Yumaidi et al. (2007). Estudio epidemiológico de salud bucal en la población de 12 años del área VIII de salud de Cienfuegos. Cienfuegos, Cuba. Facultad de Ciencias Médicas de Cienfuegos. *MediSur*, vol. 5, núm. 2, 2007, pp. 44-52 Disponible en: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=180020191009>

Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000.

Esquivel, R.; Jiménez, J. (2007). Perfil Epidemiológico de Salud Bucodental de estudiantes de la FES. Iztacala. México. *Revista Odontológica Mexicana* 2007; 11 (1): 46-52.

Morón Alexis, Córdova Marlene et al. (2008). Perfil epidemiológico bucal de las etnias venezolanas. Primer reporte nacional. *Rev. Ciencia Odontológica*. 2008. Vol. 5. Suplemento.

Oh T-J, Eber R, Wang HL. (2002). Periodontal disease in the child and adolescent. *J Clin Periodontol* 2002; 29:400-410.

Organización Mundial de la Salud (1997). *Encuestas de salud buco dental. Métodos*. Cuarta edición. Ginebra. 1997. Encuesta Básica de Salud. OMS.

Organización Mundial de la Salud (1984). *Informe del Comité de Expertos de la OMS. Métodos y programas de prevención de las enfermedades bucodentales*. Serie de Informes Técnicos. Suiza – Ginebra.

Pareja M, et al. (2009). Prevalencia y necesidad de tratamiento periodontal en escolares de la institución educativa Andrés Bello. Lima, Perú 2009; 6(1): 36-38.

Sociedad de Periodontología. Research, Science and Therapy Comité of the American of Periodontology. Epidemiology of Periodontal Disease- Position Paper. *Journal periodontal* 2005; 76: 1406-1419.

Normas para la presentación de trabajos

1. Principios de la Revista

La REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA es un órgano científico de difusión de trabajos parciales o definitivos de investigadores y/o equipos de investigación nacionales y extranjeros. Su naturaleza es multidisciplinaria e interdisciplinaria, por ello su temática se divide en tres grandes ejes: a. ciencias sociales y arte; b. ciencias del agro, ingeniería y tecnología; c. ciencias exactas, naturales y de la salud. Su publicación es cuatrimestral. Cada número, de los tres del año, se corresponde con uno de los tres ejes temáticos. La Revista de la Universidad del Zulia, por su carácter histórico y patrimonial, está adscrita a la CÁTEDRA LIBRE HISTORIA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA.

2. Métodos de Envío y de Evaluación de los Trabajos

Los autores interesados en publicar su trabajo en la Revista de la Universidad del Zulia deberán remitir tres copias del mismo sin identificación en sobre cerrado a la siguiente dirección: Avenida Guajira, Fundadesarrollo, planta baja de la Sede Rectoral de La Universidad del Zulia. Este sobre debe estar acompañado de otro, el cual contendrá el original del trabajo con la identificación del autor o autores, indicando: nombre, apellido, institución que representa (universidad, instituto, centro de investigación, fundación), correo electrónico. Así mismo en este sobre se presentará una comunicación escrita firmada por todos los autores y dirigida al Director de la Revista. En esta comunicación se manifestará el interés de los autores de proponer su trabajo para la publicación en la Revista de la Universidad del Zulia, previa evaluación del Comité de Arbitraje. Se agregará también a este sobre una síntesis curricular de cada autor con una

extensión no mayor de diez (10) líneas. También se podrá presentar el trabajo dirigiéndolo a los siguientes correos electrónicos: revisatadeluz@gmail.com; revistauniversidaddelzulia@gmail.com. El currículum de los autores se enviará en archivo adjunto, distinto al que contendrá el trabajo. Los artículos propuestos para esta revista deben ser inéditos y no deben haber sido propuestos simultáneamente a otras publicaciones. Todos los trabajos serán evaluados por parte de un Comité de Árbitros-Especialistas de reconocido prestigio, seleccionado por el Comité Editorial de la Revista. La evaluación de los Árbitros se realizará mediante el procedimiento conocido como par de ciegos: los árbitros y los autores no conocerán sus identidades respectivas. Los criterios de Evaluación son los siguientes:

- a. Criterios formales o de presentación: 1) originalidad, pertinencia y adecuada extensión del título; 2) claridad y coherencia del discurso; 3) adecuada elaboración del resumen; 4) organización interna del texto; 5) todos los demás criterios establecidos en la presente normativa.
- b. Criterios de contenido: 1) dominio de conocimiento evidenciado; 2) rigurosidad científica; 3) fundamentación teórica y metodológica; 4) actualidad y relevancia de las fuentes consultadas; 5) aportes al conocimiento existente.

Al recibirse la respuesta del Comité de Árbitros designado se informará a los autores por correo electrónico la decisión correspondiente; en caso de ser aceptado el trabajo deberá remitirse por correo electrónico la versión digital del mismo.

3. Presentación de los trabajos

Los trabajos deben presentar un resumen de 150 palabras como máximo y hasta cinco palabras claves; tanto el resumen como las palabras claves estarán en español e inglés. Igualmente el título y el subtítulo del trabajo serán presentados también en español e inglés.

La extensión máxima del trabajo será de veinte (20) páginas, y diez (10) como extensión mínima. Todos los trabajos serán presentados en hoja tipo carta, impresos por una sola cara, con numeración continua y con márgenes de tres (3) centímetros a cada lado. El texto se presentará a espacio y medio, en fuente TimesNew Roman, tamaño 12.

4. Cuerpo del artículo

Se dividirá en Introducción, Desarrollo y Conclusiones (o Consideraciones Finales, según sea el caso). La introducción incluirá el propósito u objetivo general perseguido. El Desarrollo se organizará en secciones y subsecciones debidamente identificadas con subtítulos numerados completamente en arábigos de acuerdo al sistema decimal, respondiendo a una sucesión continua y utilizando un punto para separar los niveles de división. La Introducción y Conclusión están exceptuadas de esta numeración. Las fechas y horas se expresarán numéricamente. En caso de existir ilustraciones (gráficos, mapas, fotos) debe hacerse referencia a los mismos en el texto. Estas ilustraciones serán contadas dentro de la extensión máxima del artículo. Las notas explicativas o aclaratorias deben reducirse al mínimo necesario y colocarse al pie de páginas debidamente señalizadas. Los materiales complementarios se recogerán en anexos, los cuales se identificarán con una letra y un título y se colocarán después de la bibliografía. Los anexos serán contados también dentro de la extensión máxima del artículo.

5. Citado

El citado se realizará en el texto utilizando la modalidad autor-fecha, establecido en el Reglamento para la presentación de trabajos en la Universidad del Zulia, indicando, en caso de ser cita textual, apellido (s) del autor, seguido de coma, año de publicación de la obra, seguido de dos puntos y el (los) número(s) de la(s) página(s), por ejemplo: de acuerdo a Rincón (1998: 45) o (Rincón, 1998:45);

si no es cita textual sino una paráfrasis no se indicará el número de página, ejemplo: de acuerdo a Rincón (1998) o (Rincón, 1998). Si hay varias obras del mismo autor publicadas en el mismo año, se ordenarán literalmente en orden alfabético; por ejemplo, (Rincón, 2008a: 12), (Rincón, 2008b: 24). Si son dos autores, se colocarán solamente el primer apellido de cada uno, por ejemplo: Según Morales y Fleires (2008: 90) o (Morales y Fleires, 2008: 90), siguiendo el mismo criterio explicado anteriormente para las citas textuales y las paráfrasis. En caso de ser tres autores o más se colocará el apellido del autor principal seguido de “et al”, ejemplo: (Rincón et al, 2008: 45). Deben evitarse, en lo posible, citas de trabajos no publicados o en imprenta, también referencias a comunicaciones y documentos privados de difusión limitada, a no ser que sea estrictamente necesario. En caso de fuentes documentales, electrónicas u otras que por su naturaleza resulten inviables o complejas para la adopción del citado autor – fecha, sugerido en estas normas, puede recurrirse u optarse por el citado al pie de página.

6. Referencias bibliográficas

Las referencias (bibliográficas, hemerográficas, orales y/o documentales) se presentarán al final del texto, según lo establecido en el Reglamento para la presentación de trabajos en la Universidad del Zulia. El orden de las referencias es alfabético por apellido. Las diferentes obras de un mismo autor se organizarán cronológicamente, en orden ascendente, y si son dos obras o más de un mismo autor y año, se mantendrá el estricto orden alfabético por título.

Instrumento de Evaluación del Árbitro

I.- Criterios formales o de presentación

CRITERIOS DE EVALUACIÓN	EXCELENTE	MUY BUENO	BUENO	REGULAR	DEFICIENTE	OBSERVACIONES
Originalidad, pertinencia y adecuada extensión del título.						
Claridad y coherencia del discurso.						
Adecuada elaboración del resumen: contiene abstract y palabras claves; indica objetivo, metodología y resultados.						
Organización interna del texto.						

II. - Criterios de contenido

CRITERIOS DE EVALUACIÓN	EXCELENTE	MUY BUENO	BUENO	REGULAR	DEFICIENTE	OBSERVACIONES
dominio de conocimiento evidenciado.						
Rigurosidad científica.						
Fundamentación teórica y metodológica.						
Actualidad y relevancia de las fuentes consultadas.						
Aportes al conocimiento existente.						

Suscripción 2012

Tarifas (tres números anuales)

Venezuela	Sin Flete	Con Flete
	75 Bs.F.	100 Bs. F.
Exterior	Institucional	Individual
	US \$ 180	US \$180

Planilla de suscripción

Nombre y apellido: _____

Profesión: _____

Dirección: _____

Apartado postal: _____ Fecha: _____

Teléfono/Fax: _____ E-mail: _____

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA.

Calle 67 (prolongación Cecilio Acosta) con Av. 16 (Guajira).

Nueva sede rectoral de la Universidad del Zulia. Edificio Fundadesarrollo.

Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Teléfono/Fax: 58-261-7831611.

Correos electrónicos: revistauniversidaddelzulia@gmail.com, revistadeluz@gmail.com

FE DE ERRATA

Por error involuntario, se cometieron algunas omisiones en las páginas 61 y 157 de la edición anterior de la *Revista de la Universidad del Zulia* (Número 5, Enero-Abril 2012).

1. En la página 61, se omitieron algunos datos importantes en relación con la identificación de los autores del artículo: **BIODEGRADACIÓN DE FENOL EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO COMBINADO UASB+RBC.**
2. En la página 157, se omitieron dos gráficos en el artículo: **Ordenanza de zonificación 2005. Municipio Maracaibo. Consideraciones.** También, en esta misma página, hubo un error de transcripción.

A continuación reproducimos dichas páginas con sus respectivas correcciones.

Biodegradación de fenol en un sistema de tratamiento combinado UASB+RBC*

Elisabeth Behling, Julio César Marín*
Gladys Weffer, Nancy Rincón, Gilberto Colina

RESUMEN

Se evaluó el desempeño de un sistema de tratamiento combinado UASB+RBC durante el abordaje de un efluente sintético, utilizando como fuente de carbono fenol y glucosa, bajo condiciones mesofílicas y a escala de laboratorio. En los ensayos experimentales se establecieron 3 etapas, durante las cuales se aplicaron concentraciones de fenol desde 20 hasta 40 mg/L, con 4000 mg/L de glucosa. Se monitorearon los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, alcalinidad total, demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno total Kjeldahl (NTK), ortofosfato (PO_4^{3-}), sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV), y contenido de fenol. Los resultados demostraron una alta eficiencia del sistema combinado para la degradación del fenol hasta valores de 99,62%, cumpliendo con lo exigido por la normativa venezolana en materia de vertido a cuerpos de agua. Este sistema puede ser considerado para el diseño de procesos de tratamiento a escala piloto, para la remoción de carbono, nitrógeno y fenol, ya que mostró resultados prometedores durante los ensayos de laboratorio.

PALABRAS CLAVE: biodegradación, fenol, tratamiento biológico, tratamiento combinado, co-metabolismo, UASB+RBC.

* Este estudio fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia.

** Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. ebehling@fing.luz.edu.ve

La primera variable a tomar en cuenta por el Plan, es el área mínima de parcela, entiéndase área bruta, y su respectiva tolerancia (10%) que por cierto no aparecen en el articulado de las poligonales residenciales. La otra variable para determinar la zonificación es el frente mínimo de parcela, que también admite un 10% de tolerancia. Si la parcela dispone de varios frentes, se escoge el de menor dimensión¹⁸, a los efectos de comparación con el frente mínimo exigido por la Ordenanza.

En este método, es condición indispensable para establecer la zonificación que las dos dimensiones reales de la parcela (superficie y frente) sean iguales o mayores a las dimensiones mínimas exigidas por la Ordenanza de Zonificación, después de aplicarle si es necesario la tolerancia. En caso de que alguna de las dos variables no cumpla, se descarta la zonificación de mayor rango. En consecuencia, se repite el análisis con la zonificación inmediatamente inferior, hasta que las dos variables cumplan con los requisitos de ser iguales o mayores a lo establecido por la Ordenanza. Este procedimiento se realiza cuando la parcela está afectada por una poligonal (gráfico 2). Pero, pueden presentarse situaciones en que la parcela esté afectada por varias poligonales (gráfico 3). En este caso se inicia el análisis con la poligonal de más rango, si fuere el caso de que no cumpliera alguna de las variables, se repetirá el proceso con la poligonal inmediatamente inferior indicada en el plano, hasta demostrar mediante el cálculo, que se equipara o es mayor, al mínimo establecido por la Ordenanza para la superficie de parcela y su dimensión de frente.

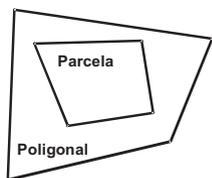


GRÁFICO 2

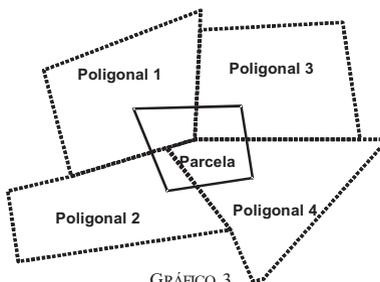


GRÁFICO 3

El método utilizado actualmente por la OMPU, no toma en cuenta para el análisis y validación de la zonificación, el área mínima de parcela que debe ser establecida para cada poligonal (PR2, PR3, PR4 y PR5). Esta omisión del instrumento jurídico vigente no está justificada al momento de ignorar esta importante variable, tomando en cuenta que existe una jurisprudencia municipal en Venezuela, que se remonta a más de cincuenta

18 Se escoge la menor dimensión, porque es la manera de anticiparse y/o prever situaciones de distorsión en un proyecto, tanto en lo urbano como en lo arquitectónico.

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA 3^a época
Ciencias Exactas, Naturales y de la Salud /// Año 3 - No. 6
Mayo-Agosto 2012. Se terminó de imprimir en Mayo del 2013
en los talleres de Grafifor, C.A. Telfs. 0261 788 56 72
E-mail: grafiforca05gmail.com / grafiforca05@cantv.net
Maracaibo, Venezuela. Tiraje: 300 Ejemplares