



ACADEMIA COLOMBIANA
DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICAS Y NATURALES

ISSN 0370-3908
eISSN 2382-4980

REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Vol. 44 • Número 172 • Págs. 679-904 • Julio - Septiembre de 2020 • Bogotá - Colombia



F. de S. Santander
Dram.



ACADEMIA COLOMBIANA
DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICAS Y NATURALES


ISSN 0370-3908
eISSN 2382-4980

REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Vol. 44 • Número 172 • Págs. 679-904 • Julio - Septiembre de 2020 • Bogotá - Colombia

Comité editorial

Editora

 Elizabeth Castañeda, Ph. D.
Instituto Nacional de Salud,
Bogotá, Colombia

Asistente editorial







Carolina Acosta

Grupo de apoyo



Marta Renza, correctora de estilo
Johanna Morales, diagramadora
Bibiana Dimate, Publindex
César Moreno

Editores asociados







Ciencias Biomédicas

-  Luis Fernando García, M.D., M. Sc.
Profesor emérito, Universidad de Antioquia,
Medellín, Colombia
-  Gustavo Adolfo Vallejo, Ph. D.
Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia
-  Juanita Ángel, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
-  Manuel Franco, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
-  Alberto Gómez, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
-  John Mario González, Ph. D.
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia
-  Gloria Patricia Cardona Gómez, Ph. D.
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
-  Ángela Restrepo Moreno, Ph. D.
Corporación para Investigaciones Biológicas,
Medellín, Colombia
-  Helena Groot de Restrepo
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Ciencias del Comportamiento

- Guillermo Páramo, M.Sc.
Universidad Central, Bogotá, Colombia
-  Rubén Ardila, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
-  Ana María Groot de Mahecha
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Ciencias Físicas

-  Pedro Fernández de Córdoba, Ph. D.
Universidad Politécnica de Valencia, España
-  Diógenes Campos Romero, Dr. rer. nat.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
-  Román Eduardo Castañeda, Dr. rer. nat.
Universidad Nacional, Medellín, Colombia
-  María Elena Gómez, Ph. D.
Universidad del Valle, Cali
-  Gabriel Téllez, Ph. D.
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia
-  Jairo Roa-Rojas, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

- 15 Ángela Stella Camacho Beltrán, Dr. rer. nat.
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia
- 15 Edgar González, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- 15 Guillermo González, Ph. D.
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia
- 15 Carlos Duque
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Ciencias Químicas

- 15 Sonia Moreno Guaqueta, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Myriam Sánchez de Gómez, M.Sc.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Fernando Martínez, Docteur en Chimie
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia
- 15 Luis Fernando Echeverry, Ph. D.
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- 15 Carmenza Duque Beltrán
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Ligia Sierra García
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- 15 Luz Marina Jaramillo Gómez
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Ciencias Naturales

- 15 José Luis Fernández Alonso, Doctor
Real Jardín Botánico, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Madrid, España
- 15 Jaime Cantera, Doctorat d'Etat
Universidad del Valle, Cali, Colombia
- 15 Gabriel Roldán, Dr. rer. nat.
Universidad Católica de Oriente, Rionegro,
Antioquia, Colombia
- 15 Sandra Baena Garzón, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- 15 Néstor Hernando Campos Campos, Dr. rer. nat.
Universidad Nacional de Colombia,
Sede Caribe, Colombia
- 15 Martha Patricia Ramírez Pinilla, Ph. D.
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia
- 15 Jairo Castaño-Zapata, Ph. D.
Universidad de Caldas, Manizales, Colombia
- 15 Juan Manuel Díaz Merlano, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Gerardo A. Aymard C, Ph. D.
Universidad Nacional de los Llanos Ezequiel Zamora,
Venezuela
- 15 Néstor Julio García, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

- 15 Arturo Acero, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia,
Santa Marta, Colombia
- 15 Elizabeth Hodson
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- 15 Germán Amat
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 John Donato
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Martha R. Campos
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Clara Inés Orozco
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Carolina Romero
Herbarium, Missouri Botanical Garden, Estados Unidos
- 15 Eduardo Flórez
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Ciencias de la tierra

- 15 Carlos Alberto Vargas, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Carlos Alberto Jaramillo Muñoz, Ph. D.
Smithsonian Tropical Research Institute, Panamá
- 15 José Daniel Pabón, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Alexander Correa
Instituto de Geología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Mexico
- 15 Ligia Estela Urrego
Universidad Nacional, Medellín, Colombia
- 15 Camilo Montes
Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
- 15 Germán Bayona
Corporación Geológica Ares, Bogotá, Colombia
- 15 Hernando Dueñas Jiménez
BIOSS SAS, Antioquia, Colombia

Matemáticas

- Jorge Ivan Cossio Betancur, Ph. D.
Universidad Nacional, Medellín, Colombia
- 15 Luis Español González, Ph. D.
Universidad de la Rioja, España
- 15 Luis Carlos Arboleda, Doctor
Universidad del Valle, Cali, Colombia
- 15 Clara Elena Sánchez
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- Fernando Zalamea Traba
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- 15 Carlos Enrique Mejía
Universidad Nacional, Medellín, Colombia
- 15 Francisco Marcellán
Escuela Politécnica Superior, Madrid, España

Comité científico internacional

- 10 Carlos Jiménez, Ph. D.
Universidad de La Coruña, España
- 10 Wolfgang Gieren, Ph. D.
Universidad de Concepción, Chile
- 10 Alfonso Castro, Ph. D.
Harvey Mudd College,
Claremont, CA, EEUU
- 10 Rodolfo Castillo, Ph. D.
Fort Lauderdale, Florida, EEUU
- 10 José Rubens Pirani Ph. D.
Universidade de São Paulo, Brazil
- 10 Federico Ardila, Ph. D.
San Francisco State University, San
Francisco, CA, EEUU
- Juan Alfredo Tirao, Ph. D.
Academia Nacional de Ciencias Córdoba,
Argentina
- 10 Pedro Romero, Ph. D.
Instituto Ludwig de la Universidad de
Lausana en Suiza
- 10 Ulrich Paessler, Ph. D.
Academia de Ciencias de Berlín-
Brandenburgo, RFA
- 10 Maria Sagrario Millán
Universidad Tecnológica de Tarrasa,
España
- 10 Zbigniew Jaroszewicz
Centro de Fotónica Aplicada, Instituto
Tele y Radiotécnico, Instituto Nacional
de Telecomunicaciones, Polonia
- 10 José Luis Moran López,
Doctor Rerum Naturalium
Academia Mexicana de Ciencias,
México
- 10 Jean-Pierre Galaup
Universidad de París Saclay, Francia
- 10 Helena Nader, Ph. D.
Academia Brasileira de Ciencias, Brasil
- 10 Roberto JJ Williams, Ph. D.
Academia Nacional de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales, Argentina
- 10 Walter Fernández Rojas, Ph. D.
Presidente Academia Nacional de
Ciencias, Costa Rica
- 10 Alex Held, Ph. D.
Commonwealth Scientific and Industrial
Research Organisation (CSIRO), Australia
- 10 Rafael Radi, M.D.
Academia de Ciencias de Uruguay

Reseñada en los siguientes índices nacionales e internacionales:

Actualidad Iberoamericana
Agris
Dialnet
EBSCO
Historia Mathematica

Index Kewensis
Latindex
Mathematical Reviews
MathSciNet (on line data base)
OCLC (Online Computer Library Center)

PERIODICA
Publindex, Colciencias
SciELO, Colombia
Zentralblatt für Mathematik
Zoological Record

Publindex, Colciencias (convocatoria 768 de 2018), categoría B

Periodicidad: trimestral
Fecha de inicio: 1936



Esta publicación se ha financiado mediante la transferencia de recursos del Gobierno Nacional a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

La Academia no es responsable de las opiniones aquí expresadas.

Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, ni transmitido por ningún procedimiento electrónico, mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, ni registrado por ningún sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización previa de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.

Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Cra. 28 A no. 39A - 63 Bogotá D.C., Colombia, CP 111311 • **PBX:** +57(1)555-0470
Sitio web: www.raccefyn.co • **Correo electrónico:** revista@accefyn.org.co



ACADEMIA COLOMBIANA
DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICAS Y NATURALES

ISSN 0370-3908
eISSN 2382-4980

REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Vol. 44 • Número 172 • Págs. 679-904 • Julio - Septiembre de 2020 • Bogotá - Colombia

Contenido - Contents

Editorial

- Francisco de Paula Santander (1792-1840)
Enrique Forero 686

La comisión científica permanente y la Academia Nacional de Colombia **E**

- The Permanent Scientific Commission and the National Academy of Colombia
Santiago Díaz-Piedrahita 690

Encuentros de Francisco de Paula Santander con Alexander von Humboldt y otros científicos en Berlín y París: 1830 **E**

- Meetings of Francisco de Paula Santander with Alexander von Humboldt and other scientists in Berlin and Paris: 1830
Alberto Gómez-Gutiérrez, PhD FLS. 693

Vida de la Academia: Francisco de Paula Santander

- Life of the Academy: Francisco de Paula Santander
Olympe Morales Benítez 699

Genetic analysis of pre-Columbian human remains from Lower Magdalena suggests a migratory route and matrilineal genetic continuity in Northern South America **OA**

- Análisis genético de restos humanos precolombinos del Bajo Magdalena sugiere una ruta migratoria y continuidad genética matrilineal en el norte de Suramérica
María Claudia Noguera-Santamaría, Javier Rivera-Sandoval, Juan Guillermo Martín, Ignacio Briceño-Balcázar, Alberto Gómez-Gutiérrez 704

Estudio del semiconductor magnético ZnO dopado con Fe obtenido por aleamiento mecánico **AR**

- Study of the magnetic semiconductor of the Fe-doped ZnO system obtained by mechanical alloy
Ligia E. Zamora 716

The genetic structure of *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae) mirrors traits of their life history **OA**

- La estructura genética de *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae) refleja rasgos de su historia de vida
Gilcilene Santana-Cornélio, Elciomar Araújo-de-Oliveira, Keila Magalhães-Xavier, Gabriela Wemilly Barros-da-Silva, Isadora-França, Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues, Emil José Hernández-Ruz 729

Homenaje al General Francisco de Paula Santander

Homage to General
Francisco de Paula
Santander

Ciencias Biomédicas

Biomedical Sciences

Ciencias Físicas

Physical Sciences

Ciencias Naturales

Natural Sciences

- Densidad poblacional de la guacharaca colombiana (*Ortalis columbiana*) en un fragmento de bosque subandino en el Valle del Cauca, Colombia** **AO**
Ortalis columbiana population density in a sub-Andean forest fragment in Valle del Cauca, Colombia
Néstor Javier Roncancio-Duque 740

- In vitro effect of four fungicides on *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnosis on the Red Globe grape variety** **OA**
 Efecto *in vitro* de cuatro fungicidas sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis de la uva variedad Red Globe
Silvia Patricia López-Zapata, Jairo Castaño-Zapata 747

- Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellite loci for a sea urchin (*Echinometra lucunter*: Echinometridae)** **OA**
 Aislamiento y caracterización de 17 microsatélites polimórficos en un erizo de mar (*Echinometra lucunter*: Echinometridae)
Milena Benavides-Serrato, Yully Fernanda Contreras-Rueda, Lina M. Barrios-Gardelis, Graeme Fox, Thomas D. Hughes, Néstor Hernando Campos-Campos, Richard Preziosi 759

- El Instituto de Ciencias Naturales (1936-2019): de la historia natural al conocimiento de la biodiversidad en Colombia** **E**
 The Colombian *Instituto de Ciencias Naturales* (1936-2019): From the natural history to the knowledge on the biodiversity in Colombia
Germán Amat-García, Jaime Aguirre-Ceballos 768

- Propagación de *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis* y *Espeletia killipii* en condiciones de invernadero** **AO**
 Propagation of *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis*, and *Espeletia killipii* in greenhouse conditions
Carolina Mancipe-Murillo 780

- Evaluación de residuos de cáscaras de papa como sustrato para la producción de amilasas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* A16** **AO**
 Evaluation of potato peel wastes to produce amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* A16
Etna Milena Sánchez-Castelblanco, Juan Pablo Heredia-Martín 794

- Pyrolysis system to obtain carbonaceous material from rice husk used as a precursor** **OA**
 Sistema de pirólisis para obtener material carbonoso a partir de la cascarilla de arroz como precursor
Javier R. Castro-Ladino, Ana B. Vacca-Casanova, Carlos A. Cuy-Hoyos 805

- Extracción selectiva de oro mediante membranas basadas en un nuevo material polimérico con sitios activos complejantes** **AO**
 Selective gold extraction using membranes based on a new polymeric material with complex active sites
Carmen Lucía López-Solis, Denis Gabriel Córdoba-Jiménez, Germán Cuervo-Ochoa, Jaime Martín-Franco, Tania Milena Gutiérrez-Valencia 814

- Validation of an analytical method by GC-FID for the quantification of styrene and α -methylstyrene** **OA**
 Validación de un método analítico por GC-FID para la cuantificación de estireno y α -metilestireno
Brayan David Verdugo-Torres, Jairo Antonio Cubillo-Lobo, Hugo Alfonso Rojas-Sarmiento 828

Rapid electrochemical detection of *Staphylococcus aureus* based on screen-printed gold electrodes modified with cysteine and Guinea grass (*Panicum maximum*) peroxidase (OA)

Método electroquímico para la detección rápida de *Staphylococcus aureus* en cultivos por electrodos serigrafados de oro modificados con cisteína y peroxidasa de pasto Guinea (*Panicum maximum*)

Paula Guarín, Jonatan Cristancho, John J. Castillo 835

Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes (AO)

Comparison of the composition and antioxidant activity of the chamomile essential oil (*Matricaria chamomilla* L.) obtained by supercritical fluids extraction and other green techniques

María Camila Melo-Guerrero, Daniel Esteban Ortiz-Jurado,

Andrés Mauricio Hurtado-Benavides 845

On the general circulation of the atmosphere around Colombia (RA)

Circulación general de la atmósfera alrededor de Colombia

Óscar José Mesa-Sánchez, Julián David Rojo-Hernández 857

Sillimanita en esquistos y cuarcitas de los Esquistos del Silgará en el cerro La Ventana, macizo de Santander, Colombia: implicaciones petrológicas (AO)

Sillimanite in schists and quartzites of the Silgará Schists Unit in Cerro La Ventana in the Santander Massif, Colombia: petrological implications

Carlos Alberto García-Ramírez, María Paula Rey-Roman, José Jaime Martínez-Vertel 876

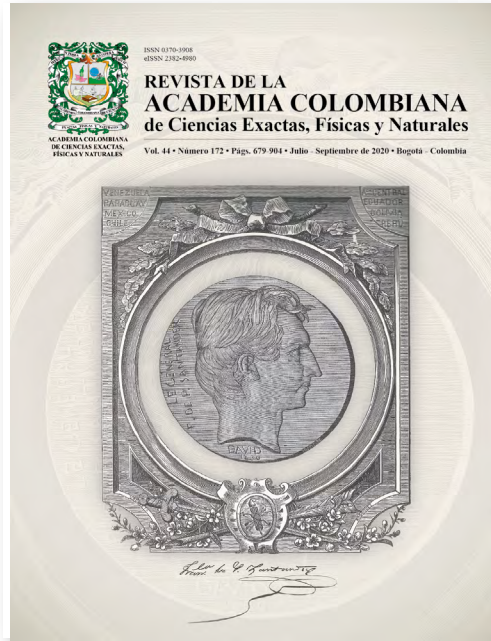
Enfoque y alcance

Focus and Scope 892

Nuestra portada

Homenaje al General Francisco de Paula Santander

Vol. 44 • Número 172 • Julio-Septiembre de 2020 • Bogotá - Colombia



Composición de Antonio Rodríguez, grabador español, en: Urdaneta, Alberto. *Papel Periódico Ilustrado*, No. 3, Año I, 1 de octubre de 1881, p. 37. Efigie a partir del medallón elaborado en 1830 por el artista Pierre-Jean David, llamado “David D’Angers”, escultor y medallista francés que retrataba en París a grandes personajes, especialmente a los académicos franceses.

Santander registró así el encuentro en su diario: “Marzo 5. Visitamos los Acostas, Santamaría, el general Morán y yo el taller del famoso escultor David, miembro del Instituto; estaba concluyendo la estatua en cuerpo entero del general Foy; vimos las del obispo Gregoire, de Fenelón, de Lafayette [...]. David me hizo mil cumplimientos diciéndome que haría mi estatua porque se complacía en trabajar las de los grandes hombres [...]”. Casi tres meses después, la obra estaba concluida – “Mayo 30. Escribí a David dándole las gracias por haber hecho mi busto en bronce y habérmelo regalado” –, y Santander se ocupó en reproducirla: “Julio 7. Pagué cuatro bustos de yeso que hice hacer para el busto de bronce de David, de París, y le regalé uno a Joaquín Acosta”. Véase: Moreno de Ángel, Pilar y Horacio Rodríguez Plata. *Santander. Su iconografía*. Bogotá: Litografía Arco, 1984, p. 133.

Editorial

Francisco de Paula Santander (1792-1840)

La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales conmemora este año los 180 años del fallecimiento del General Francisco de Paula Santander, acaecido en Bogotá el 6 de mayo de 1840. La Academia busca, a través de sus acciones, mantener vivo el legado, la visión y el ideario del General Francisco de Paula Santander, considerando que tiene sus orígenes remotos en la Academia Nacional de Colombia y en la Academia Nacional de la Nueva Granada; así mismo, reafirma en su día a día la importancia de la educación y de la ciencia para el desarrollo del país, preceptos fundamentales de los gobiernos de Santander.

El recorrido del General Santander por las páginas de la historia de nuestra nación es simplemente sorprendente. Desde que adelantó estudios en el Colegio Mayor de San Bartolomé, institución educativa a la que ingresó el 17 de agosto de 1805 cuando tenía trece años de edad, hizo gala de sus dotes de liderazgo. En 1806, con catorce años, fue conciliario del Colegio, y en 1807 ya era secretario de la Junta Conciliar. En 1808 obtuvo el título de Bachiller que le fue otorgado por la Universidad de Santo Tomás, encargada de entregar estos títulos en esa época (**Moreno de Ángel, 2019**).

El 26 de octubre de 1810 ingresó al servicio militar, y ya con 18 años tuvo que enfrentar los rigores de la guerra. Su participación en la gesta libertadora lo llevó al oriente del país, donde tuvo acciones importantes que lo condujeron a reunirse con Simón Bolívar, quien le confió el cargo de Comandante del Ejército de Vanguardia.

José Asunción Suárez Niño (inéd.) describe con lujo de detalles la campaña que le permitió al General Santander lograr la primera y definitiva gran victoria del ejército patriota en el lugar conocido como Trincherón de Paya, o Termópilas de Paya, el 27 de junio de 1819, abriendo el camino para los triunfos posteriores en el Pantano de Vargas y el Puente de Boyacá. Para él, Santander era “gran conocedor de táctica, logística y estrategia, materias que puso en práctica como conductor de la victoria final”. **Ocampo López** (1992) se refiere a él como “el Organizador de la Victoria”.

Santander abandonó su condición de militar y, ya como Vicepresidente de Cundinamarca designado durante el Congreso de Angostura el 17 de diciembre de 1819, se convirtió en “el hombre de las leyes”, creando la institucionalidad tan necesaria para consolidar la nueva nación. Es entonces cuando, en una proclama del 2 de diciembre de 1821, expresa: “Las armas os han dado la independencia, las leyes os darán la libertad”.

Su actividad política y de “arquitecto de la nación” constituyen una segunda etapa en la vida del General, en la que trabajó sin descanso administrando los recursos que permitieron la liberación de Venezuela, y organizando la hacienda pública, las relaciones exteriores y la educación pública (**Ocampo López, 1992**).

Son sus reformas educativas y su fuerte convicción de la importancia de la ciencia para “desarrollar la civilización intelectual, industrial y política”, las que constituyen una tercera etapa en el recorrido del General por la historia del país, y lo convierten en el faro que inspira los objetivos y prioridades de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

El General Santander, siendo un joven de 30 años, llevó a cabo la reforma educativa más importante y revolucionaria de su época, y una de las más sobresalientes en toda la historia de nuestro país. La reforma buscaba, entre otras cosas, que la enseñanza fuera más moderna, y que tuviera en cuenta los avances que se estaban dando en Europa. Según Santander: “sin un buen sistema de educación pública y enseñanza nacional, no puede difundirse la moral pública y todos los conocimientos útiles que hacen prosperar a los pueblos”. “El triunfo sobre la ignorancia es muy brillante y glorioso y prepara la felicidad de los pueblos que cuando más ilustrados, conocen mejor sus derechos y se hacen más dignos de su libertad” (**Ocampo López, 1992**).

Con gran visión, orientó la reforma al mejoramiento de la educación a todos los niveles, insistiendo, por ejemplo, en que la educación debería ser para todos los niños sin distinción de clases sociales. El plan incluía la decisión de “establecer una escuela en cada distrito o parroquia, y en cada cuerpo del ejército, una escuela de gramática en cada cabecera de Cantón, un colegio en cada provincia y una universidad en cada departamento” (Quintero Esquivel, 2017). Los departamentos eran, naturalmente, Caracas, Cundinamarca y Quito.

Para cumplirlo, en primer lugar concentró esfuerzos junto con José Manuel Restrepo, Secretario del Interior, en el establecimiento de colegios en prácticamente toda la república. Según información contenida en la obra *Santander* (Moreno de Ángel, 2019), ésta campaña educativa comenzó con la creación del Colegio de Boyacá, Tunja, el 17 de mayo de 1822, y se complementó así: Escuela Náutica de Cartagena, junio de 1822; Colegio de Antioquia en Medellín, 9 de octubre de 1822, que dio origen a la Universidad de Antioquia; Colegio San Simón en Ibagué, 21 de diciembre de 1822; Colegio Santa Librada en Cali, 29 de enero de 1823; Seminario o casa de educación en Pamplona, 6 de marzo de 1823; Casa de la Educación, Valencia, Venezuela, 15 de abril de 1823; Casa de la Educación, Trujillo, Venezuela, 3 de junio de 1823; Casa de la Educación, Tocuyó, Venezuela, 10 de septiembre de 1823; Colegio del Itsmo, Panamá, 6 de octubre de 1823; Casa de Estudios, Ocaña; 17 de mayo de 1824; Colegio San José en Guanentá en San Gil, 22 de mayo de 1824; Casa de la Educación, Vélez, 7 de julio de 1824; Colegio de Cumaná, Venezuela, 27 de octubre de 1824; Colegio de Cartagena, 8 de noviembre de 1824; Casa de la Educación, Guanare, Venezuela, 16 de mayo de 1825; Colegio del Socorro, 15 de enero de 1826; Colegio de Pasto, 2 de junio de 1827. También hay datos de la creación de colegios en Guayaquil (Colegio San Ignacio), Guayana, Mompós y Mérida. Adicionalmente creó el Colegio de la Merced en Bogotá, dedicado a la educación básica femenina (Díaz-Piedrahita, 2012).

La reforma educativa se extendió al nivel universitario. En 1820 divulgó un plan transitorio para el Estado de Cundinamarca, que respetaba en buena medida la tradición educativa basada en la filosofía escolástica, y era bastante conciliador con las autoridades eclesiásticas.

El Nuevo Plan de Estudios, promulgado en 1826, dio origen a una fuerte polémica, principalmente por el hecho de que instituía el *Tratado de legislación civil y penal* de Jeremías Bentham, como obra de estudio obligatorio en las facultades de Jurisprudencia. El “utilitarismo” de Bentham era considerado como una “doctrina perniciosa para la formación de la juventud”. Quintero Esquivel (2017) incluyó en su artículo sobre “*El proyecto ilustrado de Santander y la fundación de la Universidad del Cauca*” tanto el contenido del plan transitorio de 1820 como el del nuevo plan de 1826.

Fue 1826 el año de creación de la Universidad Central con sedes en Caracas, Bogotá y Quito (Ley del 28 de marzo de 1826 y Decreto del 3 de octubre del mismo año). La sede de Bogotá fue inaugurada el 25 de diciembre. La Universidad de Santo Tomás, de los Padres Dominicos, fue suspendida y remplazada por la Universidad Central de Bogotá, lo cual originó un serio conflicto. Además, la mayor parte de las cátedras que se dictaban en los colegios de San Bartolomé y el Rosario se trasladó a la Universidad Central, que pasó a depender del Estado, convirtiéndose en la primera universidad pública del país. Personajes tan prestantes de la vida colombiana como los doctores José Félix Patiño y Fernando Sánchez Torres, médicos y exrectores de la Universidad Nacional de Colombia, entre muchos otros, consideran a la Universidad Central como el origen de la actual Universidad Nacional de Colombia, y a Santander y sus colaboradores como sus verdaderos precursores.

El 24 de abril de 1827 se crearon las universidades de Popayán y Cartagena (Figura 1).

Lamentablemente, la oposición de los enemigos de Santander, y de la iglesia, sumados al atentado del 25 de septiembre de 1828, llevaron a Bolívar a cancelar la estructura liberal que le había dado Santander a la educación, y retroceder a la estructura colonial, a través de una circular con fecha 20 de octubre de 1828, y de un decreto que devolvió los colegios de San Bartolomé y el Rosario al estado que tenían en octubre de 1826, y se derogaron todas las disposiciones de la ley del 18 de marzo y el decreto del 3 de octubre de 1826. (Moreno de Ángel, 2019).



Figura 1. Monumento a Santander en el patio central de la Universidad de Cartagena.

Además de su interés por la educación, Santander procuró retomar el trabajo de la Expedición Botánica de José Celestino Mutis, convencido como estaba de la necesidad de conocer el territorio nacional desde diversas perspectivas. Para ello, creó en 1823 la Misión Científica Permanente, también conocida como Misión Zea, ya que puso al frente de esa empresa a Don Francisco Antonio Zea. El objeto era traer de Europa a un grupo de científicos para que estudiaran nuestros recursos naturales.

Por otra parte, su interés en la ciencia como motor de desarrollo lo llevó a crear, en su condición de Vicepresidente, la Academia Nacional de Colombia según la Ley del 18 de marzo de 1826. Habiendo sido elegido Presidente en 1832, estableció la Academia Nacional de la Nueva Granada a través del Decreto Ejecutivo de 15 de noviembre de 1832, basado en la Ley del 18 de marzo de 1826. La instalación de esta nueva Academia tuvo lugar el 6 de enero de 1833 en el Palacio de Gobierno, bajo la presidencia de Santander.

La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales tiene pues sus orígenes remotos en las dos Academias creadas por el General Santander. Mi condición de Presidente de la Academia en el momento de conmemorar los 180 años de su fallecimiento me llena de orgullo, pues guardo por él un profundo sentimiento de admiración que me acompaña desde mi juventud. Nunca imaginé que un día podría expresar estas sensaciones en un momento tan especial.

La Academia honra en diversas formas la memoria de quien ha sido reconocido por los historiadores como “el organizador de la victoria”, “el hombre de las leyes”, “el arquitecto de la nación” y “el fundador de la educación pública en Colombia”. A todas estas distinciones se puede agregar sin lugar a duda la de “el primer impulsor de la ciencia como motor de desarrollo”.

Por esto, la Academia estableció en el año 2018 la condecoración *Medalla General Francisco de Paula Santander*, que ha sido entregada a personas que de una forma u otra han mantenido vivo su legado. Adicionalmente, para cumplir un compromiso con la Vicepresidencia de la República dentro de los actos del bicentenario de la independencia nacional, se realizó una sesión especial en la Academia el día 27 de junio de 2019, cuando se celebraban 200 años de la batalla del Trincherón de Paya. Ese mismo jueves 27 de junio de 2019 tuvo lugar el acto más significativo en la historia reciente de la Academia en relación con el General, al entronizar su imagen en el recinto de la institución (**Figura 2**).

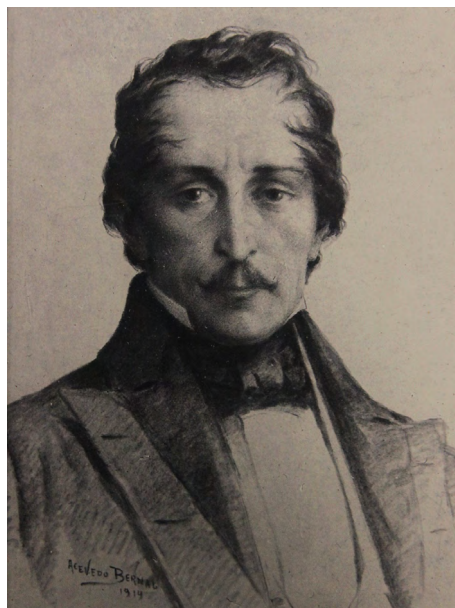


Figura 2. Francisco de Paula Santander - 1914. Ricardo Acevedo Bernal (Bogotá, 1867 - Civitavecchia, Italia; 1930).

La Junta Directiva, en una de sus reuniones de 2019, resolvió por iniciativa del Académico Horacio Torres, que el año 2020 fuera el “Año Santander”. Y se acordó en diversas instancias tales como la Junta misma y el Grupo de Historia y Filosofía de Ciencia, que habría varias actividades en las que se recordaría a Santander al cumplirse 180 años de su fallecimiento. Estas incluían ciclos de conferencias, un número de la revista y la Sesión Solemne Estatutaria del mes de agosto dedicada a su memoria. Aunque por diversas razones fue preciso desistir de los ciclos de conferencias, se había pensado realizar algunas actividades en los Capítulos de la Academia, lo cual se vio frustrado por la emergencia sanitaria. La sesión solemne estatutaria programada en homenaje a su vida, a su legado y, sobre todo, a su visión sobre la importancia de la educación y la ciencia para el futuro del país, efectivamente se realizó en forma virtual y con bastante éxito el miércoles 19 de agosto de 2020.

La Academia de los albores del Siglo XXI tiene como su objeto el desarrollo de las ciencias exactas, físicas y naturales, sus aplicaciones y su enseñanza. Para cumplirlo, la Academia fomenta y apoya la investigación científica, orienta a la sociedad en temas de interés nacional, contribuye a la divulgación y a la apropiación de la ciencia como elemento de cultura y desarrollo económico y social, y coopera en el mejoramiento de la enseñanza en los distintos niveles de la educación.

Tomando prestadas las palabras de la nota editorial del volumen 18, número 70 de la Revista de la Academia, escrita con ocasión de la celebración de los 200 años del nacimiento de Santander (2 de abril de 1792 - 2 de abril de 1992), la institución “sigue bajo los derroteros que le señalara su fundador, el General Francisco de Paula Santander, y que ratificaran sucesivamente quienes la han reorganizado y revitalizado a lo largo de 194 años, garantizando su vigencia”.

Referencias

- Díaz-Piedrahita, S.** (2012). Antecedentes de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. En: E. Forero González y S. Díaz Piedrahita (Eds.), *La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en los Albores del Siglo XXI*. Bogotá: Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. Edición Especial, pp. 14-44.
- Moreno de Ángel, P.** (2019). *Santander*. Bogotá: Planeta Colombiana S. A.
- Ocampo López, J.** (1992). Santander y la Academia Nacional. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* **18** (70): 383-388.
- Quintero Esquivel, J. E.** (2017). El proyecto ilustrado de Santander y la fundación de la Universidad del Cauca. *Magazín Bicentenario*. **1**: 9-13. Popayán, Colombia: Publ. Universidad del Cauca.
- Suárez Niño, J. A.** (2019, inédito). Santander: Termópilas de Paya.

Enrique Forero

Presidente

Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Agosto 2020

Ensayo

La Comisión Científica Permanente y La Academia Nacional de Colombia¹

Santiago Díaz-Piedrahita

Un primer intento por revivir los ideales de la Expedición Botánica ocurrió durante la primera gestión del general Francisco de Paula Santander; entonces se conformó la Comisión Científica Permanente, más conocida como Misión Zea, la cual había sido creada mediante decreto del 22 de julio de 1823 y protocolizada mediante decreto del 28 de julio de ese año. Esta empresa debía trabajar en armonía con la recién creada Universidad Central. Para lograr una verdadera eficiencia, los centros universitarios debían contar con el apoyo de institutos de investigación y para cumplir ese propósito se buscó estimular el desarrollo científico retomando los ideales de la Expedición Botánica; para ello se puso en marcha la Misión que tenía como finalidad la de contratar en Europa varios científicos para que estableciesen en el país un museo de ciencias naturales y una escuela de minas; paralelamente debían organizar las cátedras de mineralogía, geología, química general, química aplicada, anatomía comparada, zoología, botánica, agricultura, dibujo, matemáticas, física y astronomía. La Misión estuvo integrada por cuatro naturalistas franceses y por uno peruano con formación europea. Se trataba del químico Jean-Baptiste Boussingault, quien impartiría las cátedras de química y mineralogía; del médico y naturalista François-Desiré Roulin, responsable de las cátedras de fisiología y anatomía comparada; de los auxiliares Jacques Bourdon y [Justin]-Marie Goudot, preparadores y taxidermistas entrenados en el Museo de Historia Natural de París, y del también químico e ingeniero de minas Mariano Rivero, futuro director de la Escuela de Minas y encargado de la organización del museo.

Los contratos que preveían la conformación de una biblioteca especializada en ciencias naturales, la adquisición de los instrumentos necesarios para adelantar las tareas docentes y de investigación, y la dotación del laboratorio de química, fueron aprobados en mayo de 1822. El grupo de científicos llegó al país hacia finales del año, pero debido a las trabas burocráticas sus integrantes sólo iniciaron las tareas propias de su profesión y del compromiso contraído varios meses después. A causa del incumplimiento del gobierno, que apenas firmó el decreto pertinente en 1823, estos científicos terminaron dedicándose a otras actividades con el fin de sobrevivir. Por desidia administrativa se perdió la oportunidad de que tanto en los laboratorios como en las aulas de la Universidad Central se formara académicamente una generación de estudiosos bajo la tutela de catedráticos idóneos. La universidad y el museo lograron un desarrollo incipiente que se vio interrumpido por la agitación política y por los hechos de septiembre de 1828.

En 1826 se estableció la Academia Nacional de Colombia, un cuerpo integrado por 21 personalidades de Colombia y Venezuela. De acuerdo con las normas prescritas, eran 8. La nómina correspondiente aparece en la *Gaceta de Colombia* No. 266 de 1826. Las funciones de la Academia eran las de establecer, fomentar y propagar el conocimiento y perfección de las artes, de las letras, de las ciencias naturales y exactas y de la moral y de la política.² El acto de instalación se realizó el 25 de diciembre, en presencia de

¹ Tomado de: Díaz-Piedrahita, Santiago. "Antecedentes de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales". En: Forero González, Enrique y Santiago Díaz-Piedrahita (eds.). *La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en los albores del siglo XXI*. Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2012, Volumen I, pp. 18-21.

² En líneas generales, estos objetivos son los que cumplen en la actualidad las distintas entidades que

José Manuel Restrepo quien ocupaba la Secretaría del Interior. La Academia fue presidida por Félix Restrepo, y como secretario actuó Pedro Acevedo Tejada. La vida de esta corporación resultó efímera. La rebelión encabezada por José Antonio Páez en Venezuela, la inoportunidad de proponer una Constitución Bolivariana o de crear una Confederación Andina, la propuesta de modificar la Constitución de Cúcuta antes del plazo estipulado en sus cláusulas, la conspiración septembrina, las presiones políticas y los demás hechos que, en 1830, desembocaron en la disolución de la Gran Colombia, dividieron la opinión y, como resulta obvio, no fueron propicios para el desarrollo de una Academia. A pesar de haber emprendido una transformación política y administrativa, la primera administración de Santander terminó en medio de una crisis política.

Además de la inestabilidad política, de las rivalidades regionales y de la falta de recursos económicos, fue la carencia de una comunidad intelectual y científica madura, la que impidió el desarrollo de la Academia Nacional. Por su parte la Universidad no alcanzó el desarrollo esperado y la educación superior siguió a cargo de los Colegios Mayores, en tanto que la *Comisión Científica* no produjo los frutos esperados.

Disuelta la Gran Colombia, se reorganizó el país bajo el nombre de República de la Nueva Granada y, una vez más bajo los auspicios de Santander, quien había asumido la presidencia el 15 de noviembre de 1832, se estableció por decreto la *Academia Nacional de la Nueva Granada*. La instalación se produjo el 6 de enero de 1833; el acto correspondiente se celebró en el propio Palacio de Gobierno bajo la presidencia del general y con la asistencia de catorce de sus veintiún integrantes.

El articulado de la norma constitutiva señala a la letra:

Artículo 1º. Se establece la Academia Nacional de la Nueva Granada con veintiún miembros, en los términos prescritos por la ley de 18 de marzo de 1826 y para los objetos que ella determina.

Artículo 2º. Se nombrarán miembros de la Academia Nacional:

1º A los granadinos que pertenecían a la Academia Nacional de Colombia, a saber: los señores Vicente Azuero, José Manuel Restrepo, Manuel Benito Rebollo, José María del Castillo, Francisco Soto, Jerónimo Torres, Santiago Arroyo, Pedro Gual, Francisco Vergara y Benedicto Domínguez.

2º A los señores Joaquín Mosquera, Diego Fernando Gómez, Rufino Cuervo, Joaquín Acosta, reverendo obispo de Santa Marta (José María Estévez), Joaquín García, Lino de Pombo, Manuel María Quijano, Juan María Céspedes, General Hilario López y José María Triana.³

Entre otras ideas, el General Santander señaló durante el acto de instalación:

Señores,

La Patria os llama por el órgano del Gobierno a componer la Academia Nacional de la Nueva Granada. Vuestra comisión se contrae a establecer el imperio de la verdad en esta naciente República, afianzarlo y conservarlo perpetuamente.

Vuestras luces y vuestro patriotismo me inspiran la más fundada esperanza de que os dedicareis asiduamente a corresponder el bello encargo que la Patria os confía. Ya que somos tan dichosos de que algunos de nuestros primeros guías en la carrera de la Independencia y de la Libertad escapasen del estrago general causado por la cuchilla española, y de que la discordia civil respetase los preciosos renuevos que 22 años de sacrificios han fecundado, debemos marchar con el siglo, concurriendo a comunicar a nuestros compatriotas las verdades útiles, que hacen desarrollar la civilización intelectual, industrial y política.⁴

La vida de esta institución, como la de su predecesora, fue fugaz; paulatinamente cayó en la inoperancia por la falta de compromiso y desinterés de sus integrantes. La inestabilidad política afectó no sólo a la Academia sino a la Universidad. El anhelado desarrollo científico y cultural seguía sin alcanzarse.

integran el Colegio Máximo de las Academias de Colombia, organismo creado en 1959.

³ López Domínguez, Luis Horacio (comp.). *Obra educativa de Santander: 1827-1835*. Bogotá: Biblioteca de la Presidencia de la República, 1990, Tomo II, pp. 87-88.

⁴ *Ibidem*, pp 104-105.

Con la organización de la Academia Nacional se trató, infructuosamente, de dar vida y dinamismo a los gabinetes de historia natural, al Museo Nacional y al Observatorio Astronómico, entidades que debían de servir de apoyo a la Universidad y a la propia Academia. Santander había procurado modernizar la enseñanza y reducir el poder de la Iglesia Católica en el terreno educativo. Entre 1839 y 1841 se produjo la llamada Guerra de los Supremos, y el gobierno presidido por Pedro Alcántara Herrán dio un claro viraje hacia la derecha, cambio ideológico defendido arduamente por Mariano Ospina Rodríguez, quien se desempeñaba como Secretario del Interior. En 1844 Ospina invitó a los jesuitas a regresar al país y les solicitó reasumiesen las tareas docentes. En forma paralela, la Universidad Central fue desarticulada para dar paso a tres pequeñas universidades de distrito fácilmente manejables. A Bogotá le correspondió la Universidad del Primer Distrito, donde al lado de una estricta disciplina imperaba una ideología claramente conservadora y religiosa que poco favorecía el desarrollo de las ciencias básicas. Muchas asignaturas de los programas fueron suprimidas por considerarse peligrosas en la formación de la juventud.

Don Mariano trató de compaginar su ideología con el fomento de las ciencias útiles, un tema que le preocupaba.⁵ Para él, como buen antioqueño, en el país imperaba una sociedad eminentemente agraria que se hallaba saturada de abogados, literatos, teólogos y generales, motivo por el cual los jóvenes requerían nuevos horizontes; esa apertura a los campos empresarial e industrial y minero se lograría través de una educación más técnica y en campos más prácticos. Su plan de estudios buscaba formar hombres útiles y disminuir el número de abogados que, a su juicio, era excesivo, carecía de empleo y entrababa la marcha política de la Nación. Por ello hacía énfasis en las matemáticas y las ciencias naturales, cuyo estudio debía anteceder al de la jurisprudencia. Pese a los esfuerzos de sus organizadores, la Universidad siguió difundiendo un saber de tipo escolástico sin llegarse a generar verdadera ciencia. Curiosamente, en este ambiente académico aparentemente adverso, se formó una generación de jóvenes como Manuel Murillo Toro, Santos Gutiérrez, Eustorgio Salgar y Francisco Javier Zaldúa, entre otros, que cambiaría temporalmente al país al implantar políticas radicales totalmente opuestas a las que habían aprendido en las aulas.

⁵ Al respecto puede verse Safford, Frank. *El ideal de lo práctico. El desafío de formar una elite técnica y empresarial en Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional - El Ancora Editores, 1989.

Ensayo

Encuentros de Francisco de Paula Santander con Alexander von Humboldt y otros científicos en Berlín y París: 1830

Alberto Gómez-Gutiérrez

Francisco de Paula Santander arribó a París el miércoles 17 de febrero de 1830, un año, tres meses y dos días después de sufrir traslados heteróclitos y estadias improvisadas en medio de su destierro de Colombia,¹ iniciado en Bogotá el 15 de noviembre de 1828 como consecuencia de su ascendencia y estrecho vínculo con los conspiradores que atentaron contra Simón Bolívar en el Palacio de San Carlos en la noche del jueves 25 de septiembre de 1828:

Salimos [del poblado de (L)ouvres –Hôtel *Le Cheval Rouge*–]² después de las siete, pagando carísimo la posada y comida, y a las 10 y media llegamos a los arrabales de París, por un camino poblado de alamedas y de pueblos y lleno de carruajes que iban y venían de esta capital. La entrada es por el arrabal San Martín, el cual pasado, se llega a una puerta donde se registran los carruajes; a mí me preguntó uno si tenía que declarar algo y, respondido negativamente, pasamos inmediatamente. Tomamos el boulevard de los italianos y atravesamos por junto a la bolsa de los mercaderes y llegamos al Hôtel Boston, calle Vivienne,³ el cual había salido en suerte de cinco que tiramos para saber a dónde nos alojaríamos. Me dieron un salón decente y dos cámaras por diez francos diarios, y los tomé sólo por una semana. La leña es cara y la comida a la carta no es barata. Yo hice buscar un alojamiento más barato y nada se realizó.

Al día siguiente, Santander se vio con “el señor Pío Rengifo, colombiano”,⁴ a quien había conocido en Bogotá:

[M]e hizo muchos ofrecimientos y entre ellos dinero. Se encargó de buscarme un alojamiento. Salí a dar un paseo y lo hice por el famoso edificio llamado *Palais Royal*, que merece ser llamado famoso. Allí se encuentran tiendas de ropa, cafés, restaurantes, joyerías, etc. El patio está cubierto de alamedas y a un lado hay una fuente que tiene varios chorros de agua bastante altos. En este palacio vive el duque de Orleans [...]. En los diarios he leído que continúa la insurrección de Venezuela y que se ha ofrecido al presidente de los Estados Unidos de América la medalla emitida para perpetuar la memoria de la salvación de Bolívar, la noche del 25 de septiembre de 1828.

El viernes 19 lo visitó Joaquín Acosta Pérez, quien se había enterado por su amigo Pío Rengifo y Díez de la Fuente (1799-1867) que el general Francisco de Paula Santander había llegado el miércoles 17 al Hôtel Boston de la rue Vivienne. Acosta acudió con José Domingo,⁵ su hermano mayor, y Vicente Concha Maldonado (1809-1830), a quien Santander se refirió como su pariente.⁶ Dice así Santander en su *Diario de viaje*:

Febrero 19. Viernes: Joaquín Acosta, oficial colombiano, me ha visitado esta mañana. Vive en la rue de l'Ouest N.º 9. Estuvieron Domingo Acosta y Vicente Concha, mi pariente.⁷

Joaquín Acosta había establecido previamente un estrecho vínculo en París con Alexander von Humboldt, y este había surgido años atrás en medio del viaje americano de Humboldt y Bonpland, cuando estos viajeros pasaron por Guaduas entre Honda y Bogotá, y se alojaron en casa de los Acosta. Humboldt mismo se refirió a este antecedente en una nota escrita a Joaquín Acosta en París a finales del mes de marzo de 1827:

Tendré el más vivo placer en recibir al señor Roche y á Domingo Acosta, cuya respetable familia (hace siglos!) tuvo para mí tantas bondades. Venga á verme el sábado á las 8 y media, si esto no lo molesta demasiado. Su adicto, Humboldt.⁸

El *Diario de viaje* de Francisco de Paula Santander resulta particularmente útil para precisar quiénes habrían integrado en esos años el círculo de exiliados y viajeros al que Humboldt había llamado ya “*¡nos colombiens!*” en una nota a Joaquín Acosta en el mes de julio de 1826.⁹ Además de los Acosta, Rengifo y Concha, Santander refiere, en orden cronológico, sus encuentros con José María Salazar;¹⁰ Jerónimo Torres;¹¹ *Delgado*;¹² el *general Herrán*;¹³ Roche, hijo de Pepa Domínguez;¹⁴ *el cuñado de Hurtado*;¹⁵ *Santamaría, que estuvo de ministro en Méjico*;¹⁶ Santiago Rodríguez, *diputado en la convención de Ocaña*;¹⁷ Palacios¹⁸ y Ezequiel Rojas.¹⁹ Pero con quien más tiempo pasa Santander, además de Pacho²⁰ y Juan y Pepe,²¹ sus compañeros de viaje, es con Joaquín Acosta, con quien visita museos, academias y diversos personajes de la ciencia y de la política.

Una de estas visitas resulta muy significativa en el dominio de la ciencia. En efecto, el lunes 1º de marzo, Santander registró en su *Diario de viaje* una visita excepcional:

1º - Lunes: Anoche estuve en la diversión de títeres y sombras chinescas, en el Palacio Real, por no tener qué hacer. Vino Acosta (Joaquín) para ir a casa del general Lafayette, lo encontramos y me hizo una acogida muy amable. Hablamos de las cosas de Colombia y de Bolívar. Quedé de concurrir a las soirées de los martes. De allí fuimos a casa del señor Jullien, luego entramos al magnífico jardín del Luxemburgo mucho más grande que el de las Tullerías y pasamos al Instituto, donde presencié una sesión de la Academia de Ciencias, presidida por Girard físico. En ella vi a los siguientes miembros: La Croix, autor de una obra muy conocida de matemáticas (es cojo), a Fourier, matemático y secretario de la academia, Cuvier, también secretario, el primer naturalista de Europa, Wardem autor de la estadística de los Estados Unidos, Thénard, y Chapsal ex-ministro del interior del tiempo de Napoleón, ambos químicos afamados; Arago, astrónomo director del Observatorio, Freycinet, marino que ha dado vuelta al mundo; Puissant, coronel geógrafo, Virey naturalista, Desfontaines botánico, Mathieu, astrónomo, Moreau de Jonnes, estadístico, Brongniart, naturalista director de la fábrica de porcelana de Sevres, Biot, físico, el barón Portal, anatómico y Legendre, geómetra. Yo fui presentado a Warden, a Arago, a Puissant, a Brongniart; Wardem me llevó a la biblioteca donde está la estatua de Voltaire desnudo y sentado y los bustos de Franklin, Malesherbes, La Grange, Berthollet, Volney [...].

El señor Arago quiso hacerme sentar en las sillas destinadas a los extranjeros ilustres que visitan la Academia; me negué a ello. La sala de la Academia es grande: los académicos se sientan formando eclipse y en medio de ella: cada uno tiene tintero y papel por delante. La sesión se abrió dando cuenta de la correspondencia dirigida a la Academia y luego leyó una memoria un miembro, para sostener el sistema nuevo que había presentado, al cual se había referido Cuvier.²²

Dos semanas después, el sábado 13 de marzo, Santander salió a visitar la *École de Commerce de Paris* con Marc-Antoine Jullien (1775-1848), escritor revolucionario y periodista parisino, fundador y redactor principal de la *Revue encyclopédique* a partir de 1819. Pero antes de pasar a la margen derecha del río Sena que divide en dos la ciudad, decidieron visitar “el Jardín del Rey o Jardín Botánico”, en donde les presentaron al “naturalista [Geoffroy] de Saint-Hilaire, miembro de la Academia Real de Ciencias, el cual habló de la memoria que trabajaba contra la opinión de M. [Georges] Cuvier sobre la analogía de la organización [anatómica] animal”.²³

El miércoles 7 de abril, después de haber visitado en los primeros 15 días de marzo el Institut de France y luego lo que hoy se conoce como el Musée National d’Histoire Naturelle, altos referentes de la ciencia francesa, Santander hizo una tercera visita de importancia en ese mismo dominio:

Fui con J[oaquín] Acosta al Observatorio a visitar al señor Arago que tuvo la bondad de mostrarnos el establecimiento, hay en él pocos instrumentos, pero los que hay son magníficos. Una luneta ecuatorial que sigue el movimiento de las estrellas, un gran círculo, diferentes telescopios, agujas de la última perfección y el famoso antejo que sirve para determinar la meridiana. Hay modo de conocer la electricidad de la atmósfera por medio de un hilo de plata que está prendido de un pararrayo y termómetros enterrados para conocer el grado de calor de la tierra a 25 pies de profundidad. El señor Arago nos regaló un anuario de longitudes. (En el Observatorio está la sala llamada bureau des longitudes) [...]. En otra sala del Observatorio están los bustos de Laplace, La Grange, D’Alembert, Bréguet, La Condamine, Newton y la estatua de Dominique Cassini.²⁴

Acosta, quien se había conectado con la *intelligentsia* científica de París gracias a su amistad con Humboldt, salió de viaje en el primer semestre de 1830 en hacia Londres con Pío Rengifo. El general Santander, por su parte, partió a comienzos del mes de junio con destino a Inglaterra, tras repetidas noticias –sucesivamente desvirtuadas– de la muerte de Bolívar, quien por esos días iba ya en camino hacia su último suspiro en la quinta de San Pedro Alejandrino en las afueras de Santa Marta el 17 de diciembre de ese mismo año. Este suceso abriría, antes de lo previsto, el espacio político para el retorno de Santander y para su posesión en la presidencia de Colombia a partir de 1832.

Antes de regresar a Colombia, Santander pasó nuevamente por París con varias escalas previas incluyendo la capital alemana, en donde se encontró el martes 17 de agosto con Humboldt. Este fue el primer encuentro de Santander con el prusiano, y se dio por casualidad en medio de su visita a uno de los museos de esa ciudad. Al día siguiente, miércoles 18 de agosto, Humboldt visitó a Santander y el general le devolvió la visita a Humboldt el jueves 19 de esa misma semana. El sábado 21 Humboldt lo invitó nuevamente para almorzar juntos el domingo:

¿Me haría el honor, Sr. General, de venir a mi casa a almorzar mañana domingo (a las nueve de la mañana) [...]. Mil tributos de admiración y respeto. Alexander Humboldt.²⁵

Santander reporta en su *Diario de viaje* que el encuentro tuvo efectivamente lugar, y que además salieron a pasear por los jardines del rey:

Agosto 22. Domingo: Almorcé con Humboldt y había allí 8 personas más, todas las cuales eran literatos con excepción de un caballero florentino que pertenece a la corte de Toscana y viaja en Alemania. Fuimos al parque de Charlottenburg, residencia del rey en la primavera, a media milla de la ciudad.²⁶

El sábado 28 de agosto Santander anota: “Me despedí por escrito del barón de Humboldt, por estar en el campo con el rey”²⁷. Pero esta no sería la última vez que habría un contacto entre el barón prusiano y el futuro presidente de la Nueva Granada antes de su retorno a la patria. Se conserva evidencia impresa de una nota manuscrita que Humboldt envió a Santander en París, en la siguiente primavera, el martes 19 de abril de 1831:

No es sino por haber refundido durante varios días la amable nota de S[u] E[xcelencia] el Señor General Santander que el Señor de Humboldt tardó en ofrecerle su afectuoso homenaje, proponiéndole de honrarle con su visita el Jueves a las cinco horas. El Sr de H[umboldt] no anotó la dirección del Señor General.²⁸

El registro de este encuentro en el *Diario de viaje* de Santander, dice así:

Jueves. He visitado a Humboldt, y aprueba mi resolución de permanecer en Europa todavía. He escrito sobre esto un artículo a los diarios de París. Con fecha 15 he dirigido una representación al congreso de Colombia pidiendo se publique mi causa y mi representación a Bolívar enviada de Bocachica.²⁹



Francisco Evangelista González. “F. de P. Santander”, miniatura (c. 1831). Tomado de Moreno de Ángel, Pilar y Horacio Rodríguez Plata. *Santander. Su iconografía*. Bogotá: Litografía Arco, 1984, p. 82.

En conclusión, con base en esta relación de notas y encuentros científicos y no científicos de Francisco de Paula Santander en París y en Berlín, que podrían ser fuente de sucesivos trabajos históricos, se puede sustentar, por ejemplo, que Alexander von Humboldt, después de haber recorrido la Nueva Granada entre 1800 y 1803 interactuando con decenas de neogranadinos en aquellos días, no solo siguió aconsejando a los nuevos científicos en ciernes –como Joaquín Acosta–, sino que se había convertido también en esos días en oráculo político de quienes ahora se llamaban colombianos y, en particular, de su máxima autoridad en el exilio.

Notas al final

- 1 La secuencia de traslados y estadías registrada con los subtítulos correspondientes por Santander, inicia con *Diario de navegación de Puerto Cabello a Hamburgo*, luego su *Llegada a Hamburgo* (15 de octubre de 1829) y *Salida de Hamburgo* (14 de diciembre de 1829), continuando con las siguientes localidades: Hannover – Gottinga – Cassel – Marburg – Francfort del Mein – Darmstad – Maguncia – Coblenza – Bonn – Colonia – Aquisgran – Francia-París – París (febrero 17) – Salida de París en viaje a Inglaterra (4 de junio de 1830) – Inglaterra – Londres – Brujas – Breda – Rotterdam – La Haya – Leyden – Haarlem – Amsterdam – *Apreciaciones sobre Holanda y los holandeses* – Llegada a Hamburgo el 27 de julio de 1830 – Salida de Hamburgo el 14 de agosto – Prusia-Berlín – Berlín – *Apreciaciones sobre Prusia* – Sajonia-Dresde – Dresde – Baviera – Nuremberg – Ratisbona – Munich – Tirol Alemán – Innsbruck – Tirol Italiano – Trento – Italia – Reino Lombardo – Véneto – Verona – Mantua – Venecia – Padua – Estados Pontificios – Ferrara – Bolonia – Toscana – Florencia – Roma y Estados Pontificios – Roma – Pisa – Liorna – Lucca – Piamonte o Reino de Cerdeña – Génova – Lombardia – Pavia – Milán – Suiza – Lausana – Ginebra – Francia – Dijon – París – Inglaterra – Londres – York – Edimburgo – Glasgow – Irlanda – Dublín – Banor – Liverpool – Manchester – Birmingham – Oxford – Londres – París. En el año 1831, registró su paso a América, así: Estados Unidos – Nueva York – Filadelfia – Baltimore – Washington – *Observaciones sobre los Estados Unidos* – Nueva York – Pensilvania, en donde el diario termina abruptamente. Para acceder a una edición digital del *Diario del general Francisco de Paula Santander en Europa y los EE. UU. 1829-1832*, transcrita y anotada para el Banco de la República en 1963 por Rafael Martínez Briceño, véase: <http://babel.banrepcultural.org/cdm/ref/collection/p17054coll18/id/458>. El presente texto tomará como referencia bibliográfica para las citas incluidas a partir del Diario, la edición de Mario Germán Romero titulada *Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*. Bogotá: Fundación Francisco de Paula Santander, 1989. Edición digital: http://www.bdigital.unal.edu.co/7802/1/Santander_en_Europa_1829-1832.html#4c
- 2 Esta población está registrada en la transcripción del *Diario de viaje* de Francisco de Paula Santander como “Douvres”, pero se refiere evidentemente a la población de Louvres, a mitad de camino entre Gournay –pueblo en donde pernoctó el día anterior–, y París. Véase *Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*, 1989, 1, p. 99.
- 3 El Hôtel Boston estaba situado en el número 13 de la rue Vivienne. Simón Bolívar se había alojado en el número 3 de esa misma calle (Hôtel des Étrangers) en 1804 cuando, muy joven, había viajado a París tras la muerte de su esposa.
- 4 Pío Rengifo y Díez de la Fuente (1799-1867), político y comerciante nacido en Cali, padre de Pío Rengifo Martínez, doctorado en medicina en la Universidad de París en 1863, y especializado en Alemania e Inglaterra. Una vez establecido en Bogotá, en 1873, se vinculó a la recién fundada Sociedad de Medicina y Ciencias Naturales que llegaría a convertirse en 1891 en la Academia Nacional de Medicina. Rengifo Martínez fue catedrático en la Universidad Nacional y redactor fundador de la Revista Médica de Bogotá. En 1880 viajó a los Estados Unidos y se radicó en Nueva York, donde ejerció su profesión. *Ibidem*, p. 100.
- 5 Joaquín y José Domingo Acosta Pérez eran hijos de José de Acosta Gaine (1745-1803), anfitrión de Humboldt y Aimé Bonpland a su paso por Guaduas en 1801. José de Acosta, inmigrante español, agricultor y comerciante nombrado administrador de la Real Renta de Tabacos y demás rentas estancadas, además de corregidor de Guaduas por el virrey Ezpeleta en 1789, había casado en segundas nupcias con María Soledad Pérez Marchán, con quien tuvo ocho hijos, entre los cuales se destacaron dos: José Domingo Acosta Pérez (1792-1847), fundador de la primera biblioteca pública de Guaduas, secretario de la primera misión diplomática de la Nueva Granada en la Gran Bretaña, y el general Joaquín Acosta Pérez (1799-1852), prócer de la Independencia, geógrafo, hombre de ciencia, historiador, estadista y generoso benefactor, quien se casó con la norteamericana Caroline Kemble Rou, y fueron padres de Soledad Acosta Kemble (1833-1913),

- reconocida literata, historiadora y poeta de la segunda mitad del siglo XIX, casada con José María Samper Agudelo (1828-1888). Joaquín Acosta fue el principal discípulo colombiano de Humboldt en París. Para pormenores de los vínculos de Humboldt y los colombianos en los años 20 del siglo XIX en París, particularmente con Joaquín Acosta, véase Gómez Gutiérrez, Alberto. *Humboldtiana neogranadina*. Bogotá: Cesa / Pontificia Universidad Javeriana / Universidad de los Andes / Universidad del Rosario / Universidad Eafit / Universidad Externado de Colombia, 2018, I, 2, pp. 260-331.
- 6 La referencia a Vicente Concha “su pariente” es valiosa desde el punto de vista histórico, puesto que no solo se trataba del hijo del coronel patriota Mariano José Concha Sánchez (1785-1830) y de Bárbara Maldonado Omaña, hija, a su vez, de Teresa Omaña Santander (por tanto, Concha era sobrino doble del general), sino que comprueba que este personaje, desterrado a Jamaica en 1829 en calidad de adversario de Bolívar, pasaría por París antes de volver a su patria para morir junto a su padre en la batalla de Cúcuta, en noviembre de 1830, al enfrentarse a las tropas del presidente Rafael Urdaneta (1788-1845). De hecho, Santander refiere en su *Diario de viaje* que, en abril 10 había “escrito al coronel Concha con su hijo Vicente”, y luego, en abril 16, “Hoy he despachado a mi negro [Juan] Cruz Cabrejo para Puerto Cabello, con Vicente Concha, y al efecto le he escrito al arzobispo de Caracas para que lo remita para Bogotá. Al negrito le he entregado su carta de libertad” (*Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*, 1989, I, 138 y 140).
 - 7 *Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*, 1989, I, p. 101.
 - 8 Humboldt, Alexander, citado en Acosta de Samper, Soledad. *Biografía del General Joaquín Acosta*. Bogotá: Librería Colombiana Camacho Roldán & Tamayo, 1901, p. 110.
 - 9 La nota de Humboldt decía así: “*Je serais heureux de pouvoir vous offrir des billets et je serais bien aise si M. Acosta vouloit avoir l’extrême bonté de passer chez moi demain samedi à trois heures pour le consulter sur Cajicá. Donnez, de grace, un billet, en mon nom, à M. Restrepo ou à un de les amis ;nos colombiens! Mille amitiés* [Estaría encantado de ofrecerle billetes y me gustaría mucho que el Sr. Acosta tuviera la amabilidad de pasar por mi casa mañana sábado a las tres en punto para consultarle sobre Cajicá. ¡Por favor, dele un boleto a mi nombre al Sr. Restrepo o a uno de los amigos ¡nuestros colombianos! Mil amistades] Humboldt” Para una relación más amplia de los primeros colombianos en París, sus funciones, fechas de estadía y los lugares en donde se alojaron en los años veinte del siglo XIX, véase Gutiérrez Ardila, Daniel. “Los primeros colombianos en París (1824-1830)”. *Anuario Colombiano de Historia Social y de la Cultura*, 2009, 36 (1): 89-124.
 - 10 José María Salazar Arango (1784-1830), diplomático y representante de Colombia en Europa.
 - 11 Jerónimo Torres Tenorio (1771-1838), uno de los más prestigiosos abogados y académicos de la época. Fue un progresista ciudadano que participó en la Independencia y llegó a ser consejero de Estado, director de la Casa de Moneda en Santafé, encargado de negocios en Francia y contador general de Hacienda. Uno de sus hermanos, Camilo Torres Tenorio (1766-1816) hizo estudios de derecho en el Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario de Bogotá, del cual llegó a ser Vicerrector en 1792. Autor del “Memorial de Agravios”, miembro de la Junta Suprema de Bogotá y presidente del Congreso de las Provincias Unidas en el proceso de la Independencia neogranadina colombiana. En el año 1816 buscó exiliarse con otros próceres derrotados por el ejército español. Pero fue capturado y fusilado el 5 de octubre de ese mismo año.
 - 12 Dos Delgados contemporáneos de Santander y posibles viajeros a París fueron: a) el abogado republicano Juan Antonio Delgado Martínez (1794-c. 1865), perseguido por los realistas en 1813 y, posteriormente, jefe político del cantón de Popayán y luego de Cali; b) su sobrino Julián Antonio Delgado Martínez (n. 1797), tesorero del Cauca entre 1821 y 1827.
 - 13 Pedro Alcántara Herrán Zaldúa (1800-1872), último ministro de guerra de la Gran Colombia y secretario de la legación ante la Santa Sede de 1830 a 1832. Herrán fue presidente de la República de Colombia entre 1841 y 1845.
 - 14 Vicente Roche Domínguez (n. 1800), quien participó en la constitución de la primera república en calidad de subteniente de artillería en Santafé en 1824, era hijo del español José Manuel de la Roche O’Ryan (1773-c. 1820) y María Josefa Domínguez de Castillo (1782-c. 1850).
 - 15 Puede referirse a un cuñado de Manuel José Hurtado Arboleda (1782-1845), prócer de la Independencia, senador de la Gran Colombia y ministro plenipotenciario en Inglaterra, quien se había casado con la panameña Carmen Díaz.
 - 16 Miguel Santa María (1789-1837), escritor y político liberal y republicano nacido en Veracruz, México. Santa María llegó a ser ministro plenipotenciario de la Gran Colombia en su país natal entre 1822 y 1828, a pesar de haber sido desterrado por el emperador Agustín Cosme Damián de Iturbide y Aramburu (1783-1824), quien renunció a la corona en 1823 cuando todavía Santa María se encontraba en el puerto de su patria chica.

- 17 Santiago Rodríguez, uno de los 23 venezolanos que participó en la Convención de Ocaña.
- 18 General José Leandro Palacios de la Plaza (1782-1836), caraqueño, ministro plenipotenciario de Colombia en Brasil hasta 1828; pasó a Francia, donde no fue reconocido por Carlos X. El general Santander, en su extensa carta a su íntimo amigo y paisano Francisco Soto Montes de Oca (1789-1845), iniciada en Roma el 12 de diciembre de 1830, y ya con fecha del 29 de marzo de 1831 desde Ginebra (más de tres meses después de la muerte de Bolívar) le pide que “si hay ya libertad de imprenta, haga publicar que Lafayette se empeñó en que me reconciliase con Bolívar, que yo en presencia de los señores Miguel Santa María y Leandro Palacio, le respondí que nuestras diferencias nacían de la oposición de nuestros principios políticos y no de personalidades, y que era preciso que uno de los dos abandonase los suyos; que yo no podía renunciar a los míos porque eran los de la libertad por lo cual había hecho Colombia grandes sacrificios, y ni mi honor ni mi conciencia me permitían traficar con ellos” (*Santander en Europa. Cartas de viaje 1829-1832*. 1989, 3, p. 101).
- 19 Ezequiel Rojas Ramírez (1803-1873), abogado y político santanderista implicado en la conspiración septembrina contra Bolívar, fue diplomático y representante de Colombia en Europa y, más adelante, propuesto como primer rector de la Universidad Nacional en 1867. En razón de quebrantos de salud, fue reemplazado por Manuel Ancízar Basterra (1811-1882), quien ejerció el cargo entre 1868 y 1871.
- 20 Francisco de Paula Evangelista González (n. 1807), quien había embarcado con Santander y con Ezequiel Rojas. Su amigo ‘Pacho’, como le decía Santander, dejó, al menos, dos retratos en miniatura fechados en 1831.
- 21 Juan Cruz Cabrejo y José Delfín Caballero, criados de Santander. El general hizo referencia al segundo en una de sus epístolas, en la que menciona que “Pepe, gordo y grande, trabaja como ebanista muy regularmente” (*Santander en Europa. Cartas de viaje 1829-1832*, 1989, 3, p. 113). También, al regresar a su patria vía Nueva York, escribió a su hermana: “Juan está loco por llegar a Bogotá. Pepe trabaja con provecho. Si los vieras cómo están de petimetres y decentes te habría de dar gusto. Yo los tengo así porque me sirven y porque es honor mío en países extranjeros” (*Santander en Europa. Cartas de viaje 1829-1832*, 1989, 3, p. 166).
- 22 *Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*, 1989, 1, pp. 107-108.
- 23 *Ibidem*, 1, p. 115-116. La polémica entre Saint-Hilaire y Cuvier en 1830 tuvo resonancia internacional. En términos de una enciclopedia contemporánea: “El célebre debate entre Geoffroy y Cuvier se desarrolló oficialmente en forma de comunicaciones y discusiones públicas en la Academia de las Ciencias hasta abril de 1830, pero también, de modo no oficial, en revistas e incluso en la prensa diaria. La polémica, que ilustra el apogeo de la anatomía comparada como disciplina central en el conjunto de las ciencias naturales, se concluyó abruptamente con la inesperada muerte de Cuvier en 1832”. Véase https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%89tienne_Geoffroy_Saint-Hilaire
- 24 *Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*, 1989, 1, p. 109.
- 25 *Santander en Europa. Cartas de viaje 1829-1832*, 1989, 3, p. 320. Debe atenderse al hecho de que el barón firmaba a veces sin las partículas “de” o “von”, en especial cuando se dirigía a un ciudadano patriota como Santander.
- 26 *Santander en Europa. Diario de viaje 1829-1832*, 1989, 1, p. 217.
- 27 *Ibidem*, 1, p. 222.
- 28 *Ibidem*, 1, p. 215.
- 29 *Ibidem*, 2, p. 103.

Vida de la Academia

Durante la Sesión Solemne Estatutaria realizada el miércoles 19 de agosto de 2020 se hizo un homenaje al general Francisco de Paula Santander, a su vida, a su legado y, sobre todo, a su visión sobre la importancia de la educación y la ciencia para el futuro del país.

El profesor **Olympto Morales Benítez**, Presidente de la Academia Santanderista de Colombia, fue el encargado de la conferencia magistral que transcribimos a continuación.

Francisco de Paula Santander

Estratega y estadista: de la acción a la reflexión y a la consolidación

Gracias a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y muy especialmente al académico santanderista y presidente de esta institución, don Enrique Forero, por abrir este sobrio espacio de reflexión científica para que desde lo institucional se escuche mi voz como Presidente de la Academia Santanderista de Colombia, y así difundir el esfuerzo que muchos hacemos por continuar rescatando sin desfallecer la trascendental gesta política y militar de Francisco de Paula Santander; con el Llano como su génesis, este prohombre se consagró como el “Arquitecto de la Nación” y de sus instituciones, que hoy nos enorgullecen y protegen preservando con su solidez el devenir de la vida democrática y civil de todos los colombianos.

Convocamos en estas bicentenarias fechas la memoria alrededor de la cimera figura militar y civil de Francisco de Paula Santander, estratega de la independencia de Indoamérica, quien ha sido distinguido con el título de *Hombre de las Leyes*, en el ejercicio de la concepción e implementación de lo que llegaría a ser nuestra democracia representativa republicana. Para construirla establece como prioridad la instrucción de los mestizos espirituales que conformarían las naciones americanas sin distinciones de origen, raza, edad, sexo o condición.

Ancestros y primeros años

Francisco José de Paula Santander y Omaña (Villa del Rosario, 2 de abril de 1792 - Bogotá, 6 de mayo de 1840), fue hijo de Juan Agustín Santander y Colmenares –quien fuera gobernador de la Provincia de San Faustino de los Ríos y cultivador en sus posesiones rurales– y de doña Manuela Antonia de Omaña Rivadeneira y Rodríguez, ambos pertenecientes a familias criollas, descendientes de funcionarios coloniales llegados al entonces Nuevo Reino de Granada. Su infancia transcurrió en la comodidad de las haciendas de café, caña de azúcar y cacao que poseía su padre.

Santander y Omaña fue un revolucionario, estratega militar y político, estadista y jurista colombiano. Prócer de la Independencia de Colombia. Participó como protagonista destacado en la Guerra de Independencia. Desempeñó un rol determinante en el cruce de Teatinos (Batalla de Boyacá) y en reconocimiento fue ascendido por Bolívar al rango de General. Fue reconocido como el “Organizador de la Victoria”, y nombrado Vicepresidente de la Gran Colombia en el período de 1819-1827 (encargado del poder ejecutivo) y Presidente de la República de la Nueva Granada entre 1832 y 1837.

Su primera escuela

El hecho de haber estudiado en su niñez y adolescencia en diferentes instituciones sembró en Santander el convencimiento suficiente para barruntar cuál sería su papel en la vida de la inexistente nación, y la educación sería para él herramienta insustituible en la formación de la identidad de una comunidad que terminaría siendo la tan atormentada como pujante y resiliente Colombia.

Su primera experiencia educacional transcurre en su niñez e infancia, en la hacienda donde nació, ubicada al oriente inmediato de la Villa del Rosario. Sus primeros estudios los realizó en la escuela de doña Bárbara Josefa Chávez, maestra a la “usanza antigua, eternamente ceñuda, severísima con sus discípulos y menos inclinada al estímulo que al castigo”.¹

Superiores etapas educacionales formativas

Continuó su educación cuando a la edad de doce años fue traído a Santafé en el año de 1805 por su tío el presbítero Nicolás de Omaña Rivadeneira, y allí, apadrinado por quien luego se convertiría en su profesor y más adelante en su jefe, don Custodio García Rovira, entró en el célebre Colegio de San Bartolomé gozando de la beca bartolina que verdaderamente aprovechó pues se distinguió en filosofía, derecho canónico e incluso incursionó en el novedoso derecho de gentes. Casi culminando sus estudios de Derecho en la Universidad Santo Tomás, en el año 1810, lo sorprende el coordinado levantamiento del 20 de Julio que conocemos como el grito de Independencia y que derivaría en la Guerra de Independencia.

Entorno histórico en los inicios de su vida en la milicia

Apenas terminados sus estudios universitarios, Santander inicia su vida militar el 26 de octubre de 1810, como abanderado del Batallón Guardias Nacionales de Santafé y en ese mismo año lo promueven al grado de subteniente en Mariquita. Regresa a Santafé y es designado ayudante secretario de Antonio Baraya.

Santander se une a los federalistas en 1812. Herido y prisionero por los centralistas en Santafé, es rescatado por su Batallón, el Quinto de la Unión, y con él se dirige a Cúcuta.

En el año 1813, actúa en Bailadores como Jefe de Vanguardia. Bolívar es nombrado Brigadier de los ejércitos de la Unión. México emite su primer grito de independencia, Jean-Baptiste Bernardotte es elegido sucesor de Carlos XIII, rey de Suecia. Insurrección en Cartagena y Buenos Aires. El Congreso Venezolano decreta independencia del país y México finalmente se declara independiente.²

Articulación y construcción del grueso del Ejército Libertador

Tres grupos patriotas independientes entre sí obraban en los Llanos del hoy departamento de Casanare. Una columna era dirigida por el coronel venezolano Miguel Valdés, comandante general de las tropas de Casanare o ejército de oriente, cuyo centro de operaciones principal estaba localizado en Guasualito. El segundo grupo estaba comandado por el coronel, también casanareño, Nepomuceno Moreno, gobernador de Casanare, y el tercero era aquel que estaba dirigido por el general venezolano Rafael Urdaneta. Santander llega a Casanare y, desde Laguna en el camino de la Victoria cerca de Pore, usa su influencia como “hombre de la pluma”, como lo apodaron peyorativamente en esa época y logra unir los tres jefes enfrentados.

Una mujer clave para la subsistencia de la naciente fuerza militar

La heroica María Rosa Lazo de la Vega, propietaria de la hacienda Tocaría, que se extendía desde el piedemonte de Nunchía e incluía las sabanas de San Luis y parte de las de Pore, confió en el liderazgo de Santander y alimentó y dio refugio a la tropa independentista –se dice que durante más de cuatro años (entre 1815 y 1819)–, en los terrenos de su finca. Son muchas las mujeres que a los estudiosos de la historia nos van apareciendo como protagonistas en la causa de la Independencia. Cuentan los historiadores que la mayoría de los caballos que movilizaron a la tropa hacia las épicas batallas por nuestra libertad fueron propiedad cedida a la causa por esta casanareña.

¹ Arias, Juan de Dios. *Santander Esquicio Biográfico del Prócer*. Bucaramanga: Imprenta del Departamento, 1939, p. 10.

² Academia Colombiana de Historia. *El libro de oro de Santander*. Bogotá: Plaza & Janés, 1983.

La ruta fluvial hacia la libertad

Santander aprovecha su conocimiento de la geografía del llano y diseña la ruta fluvial que une a Casanare con el Vichada, y que inicia en Pore y termina en el almacén de acopio de todo género militar en Santa Rosalía. Esta ruta incluye el Cuartel General de la Trinidad y Guanapalo, y conduce desde el cuartel de reposo en el invierno llanero que algunos sitúan alrededor de la Laguna que se encuentra en el camino a la Victoria hasta los ríos de refrescante espuma que con hoy sus históricas aguas serán a la vez obstáculo y apoyo para que las quillas de las barcazas independentistas indoamericanas.

Nuestra nación colombiana fue concebida por seres que desde nuestro trópico llanero soñaron una nación no para caminarla en europeas botas militares, sino para ser reflexionada por los pensadores que, como Santander, avizoraron el futuro que hoy en nuestro presente vivimos. Lo soñaron literalmente *encotillados* y temporalmente uniformados para combatir por la independencia y posterior consolidación de la democracia concebida en la América Moderna, así como con los derechos humanos que con Jefferson llegaron a Francia y de allí descendieron a la tierra de la libertad para ser traducidos por Nariño.³

Repetidas lecciones de generosidad y grandeza de dos de los baluartes de la Independencia: Santander y Bolívar

Para nuestro héroe, la hora para la invasión en busca de la libertad de la Nueva Granada había llegado. Santander había soñado en las muchas noches de Laguna con el histórico momento y había insistido por todos los medios a su alcance ante Bolívar para que la acción se llevara a cabo cuanto antes. En su visión, que se probó acertada había calculado que era menester tomar posesión de Santafé, para desde allí irradiar todo el esfuerzo para libertar el continente.

Bolívar contestaba:

Aún no sé positivamente –escribe a Santander– el día, ni me he decidido sobre el modo en que debe ejecutarse; así me limito a indicar a usted el movimiento para que se prepare y a encargarle con el *último encarecimiento el secreto*, sin el cual nada podrá hacerse. Usted sólo, sólo debe saberlo (Cañafistolo, 20 de mayo de 1819).⁴

Al final, quien llegaría a ser conocido como *El Libertador* aceptó la sugerencia del estratega Santander y se decidió por la ruta que atraviesa el páramo de Pisba, a pesar de ser más fragosa, despoblada y penosa.

El camino sugerido por Francisco de Paula une a partir de Nunchía las poblaciones de Morcote, Paya y Pisba cruzando el páramo para llegar a Sochaviejo, población ya situada al otro lado de la cordillera en el altiplano boyacense. Bordea el río Payero por su margen izquierda. Esta travesía tenía la ventaja sobre los otros caminos estudiados, de que era la más corta y menos defendida por el enemigo, como se puede deducir de lo escrito por José María Barreiro y fechado el 25 de junio de 1819 en donde en un oficio a Juan Sámano, expresaba:

El paso de la cordillera no lo pueden ejecutar por otros puntos, que por los de Salinas, Paya, Pueblo Viejo, Miraflores y todo el Valle de Tenza, Medina y Cáqueza. Los pasos de Salinas, Paya, Pueblo Viejo y Medina son páramos y montañas muy fragosas y en la estación presente, hombres que no están acostumbrados al frío serían destruidos por sí mismos; por consiguiente, estos puntos quedan defendidos por una invasión por solo su temperamento. El de Cáqueza se halla muy distante, tiene pasos demasiado estrechos por donde corren grandes quebradas, y es muy fácil utilizarlo al pronto, quedando cubierto.⁵

³ Del escrito de Olympto Morales Benítez en 2018 para el libro *Ruta Fluvial de la Independencia*, investigación recogida por el abogado Pedro Nel Pinzón Guisa.

⁴ Dousdebés, Pedro J. *Trayectoria militar de Santander*. Bucaramanga: Imprenta del Departamento, 1939, p. 164 [cursivas propias].

⁵ Tomado de: http://www.bdigital.unal.edu.co/5659/155/cartas_386_a_472_tomo_2.pdf, pp. 162-163.

El ejército que iba a emprender esta formidable escalada de la cordillera estaba compuesto así: dos mil ciento cuarenta y seis llaneros, ingleses de esta legión y oficiales venezolanos y granadinos que habían llegado comandados por Bolívar, y mil ochocientos combatientes dirigidos por Santander que era el ejército de la Nueva Granada y que, atendiendo el encargo de Bolívar, se constituía en la División de Vanguardia comandada por Santander.

Grandes los dos: Santander y Bolívar. Unidos en un propósito grande, la libertad de Indoamérica que acometieron juntos y culminaron, no sin dificultades, pero con éxito. No es concebible la existencia en la historia del uno sin el otro.

Vicepresidencia de Santander

Su tránsito de la vida militar a la dirigencia civil no tuvo solución de continuidad. El general Francisco de Paula Santander acompaña al libertador en la exigente tarea de diseñar una forma democrática y republicana, que enmarcara jurídicamente el territorio liberado y a él encomendado, y se convierte en el “Arquitecto de la Nación” en el mismo año de la Batalla de Boyacá (1819), al ser ungido como vicepresidente de la Nueva Granada.

Lo esperaban labores administrativas muy exigentes, y tuvo el buen juicio de escoger una serie de varones ilustres para que lo acompañaran en la tarea de consolidar una democracia apenas soñada y una forma de estado aún incipiente en su concepción por los enciclopedistas franceses y los firmantes del Acta de Independencia de los trece Estados Unidos de América (1776).

Hacia lo consolidación de la emancipación

Santander como vicepresidente (1819-1821), se concentra en la consolidación del sueño libertario desde el gobierno. Se hace acompañar de un gabinete de guerra para lograr la consolidación de la libertad. Escoge a Alejandro Osorio Uribe como su Secretario de Hacienda y Guerra. El nombre mismo de la cartera, Hacienda y Guerra, nos señala que la tarea de Santander y Bolívar de consolidar en Indoamérica la libertad por medio de la conducción de los ejércitos estaba aún lejos de haber terminado. Vicente Azuero Plata será nominado Asesor de Hacienda y Auditor de Guerra, intentando garantizar así la pulcritud en el uso de los recursos que demandaba la búsqueda de la libertad continental. Luis Eduardo Azuela, como Intendente General de Rentas, acepta la pesada carga de recaudar los recursos, tarea siempre ingrata. José Miguel Pey, Superintendente de la Casa de la Moneda, iniciará la consolidación de lograr que el circulante mantenga su valor de intercambio sin oscilaciones exageradas. Pedro Gual, como Secretario de Relaciones Exteriores, debe lograr el reconocimiento de incipientes naciones. Pedro Briceño Méndez, Carlos Soublette y Lino Clemente serán, cada uno en su momento, secretarios de Guerra y Marina y deberán impedir que toque tierra cualquier enemigo (español, inglés, francés y/o holandés) del ambicioso proyecto libertario y democrático.

Santander intenta, desde la educación, consolidar la ruta hacia la consolidación de la emancipación

Santander, fundador civil de la República, dedicó su vida por completo a defender la integridad, la estructura y el sistema democrático. Gracias a esto, Colombia es un icono y baluarte de los principios democráticos en Indoamérica. Considera que la instrucción es el inicio del camino. El consagrado investigador y reverenciado historiador Luis Horacio López Domínguez nos apoya en esta afirmación:

Entre 1819 y 1821, por decreto, Santander y Bolívar van avanzando en el dominio de la instrucción pública [...]. Las leyes de instrucción pública expedidas por el Congreso de 1821 dieron fundamento a las medidas de Santander.⁶

⁶ López-Domínguez, Luis Horacio. *Obra educativa de Santander 1819 -1826*. Bogotá: Fundación Francisco de Paula Santander, 1990.

No se detendría la vorágine educativa que posee a Santander. Introduce el método lancasteriano. Funda escuelas en Mariquita, Honda y Valledupar (1822). Funda los colegios de San Simón y Boyacá. Normales lancasterianos en Bogotá, Caracas y Quito. Dirige la *Gaceta de Colombia*, periódico oficial. Entre 1822 y 1825 funda 125 Colegios. En 1826 es reelegido para el siguiente periodo. Dicta el decreto de enseñanza pública y funda la Academia Nacional para fomentar las artes, las letras, la política y la moral, y en 1827 establece la Universidad de Boyacá. En 1932 es nombrado presidente y ejerce la primera magistratura.

El gobernante

Tal y como lo refirió la historiadora Pilar Moreno de Ángel, Santander:

Ejerció la primera magistratura de la república del 1 de abril de 1833 al 1 de abril de 1837. A las 6:32 del 6 de mayo de 1840 murió el general Francisco de Paula Santander. Las palabras finales del estadista fueron: “¡Ahora sí! ¡Adiós, mis amados amigos!”. Se extinguía así la vida de uno de los más notables ciudadanos de América, a quien le había correspondido por fuerza del destino desempeñarse como militar, jurista, estadista y esencialmente como el fundador civil de la república.⁷

Por las calendas en que se rinde este merecido homenaje a Francisco de Paula Santander en la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, también se conmemora en toda Colombia el centenario del natalicio del pensador provinciano, el humanista y combatiente permanente por la construcción de la paz y la preservación de la democracia. Otto Morales Benítez, de quien quiero recordar la magistral síntesis que hizo de lo que significó el pensamiento siempre vigente y oportuno de Santander, dijo:

La cercanía a la figura de Francisco de Paula Santander sirve para reclamar la fidelidad a las instituciones republicanas, para reiterar nuestra vocación civilista. Para insistir en la majestad y la necesidad del congreso. También para declarar que confiamos más en los errores colectivos de la democracia que en los poderes absolutistas. Que no nos entusiasma el providencialismo y estamos lejos de aceptar que las armas sean el único derrotero político para alinear nuestro ánimo arisco y tropical.

Se quiere decir, en síntesis, que pensamos más en la educación que en la represión y que amamos la ley sin delirio demagógico, pero sin dudar de que ésta lentamente ordena la conducta humana. Por todo ello nos podemos congregar al pie de las ideas del general Francisco de Paula Santander de sus enseñanzas de sus tesis que permanentemente van caminando hacia la claridad social, hacia el resplandor colectivo, haciendo de cada uno de estos principios conducta y destino de los hombres hacia el quehacer republicano para señalar el derrotero de la patria.⁸

Francisco de Paula Santander, insuperable como militar y cómo hombre público, convocó una pléyade de grandes repúblicos que fraguaron con el combatiente en lo cívico y en lo militar los cimientos de nuestra hoy sólida y grande nación colombiana a la cual nos hemos sentido siempre orgullosos de pertenecer e intentar servir desde las actividades educativas, jurídicas, políticas, empresariales y familiares que nos empeñamos en alentar y honrar para que desde nuestro anónimo y modesto ejercicio ciudadano, sirvan de ejemplo a las generaciones por venir que quieran preservar el estado de derecho, los regímenes de libertad, de construcción de paz y de adecuadas conductas personales.

Olympto Morales Benítez

Presidente

Academia Santanderista de Colombia

Bogotá, Torres del Este, 2020

⁷ Moreno de Ángel, Pilar (2019). *Santander*. Bogotá: Planeta Colombiana S. A.

⁸ Morales Benítez, Otto, citado en: Galindo, Julio Roberto. *El liberalismo en la historia*. Bogotá: Universidad Libre, 2017.

Original article

Genetic analysis of pre-Columbian human remains from Lower Magdalena suggests a migratory route and matrilineal genetic continuity in Northern South America

Análisis genético de restos humanos precolombinos del Bajo Magdalena sugiere una ruta migratoria y continuidad genética matrilineal en el norte de Suramérica

● María Claudia Noguera-Santamaría^{1,*}, ● Javier Rivera-Sandoval^{2,3},
● Juan Guillermo Martín², ● Ignacio Briceño-Balcázar⁴, ● Alberto Gómez-Gutiérrez¹

¹ Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
² Grupo de Estudios Patrimoniales del Caribe, Museo Mapuka, Departamento de Historia y Ciencias Sociales, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
³ Estación Científica Coiba AIP, Panamá
⁴ Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

Abstract

DNA analysis in pre-Hispanic populations remains has allowed approaching the genetic origins of inhabitants in present-day Colombia. In this work, we complemented the archaeological results on the Malambo tradition, originated 3000 years B.P. in Lower Magdalena, with genetic studies of bone remains of four individuals associated with this population. We extracted DNA from bone samples and purified and amplified them by PCR for further sequencing and phylogenetic analysis. We identified the B2j haplogroup in all individuals as characterized by a G16361A mutation, as well as a 9-pb deletion and diagnostic mutations of haplogroup B. This same haplogroup was recently described in an individual in Venezuela suggesting genetic maternal filiation and continuity in northern South America.

Keywords: Mitochondrial DNA; Haplogroup; Migration; Pre-Hispanic populations.

Resumen

El análisis del ADN en restos de poblaciones prehispánicas ha permitido aproximarse al origen genético de una proporción importante de los habitantes de la actual Colombia. Los resultados arqueológicos de la tradición de Malambo, cuyo origen se remonta a 3.000 años A.P. en el bajo Magdalena, se complementaron con estudios genéticos de cuatro individuos asociados con esta población. Para ello se extrajo ADN de muestras de dientes y huesos. El ADN extraído se purificó y se amplificó por PCR para su posterior secuenciación y análisis filogenético. El haplogrupo B2j se identificó y se caracterizó mediante la mutación G16361A, así como la delección de 9pb y las mutaciones diagnósticas del haplogrupo B. Este mismo haplogrupo fue descrito recientemente en un individuo en Venezuela, lo que sugiere la filiación genética matrilineal y su continuidad en el norte de Suramérica.

Palabras claves: ADN mitocondrial; Haplogrupo; Migración; Poblaciones prehispánicas.

Introduction

Northwestern South America is a key territory for population studies, as it constitutes a passage for both North-South and South-North migrations in the new continent. There have been recent attempts to identify how early settlements in the Colombian territory took place based on biological samples and the analysis of different molecular markers (Casas-Vargas, *et al.*, 2017; Díaz-Matallana, *et al.*, 2016; Noguera-Santamaría, *et al.*,

Citation: Noguera-Santamaría MC, Rivera-Sandoval J, Martín JG, *et al.* Genetic analysis of pre-Columbian human remains from Lower Magdalena suggests a migratory route and matrilineal genetic continuity in Northern South America. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172): 704-715, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.973>

Editor: Luis Fernando García

***Corresponding autor:**
María Claudia Noguera Santamaría;
m.noguera@javeriana.edu.co

Received: August 26, 2019

Accepted: June 4, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

2015; Noguera, *et al.*, 2014; Casas-Vargas, *et al.*, 2011; Jara, *et al.*, 2010; Uricoechea, *et al.*, 2010; Keyeux & Usaquén, 2008; Briceño, 2003; Keyeux, *et al.*, 2002; Noguera & Bernal, 2010).

Studies on pre-Hispanic populations (Casas-Vargas, *et al.*, 2011; Silva, *et al.*, 2008) have allowed an initial approach to human genetic variability in Colombia. However, although various archeological contexts have been identified in the Colombian north coast (Angulo-Valdés, 1954; 1981; 1983; 1988; Ramos & Archila, 2008; Rivera-Sandoval, 2018; Rojas-Sepúlveda & Martín, 2015), little is known about their genetic variability within the pre-Hispanic Caribbean region.

One of the most thoroughly studied areas in the Colombian Caribbean coast is the archaeological site of Malambo, near the Magdalena River. Its inhabitants settled and adapted to environmental determinants in Lower Magdalena around 3070±200 years B.P. Their crops and the use of water resources such as rivers and lakes can be deduced from the remains of typical archaeofauna in these ecosystems. This type of sustenance is associated with well-known ceramic structures in western Venezuela and the Orinoco River valley (Angulo, 1981, Langebaek, 1987, Meneses & Gordonés, 2005). However, there are some questions regarding the Malambo timeline and its associations with other archaeological sites in the region, some of which seem to differ from the periods proposed by Angulo (Langebaek, *et al.*, 1998, Langebaek & Dever, 2000). In fact, it has been suggested that Malambo's excavations belong to different occupations, some of which were interpreted as a single establishment (Langebaek & Dever, 2000), as verified by the detailed analysis of ceramics reported on the site since the incised modeling style known as the Malambo tradition is predominantly located in the deepest strata while the ceramics located in the superficial layers show similar characteristics to those of the indigenous settlements in the late period linked to the Malibú tradition between the 13th and 16th centuries (Rivera-Sandoval, 2018).

One aspect to consider about Malambo, besides its deep history, is its relationship with other contemporary communities established in distant regions and with those occupying the region at different times. Genetic analysis can be very helpful in order to answer these questions. Previous works have defined specific American lineages (A2, B2, C1b, 21, C1c, C1d, D1, D4h3) described as founding lineages (Figure 1), as well as the sub-haplogroups found in North, Central, and South America (A2a, A2b, C4c, D2A, D3, D4E1, X2a, X2g, A2ad, A2af1 B2i2, B2J, B2K, B2L C1b13, D1G, D1J) (Tamm, *et al.*, 2007; Perego, *et al.*, 2009; De Saint Pierre, *et al.*, 2012; Gómez-Carballa, *et al.*, 2012; Romero-Murillo, 2016). In this study, we selected a sample of four individuals from the Malambo site excavated by Angulo (1981): two middle-aged adults, one young adult, and

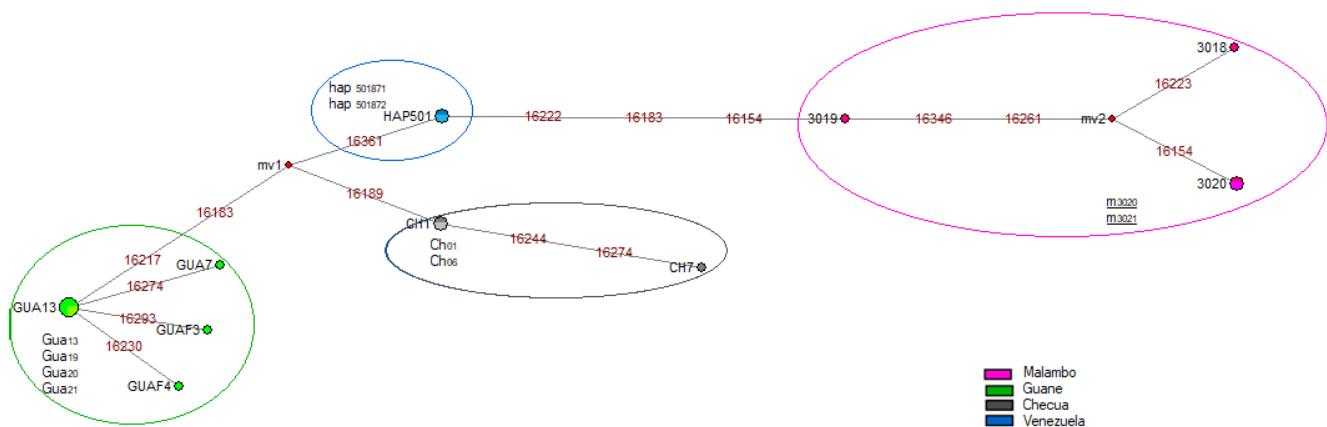


Figure 1. Phylogenetic network of haplogroup B (network v5.0). Pre-Hispanic individuals from Malambo are shown in pink.

one subadult. We analyzed and compared mitochondrial DNA with previous results in America (Tamm, *et al.*, 2007; Achilli, *et al.*, 2008; Fagundes, *et al.*, 2008; Perego, *et al.*, 2009) to reconstruct population dynamics of ancient and contemporary communities.

Materials and methods

Human bone remains

We analyzed human remains associated with four individuals of the Pre-Colombian population of Malambo (part of the MAPUKA Museum collection at Universidad del Norte in Barranquilla), specifically, three (3) dental samples corresponding to premolars in the adults and a sample of the costal arches from the sub-adult individual (**Table 1**). Despite being a reduced sample, it provided new data on the genetic affiliation of the ancient populations in the Colombian Caribbean that we expect to expand with new analyses in the future. The samples were processed and analyzed according to the existing legal protocols concerning archeological heritage as established by the *Instituto Colombiano de Antropología e Historia* (ICAHN) under the intervention license # 4977.

Authenticity criteria for Pre-Colombian DNA

To ensure the authenticity and fidelity of the genetic results, we adopted the criteria suggested by Cooper & Poinar (2000), i.e.: 1) Availability of a laboratory exclusive for this type of analysis (*Instituto de Genética Humana-IGH* at Pontificia Universidad Javeriana in Bogotá) and preparation of an independent pre-PCR laboratory in a separated area (first floor) in the IGH building to avoid contamination of pre-Hispanic and present samples; 2) amplification of negative and positive control groups; 3) sequencing of the same sample several times to confirm results; 4) availability of another specific laboratory for DNA analysis (at Universidad de la Sabana in Chía) to make independent replicas of selected samples; 5) strict aseptic conditions using disposable materials (coats, gloves, and masks). Additionally, each one of the areas and materials was irradiated with UV light before and after each procedure; 6) all investigators involved in the molecular study were typed for their mtDNA.

Sample preparation and DNA extraction, amplification, and sequencing

Ancient DNA extraction (aDNA) in bones and teeth. To avoid the presence of PCR inhibitors we used the following protocol for aDNA extraction: 1) Cleansing of bone or teeth was performed without pulverizing (scrapping of the sample by the external surface, 1.5% sodium hypochlorite immersion for five minutes, four to five 5-minute washes with ultrapure water type 1, and, finally, a 5-minute exposure to ultraviolet light). This standardized protocol was based on previously published recommendations (Bolnick, *et al.*, 2012; Korlevic, *et al.*, 2015) 2); we used K proteinase (12.5 mg/mL) for bone digestion, SDS 10%, and EDTA 0.5m.; 3) and left overnight for 72 hours. We used the salting-out method previously described and standardized by our group; 4) DNA was purified with QIAquick PCR Purification Kit.

DNA amplification and sequencing. We designed four pairs of overlapping primers and used them so that the whole mtDNA hypervariable 1 was covered; we obtained fragments of approximately 150-180 bp in each reaction. We used primers np 15986-16174, np 16105-

Table 1. Osteobiographical profile of Malambo pre-Hispanic population

Population	Individual	Sex	Age	Age group
Malambo	3018	Male	35-40 years	Middle adult
Malambo	3019	-	4.5-7 years	Infant
Malambo	3020	Male	33-45 years	Middle adult
Malambo	3021	Male	20-35 years	Young Adult

16256, np 16194-16360, and np 16261-16429 (**Table 2**). DNA was amplified utilizing a DNA polymerase master mix (Qiagen) containing 1.5 mM of MgCl₂, 200 uM of each dNTP, 2.5 units of Taq-DNA-polymerase, and 1x Qiagen PCR Buffer. Subsequently, 0.3 uM of each primer were added to each sample. The PCR products were visualized in 2% agarose gel, stained with GelRed® (Biotium), and sequenced in the Applied Biosystems® sequencer 3130.

Data analysis

For the alignment of sequences, we used the CLC Main Workbench (Qiagen). The hyper-variable region (HVR-I) nucleotides were aligned with a consensus sequence (Cambridge Reference Sequence –CRS–). We found the G16361A mutation recently described and confirmed in haplogroup B and sub-haplogroup B2j (**Gómez-Carballea, et al., 2012**). We confirmed these results using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with the HaeIII enzyme to identify the intergenic 9-bp deletion in the COII/tRNA(Lys) as previously reported for this haplogroup. Fragments were visualized in polyacrylamide gel at 45 volts for 3 hours (**Figure 2**).

Table 2. Primer sequences in the present study

Target region	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Reference
Control region 1 16,011-6,131	L 15,986	GCA CCC AAA GCT AAG ATT CTA ATT T	61.3°C	Present study
	H 16,174	CAG GTG GTC AAG TAT TTA TGG T		
Control region 2 16,127-6,229	L 16,105	TGC CAG CCA CCA TGA ATA TTG TAC	58°C	Present study
	H 16,256	TGC CAG CCA CCA TGA ATA TTG TAC		
Control region 3 16,194-6,360	L 16,194	ATG CTT ACA AGC AAG TAC AGC AA	62.4°C	Kemp, et al., 2007
	H 16,360	GAG AAG GGA TTT GAG TGT AAT GTG		
Control region 4 16,261-16,429	L 16,261	CCT CAC CCA CTA GGA TAC CAA CAA	62.4°C	
	H 16,429	GCG GGA TAT TGA TTT CAC GGA		
Haplogrup B (9-pb deletion)	L 8,196	ACA GTT TCA TGC CCA TCG TC	55°C	Present study

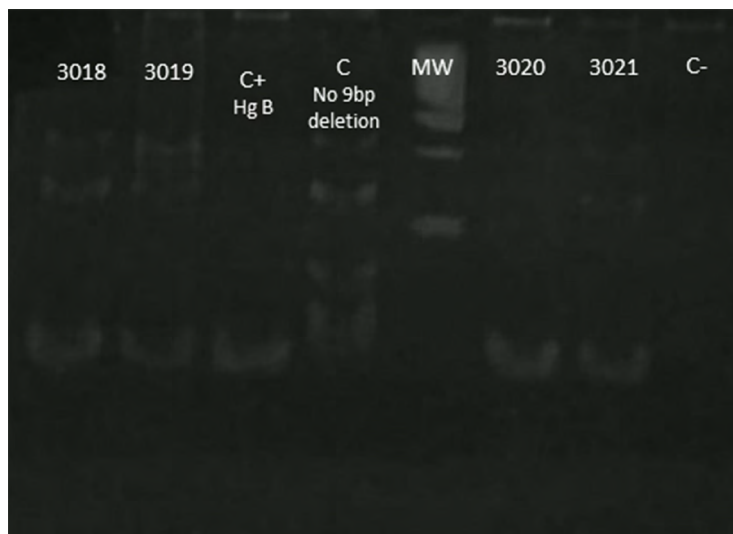


Figure 2. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) for haplogroup B in Malambo individuals 3018, 3019, 3020, and 3021

We calculated the frequency of the haplogroup obtained by direct count. The genetic diversity was calculated based on the variant frequency: $A_e = n / (n-1) = 1 - \sum \pi_i^2$, where π_i is the frequency of each allele (haplogroup) and n the size of the sample. Using the Arlequin 3.5.2 software, we analyzed the samples at intra- and inter-population levels by calculating their corresponding F_{ST} (Excoffier, *et al.*, 2005) to estimate the genetic distances. We analyzed the phylogenetic networks of pre-Colombian mtDNA sequences obtained from the literature using a median-joining algorithm (NJ).

Intrapopulation analysis. For the assignment of the mitochondrial haplogroups, we compared the DNA sequences with the CRS reference sequence and determined the specific polymorphisms for each American-Indian haplogroup according to Torroni, *et al.* (1992).

Interpopulation analysis. For this analysis, we compared genetic data obtained from present and antique populations both in Colombia and in America. Then, a phylogenetic reconstruction was performed based in the genetic distances between haplogroups applying the Tamura and Nei Method (1993). Reduced Median Networks were established to determine the genetic relationship between haplogroups found in this study and other populations, as calculated and distributed by the Network 5.0 program. (Figure 1).

Results

Mitochondrial haplogroup identification

We obtained high-quality DNA from four pre-Hispanic samples belonging to Malambo human remains and we identified a single haplogroup in all of them: haplogroup B2.

This haplogroup, together with haplogroups A, C, and D, is one of the founding genetic lineages in America and can be linked to the coastal North-South peopling of the Pacific Coast. This route has been associated with the first step of the integrated multi-step migration model of the early peopling process of Northeastern South America (Neves, *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2007; Reich, *et al.*, 2012; Rasmussen, *et al.*, 2014; Raghavan, *et al.*, 2015; Skoglund, *et al.*, 2015; Díaz-Matallana, *et al.*, 2016; Llamas, *et al.*, 2016; Lindo, *et al.*, 2017; Moreno-Mayar, *et al.*, 2018; Scheib, *et al.*, 2018). It is thought that these human groups advanced in a West-East direction from the Pacific Ocean and arrived to the inter-Andean valleys possibly locating themselves on the borders of the Magdalena and Cauca Rivers before continuing their migratory route (Díaz-Matallana, *et al.*, 2016). The model may correspond to the Malambo settlement according to the genetic closeness shown by this Colombian Caribbean population and other early groups from the central high plains of present-day Colombia, such as the Checua, site dated 8200±10 years B. P. (Groot, 1992) (Figure 1).

Haplogroup B2 is one of the most widely distributed haplogroups in the continent nowadays, which suggests genetic continuity since the Paleo-Americans up to the contemporary mestizo communities (Díaz-Matallana, *et al.*, 2016). Nevertheless, our results show a high genetic distance of 0.37258 between the Malambo and the Checua that may be due to the presence of specific sub-haplogroup B2j in all four Malambo samples, all associated to the mutation G16361A. This same mutation was recently described in an individual from Venezuela, far from the Checua and relatively near the Malambo (Gómez-Carballea, *et al.*, 2012).

Georeferencing

We used Google Maps to draw a map using the longitude and latitude references for each location where the samples were reported (Figure 3).

Discussion

Lower Magdalena is a geographically and culturally diverse region. To determine whether such diversity could be associated with the biological composition of the ancient human groups that settled in this region of the Caribbean, we carried out a

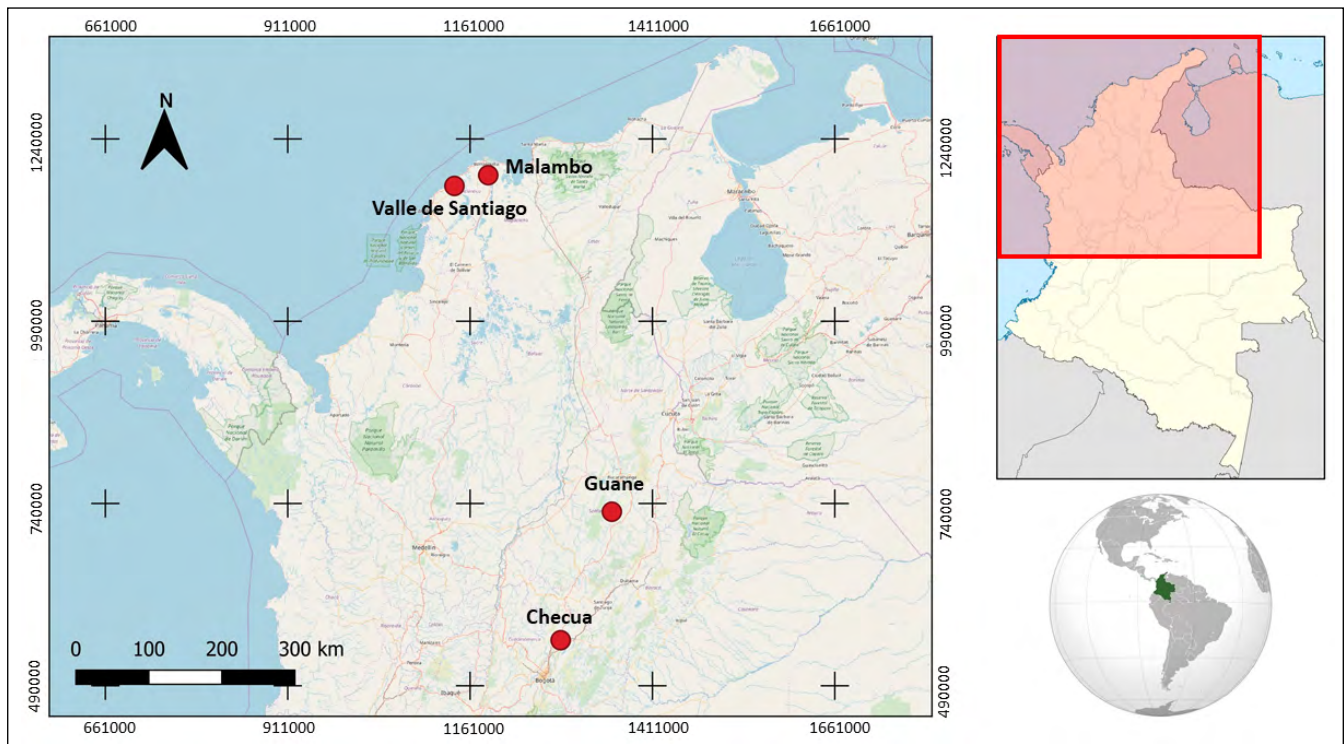


Figure 3. Geographical location of pre-Columbian groups referred in this study

genetic analysis of available bone and teeth remains. Based on our preliminary results with ancient DNA (aDNA), we found no evidence of population variability among the indigenous groups that settled in this region compared to other contemporary communities. Using bioarcheological and genetic results, we conducted a multi-variant analysis integrating the different data to correlate each result. We used the SPSS version 1.8 software for the analysis and generated a genetic distance matrix based on the F_{ST} data; we also performing a principal component analysis (PCA) using haplogroup frequencies obtained upon the comparison of data from the present study with previously reported archeological populations of Colombia. For comparative purposes, we chose samples from Checua, Guane, and Valle de Santiago sites: the Checua are one of the oldest populations of Colombia while the Guane correspond to an indigenous group who inhabited the municipalities of Los Santos, Jordán, and Cabrera in the Northwestern department of Santander and the Valle de Santiago, a native population of the Lower Magdalena region (**Figure 4, Tables 3 and 4**).

Human groups established in Malambo around 3120 years B.P. started a new model of settlement in the region and promoted horticulture including tuber cultigens such as cassava (**Angulo, 1981; Groot, 1989**). From an archeological perspective, this subsistence pattern, as well as the pottery style identified in Malambo, have been closely related to populations in the Venezuelan Orinoquia, specifically the Barrancoid series (**Angulo, 1981; Langebaek, 1987; Langebaek & Dever, 2000; Menezes & Godonés, 2005; Sanoja, 1978**). The results regarding the genetic distances at an interpopulation level seem to confirm the relationship proposed from the archeological perspective, specifically with the identification of sub-haplogroup B2j, which has been reported among present Venezuelan populations and indicates that this sub-haplogroup could be traced back in Northern South America up to approximately 3900 years B.P. (**Gómez-Carballa, et al., 2012**). This date approaches the earliest occupation of the archeological site of Malambo, i.e., 3070±200 years B.P. (**Angulo, 1981**).

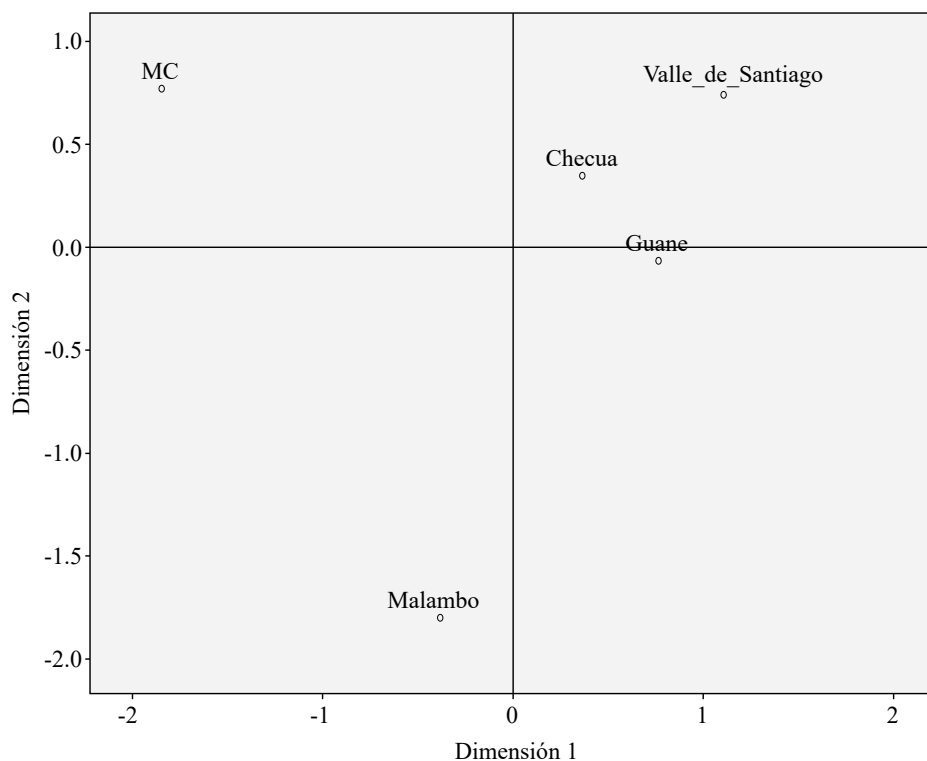


Figure 4. Principal Component Analysis (PCA) of Malambo, Valle de Santiago, Guane, and Checua communities. Individual MC corresponds to the experimental researcher of the present work.

Table 3. Genetic distance matrix based on F_{ST} data from pre-Columbian individuals belonging to Checua, Guane, and Malambo populations

	CHECUA	GUANE	MALAMBO	CONTROL
Checua	0	0,11141	0,37258	0,50036
Guane	0,11141	0	0,36727	0,6237
Malambo	0,37258	0,36727	0	1
Control	0,05292	0,07636	1,00000	0

Table 4. Genetic mutations in pre-Columbian Malambo and contemporary individuals. MCN corresponds to the experimental researcher of the present work.

Population	Sample	16069	16126	16145	16154	16166	16167	16172	16183	16189	16217	16222	16223	16261	16346	16361	Haplotype	Haplogroup
Reference	Cambridge	C	T	G	T	A	A	T	A	T	T	C	C	C	G	G	rCRS	H2a2a1
Malambo	3018				154A							222T	223T	261T	346C	361A	H1	B2j
	3019				154A							222T		261C	346G	361A	H2	B2j
	3020												223C	261T	346C	361A	H3	B2j
	3021											222T		261T	346C	361A	H4	B2j
Caracas/ Venezuela	HAP71								183C								H5	B2j
Pueblo llano/ Venezuela	HAP72								183C								H5	B2j
Researcher	MCN	69T	126C	145A					172C			222T		261T	346A		HJ	J1b1a

A predominance of the founding American mitochondrial haplogroups (A-D) has been reported in Colombia (Silva, *et al.*, 2008; Casas-Vargas, *et al.*, 2011; Noguera, *et al.*, 2015; Díaz-Matallana, *et al.*, 2016; Casas-Vargas, *et al.*, 2017). In contemporary populations, the most frequent haplogroup is A (48.3%), one of the most common in Mesoamerica, which supports those models proposing early Chibchan linguistic group migrations from Mesoamerica to South America. Haplogroup C (28.4%) has also been found in previous studies and, less frequently, haplogroups B (16%) and D (6%) (Noguera, *et al.*, 2015). Population dynamics among the Paleo-Colombian populations has been somewhat different: in the Cundi-Boyacense high plains, a predominance of haplogroups A and B has been reported (Casas-Vargas, *et al.*, 2017; Silva, *et al.*, 2008), as well as a higher frequency of haplogroup B in different Colombian regions with the continued presence of diverse haplogroups such as the B2 and the C1 in the Andes region (Díaz-Matallana, *et al.*, 2016), Norte de Santander (Romero-Murillo, 2016), and Santander (Casas-Vargas, *et al.*, 2011).

We identified haplogroup B2 in all four individuals of the Malambo population. This haplogroup is widely distributed in the American continent, which has been interpreted as evidence of the genetic continuity that endures since the first settlers up to contemporary mestizo populations (Díaz-Matallana, *et al.*, 2016). Thus, haplogroup B2 has been associated with the founding genetic lineages in the continent along with haplogroups A, C, and D, which would be supported by the integrated migration model of the early populating of northwestern South America as evidenced by genetic, geological, archeological, and anthropological findings. This model proposes that the first settlers of northern South America migrated across the coastal route of the Pacific Ocean. It is assumed that these groups moved sequential movements through the Andes in a West-East direction across the Cauca and Magdalena Rivers valleys where they found the advantage of easy feeding resources and were also used as fluvial migratory routes (Díaz-Matallana, *et al.*, 2016). This influenced adaptation strategies and settlements in these ecosystems directly.

A specific sub-haplogroup B2j was identified in individuals from the archaeological Malambo site and also reported across the Venezuelan Caribbean northern coastline with no reference to the maternal ancestry (Gómez-Carballa, *et al.*, 2012). The G16361A mutation present in all four individuals has been confirmed as a diagnostic mutation for this sub-haplogroup. Based on this coincidence, even with the inherent limitations of a preliminary analysis of only four pre-Columbian individuals and their comparison with only one individual in contemporary Venezuela, we can postulate both a maternal affiliation and a migration process to or from the Orinoco River valley down or up the Lower Magdalena territories. This relationship amongst pre-Hispanic populations of the Colombian Caribbean and Lower Orinoco may also be confirmed by comparing the ceramic styles identified by archeologists in Malambo (Colombia) and Barrancas (Venezuela). These sites share some stylistic designs that seem to belong to the same cultural tradition established in the Caribbean from 3070±200 years B.P. up to 1270±150 years B.P. (Angulo, 1981; Sajona, 1978).

Sub-haplogroup B2j is characterized by T131C, A183G, C5270T, A15824T, A16166G, A16183C, G16361A, and T16519G mutations. Its coalescence age was estimated at 3.9 ky (95% C.I.: 0-7.8) and, as such, it has been considered a recent clade within the phylogenetic tree of haplogroup B (Gómez-Carballa, *et al.*, 2012). This coalescence age coincides with the earliest occupational period reported for Malambo. Even so, the population of Malambo is differentiated from the Guane and the Checua in that it presents the specific G16361A mutation associated with the B2j sub-haplogroup identifying the Malambo as a whole separate group.

On the other hand, continuity in these sites of occupation might have been much wider than what has been registered up to this moment with an incidence in genetic relationships of the Lower Magdalena populations. Even if specific cultural tradition and lifestyle have been identified for the Malambo group, recent radiocarbon analysis in bone samples from a particular individual of this study (individual 3018) dated this individual between 1405 and 1445 A.D. [573-613 B.P.] (Rivera-Sandoval, 2018). This chronology is linked to the

late period groups characterized by a very similar ceramic style as compared with the most superficial layers in Malambo (Angulo, 1981). This has also been reported in other sectors of Lower Magdalena (Angulo, 1955; 1983; 1988; Ramos & Archila, 2008; Rivera-Sandoval, 2018). These ceramics have also been associated with Malibú populations (Falchetti, 1993) differing from Malambo's incised modeling decoration but with similar technological features in the paste composition and clay temper.

Although the coincidence of the G16361A mutation corresponding to a B2j sub-haplogroup could result from an independent mutational event, the geographical proximity in northern South America of the corresponding individuals within +500 years suggests a matrilineal genetic continuity among Lower Magdalena populations. This eventual biological continuity might not necessarily be reflected on the cultural traditions represented in the type of cultural material present in the archeological archives nor in the sustenance ecosystems and resource exploitation, which during the *late period* were oriented to the exploitation of corn and other plants, hunting, and fishing, as well as fauna recollections associated to rivers and lakes. Genetics would thus offer new data for bioarchaeological studies in the New World, including the eventual maternal filiation and continuity of northern South American populations with the presence of genetically related individuals who underwent cultural mutations as demonstrated by their ceramic vessels.

Conclusions

Our data support the importance of aDNA contribution to archeological studies as they are complemented with further evidence to reconstruct mobility patterns and relationships between ancient pre-Hispanic groups in this region of South America. We implemented non-disruptive DNA cleansing showing a high reproducibility of results for every DNA extraction, which allowed a confident mitochondrial DNA analysis of several bone fragments.

Out of the four mitochondrial haplogroups (A, B, C, and D) previously assigned to the first settlers in America, i.e., an exclusive presence of B lineage, was determined in all four samples of the Malambo archeological site showing a strong association with a modern contemporary individual in Venezuela who shared the B2j sub-haplogroup. This preliminary finding in five individuals (four pre-Columbian Malambo and one 20th century mestizo from Venezuela) can be associated with possible migratory routes, contacts, and exchanges that could have occurred in the last 3000 years as, from a molecular genetic perspective, they adjust to the coalescence age of the corresponding mutations. However, it is necessary to integrate the genetic data with additional genetic markers in these four pre-Columbian individuals and further contextualize this information with archeological data.

Acknowledgements

The authors would like to thank our supporting institutions and the *Instituto Colombiano de Antropología e Historia*–ICANH for allowing us to access and process the human pre-Hispanic samples under authorization No. 4977, as well as José Vicente Rodríguez and Carl Langebaek for helpful discussions.

Authors contribution

MCNS, experimental procedures and analyses, elaboration of the first draft of the manuscript; JRS, sample selection, bioanthropological and archaeological contextualization; JGM, sample selection, bioanthropological and archaeological contextualization; IBB, design of the study, analysis of results; AGG, design of the study, analysis of results, writing of the final manuscript.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

References

- Angulo-Valdés, C.** (1951). Arqueología de Tobará. *Divulgaciones Etnológicas*. **2** (3): 7-61.
- Angulo Valdés, C.** (1981). La tradición Malambo. Un complejo temprano en el Noroeste de Suramérica. Bogotá: Fundación de investigaciones Arqueológicas Nacionales. Banco de la República. 204 p.
- Angulo-Valdés, C.** (1983). Arqueología del Valle de Santiago. Norte de Colombia. Bogotá: Fundación de investigaciones Arqueológicas Nacionales. Banco de la República; 196 p.
- Angulo-Valdés, C.** (1988). Guájaro en la arqueología del norte colombiano. Bogotá: Fundación de investigaciones Arqueológicas Nacionales. Banco de la República; 198 p.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A.** (2017). Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol. Evol.* 1999. **16** (1): 37-48.
- Casas-Vargas, A., Romero, L., Usaquén, W., Zea S., Silva M., Briceño I.** (2017). Diversidad del ADN mitocondrial en restos óseos prehispánicos asociados al templo del sol en los Andes orientales colombianos. *Biomédica*. **37** (4): 548-60. Doi: 10.7705/biomedica.v37i4.3377
- Casas-Vargas, A., Gómez, A., Briceño I, Díaz-Matallana, M., Bernal, J., Rodríguez, J.V.** (2011) High genetic diversity in a sample of bone remains from an ancient pre-Columbian rock shelter in territory of Guane. *Am J Phys Anthropol* **146** (4): 637-49. Doi:10.1002/ajpa.21626
- Cooper, A. & Poinar, H.N.** (2000) Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*. **289** (5482): 1139.
- Díaz-Matallana, M., Gómez, A., Briceño, I., Rodríguez, J.V.** (2016) Genetic analysis of Paleo-Colombians from Nemocón, Cundinamarca, provides insights on the early peopling of Northwestern South America. *Rev Acad Col Cien Ex Fis Nat.* **40** (156): 461-83. Doi: 10.18257/raccefyn.32
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S.** (2005). Arlequín ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. **1**: 47 -50.
- Falchetti, A.M.** (1993). La tierra del oro y el cobre: parentesco e intercambio entre comunidades orfebres del norte de Colombia y áreas relacionadas. *Boletín del Museo del Oro*. **34-35**: 3-75.
- Gómez-Carballa, A., Ignacio-Veiga, A., Álvarez-Iglesias, V., Pastoriza-Mourelle, A., Ruiz, Y., Pineda, L., Carracedo, A., and Salas, A.** (2012). A Melting Pot of Multicontinental mtDNA Lineages in Admixed Venezuelans. *Am J Phys Anthropol*. **147** (1): 78-87. Doi: 10.1002/ajpa.21629
- Groot, A.M.** (1989). La costa Atlántica. En: Botiva A. (compilador). *Colombia Prehispánica: regiones arqueológicas*. Bogotá: Colcultura – Instituto Colombiano de Antropología. p. 19-39.
- Groot, A.M.** (1992). Chechua. Una secuencia cultural entre 8500 y 3000 años antes del presente. Bogotá: Fundación de Investigaciones Arqueológicas Nacionales. 99 p.
- Herrera de Turbay, L.** (1985). Agricultura aborigen y cambios de vegetación en la Sierra Nevada de Santa Marta. Bogotá: Fundación de Investigaciones Arqueológicas Nacionales. Banco de la República. 258 p.
- Jara, N.P., Díaz, M., Villegas, V., López de Mesa, C., Torres, D., Bernal, J., Gómez, A., Briceño, I.** (2010). Application of authenticity criteria in mitochondrial studies on archaic bone remains from a prehispanic Muisca population. *Colombia Médica*. **41** (4): 306-14.
- Keyeux, G. & Usaquén, W.** (2008). Rutas migratorias hacia Suramérica y el poblamiento de las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco deducidas a partir de estudios genéticos moleculares. En: Morcote G, Mora S, Calvo CF, editores. *Pueblos y paisajes antiguos de la selva amazónica*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. p. 49-62.
- Keyeux, G., Rodas, C., Gelvez, N., Carter, D.** (2002). Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian populations. *Hum Biol*. **74** (2): 211-33. Doi: 10.1353/hub.2002.0022
- Langebaek, C.** (1987). La cronología de la región arqueológica Tairona vista desde Parare, Municipio de Ciénaga. *Boletín de Arqueología*. **2** (1): 83-101.
- Langebaek, C., Cuéllar, A., Dever, A.** (1998). Medio ambiente y poblamiento en la Guajira: investigaciones arqueológicas en el Ranchería Medio. Bogotá: Universidad de los Andes. 114 p.
- Langebaek, C. & Dever, A.** (2000). Arqueología del Bajo Magdalena. Estudio de los primeros agricultores del Caribe colombiano. Bogotá: ICANH. 92 p.
- Lindo, J., Achilli, A., Perego, U.A., Archer, D., Valdiosera, C., Petzelt, B., Mitchell, J., Worl, R., Dixon, E.J., Fifield, T.E., Rasmussen, M., Willerslev, E., Cybulski, J.S., Kemp, B.M., DeGiorgio, M., Malhi, R.S.** (2017). Ancient individuals from the North American Northwest Coast reveal 10,000 years of regional genetic continuity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**: 4093-4098. Doi: 10.1073/pnas.1620410114pmid:28377518

- Llamas, B., Fehren-Schmitz, L., Valverde, G., Soubrier, J., Mallick, S., Rohland, N., Nordenfelt, S., Valdiosera, C., Richards, S.M., Rohrlach, A., Haak, W.** (2016). Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. *Sci. Adv.* **2**: e1501385–e1501385. Doi:10.1126/sciadv.1501385pmid:27051878
- Meneses, L.E. & Gordones, G.** (2005). Planteamientos arqueológicos para la comprensión de la historia aborigen de la cuenca del Lago de Maracaibo. *Boletín Antropológico.* **23** (65): 295-323.
- Moreno-Mayar, J.V., Potter, B.A., Vinner, L., Steinrücken, M., Rasmussen, S., Terhorst, J., Kamm, J.A., Albrechtsen, A., Malaspina, A.-S., Sikora, M., ... , Willerslev, E.** (2018). Terminal Pleistocene Alaskan genome reveals first founding population of Native Americans. *Nature.* **553**: 203-207. Doi: 10.1038/nature25173pmid:29323294
- Neves, W.A. & Hubbe, M.** (2005). Cranial morphology of early Americans from Lagoa Santa, Brazil: Implications for the settlement of the New World. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 18309-18314. Doi:10.1073/pnas.0507185102pmid:16344464
- Noguera-Santamaría, M.C., Anderson, C.H., Uricoechea, D., Durán, C., Briceño-Balcázar, I., Bernal-Villegas, J.E.** (2015). Mitochondrial DNA analysis suggests a Chibchan migration into Colombia. *Universitas Scientiarum.* **20** (2): 261-78. Doi: 10.11144/Javeriana.SC20-2.mdas
- Noguera, M.C., Briceño Balcázar, I., Bernal Villegas, J.** (2014) Grado de miscegenación de poblaciones afrodescendientes del caribe colombiano mediante estudios de linajes de cromosoma Y. *Laboratorio Actual.* **45**: 32-37.
- Noguera, M. & Bernal, J.** (2010). Variación en el DNA mitocondrial (mtDNA) de poblaciones indígenas colombianas contemporáneas. *Laboratorio Actual.* **26** (42): 32-34.
- Perego, U.A., Achilli, A., Angerhofer, N., Accetturo, M., Pala, M., Olivieri, A., Hooshiar-Kashani, B., Ritchie, K.H., Scozzari, R., Kong, Q.P., Myres, N.M., Salas, A., Semino, O., Bandelt, H.J., Woodward, S.R., Torroni, A.** (2009). Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol.* **19** (1): 1-8. Doi: 10.1016/j.cub.2008.11.058
- Raghavan, M., Steinrücken, M., Harris, K., Schiffels, S., Rasmussen, S., DeGiorgio, M., Albrechtsen, A., Valdiosera, C., Ávila-Arcos, M.C., Malaspina, A.-S., Willerslev, R.** (2015). Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science.* **349**: aab3884–aab3884. Doi: 10.1126/science.aab3884pmid:26198033
- Ramos, E. & Archila, S.** (2008). *Arqueología y subsistencia en Tubará, Siglos IX-XVI.* Bogotá: Universidad de Los Andes. 190 p.
- Rasmussen, M., Anzick, S.L., Waters, M.R., Skoglund, P., DeGiorgio, M., Stafford Jr., T.W., Rasmussen, S., Moltke, I., Albrechtsen, A., Doyle, S.M., Willerslev, E.** (2014). The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. *Nature.* **506**: 225-229. Doi: 10.1038/nature13025pmid:24522598
- Reich, D., Patterson, N., Campbell, D., Tandon, A., Mazieres, S., Ray, N., Parra, M.V., Rojas, W., Duque, C., Mesa, M., García, L.F., Ruiz-Linares, A.** (2012). Reconstructing Native American population history. *Nature.* **488**: 370-374. Doi: 10.1038/nature11258pmid:22801491
- Reichel-Dolmatoff, G.** (1986). *Arqueología de Colombia: un texto introductorio.* Bogotá: Editorial ARCO. 281 p.
- Rojas-Sepúlveda, C. & Martín, J.** (2015). Bioarchaeology of the Bajo Magdalena, North of Colombia, South América. *Rev. colomb. antropol.* **51** (2): 89-120.
- Rivera-Sandoval, J.** (2018). Nuevos datos sobre la cronología de los pueblos del Bajo Magdalena en el periodo Formativo Tardío: El sitio de Barrio Abajo, Barranquilla (Colombia). *Arqueología Iberoamericana.* **40**: 3338. <http://purl.org/aia/4004>. Date of access: 23-07-2020.
- Romero-Murillo, L.** (2016). Análisis de ADN mitocondrial a partir de restos óseos antiguos de la población precolombina chitarera de norte de Santander. Tesis de Maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 82 p.
- Sanoja, M.** (1978). El desarrollo de los sistemas de producción en la Venezuela Prehispánica. *Revista Española de Antropología Americana.* **8**: 55-91.
- Scheib, C.L., Li, H., Desai, T., Link, V., Kendall, C., Dewar, G., Griffith, P.W., Mörseburg, A., Johnson, J.R., Potter, A., Kerr, S.L., Kivisild, T.** (2018). Ancient human parallel lineages within North America contributed to a coastal expansion. *Science.* **360**: 1024-1027. Doi: 10.1126/science.aar6851pmid:29853687
- Silva, A., Briceño, I., Burgos, J., Torres, D., Villegas, V., Gómez, A., Bernal, J., Rodríguez, J.V.** (2008). Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del periodo Herrera en la sabana de Bogotá. *Biomédica.* **28** (4): 569-77. Doi: 10.7705/biomedica.v28i4.62

- Skoglund, O., Mallick, S., Bortolini, M.C., Chennagiri, N., Hünemeier, T., Petzl-Erler, M.L., Salzano, F.M., Patterson, N., Reich, D.** (2015). Genetic evidence for two founding populations of the Americas. *Nature*. **525**: 104-108. pmid: 26196601
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D., Mulligan, C., Bravi, C., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Khusnutdinova, E., Fedorova, S., Golubenko, M., Stepanov, V., Gubina, M., Zhadanov, S., Ossipova, L., Damba, L., Voevoda, M., Dipierri, J., Villem, R., Malhi, R.** (2007). Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One*. **2** (9): e829. Doi: 10.1371/journal.pone.0000829
- Uricoechea D.** (2010). Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos humanos óseos prehispánicos encontrados en Jericó, Boyacá, Colombia. Tesis de Biología. Bogotá: Universidad El Bosque. 136 p.
- Wang, S, Lewis Jr., C.M., Jakobsson, M., Ramachandran, S., Ray, N., Bedoya, G., Rojas, W., Parra, M.V., Molina, J.A., Gallo, C., Mazzotti, G., Poletti, G., Hill, K., Hurtado, A.M., Labuda, D., Klitz, W., Barrantes, R., Bortolini, M.C., Salzano, F.M., Petzl-Erler, M.L., Tsuneto, L.T., Llop, E., Rothhammer, F., Excoffier, L., Feldman, M.W., Rosenberg, N.A., Ruiz-Linares, A.** (2007). Genetic Variation and Population Structure in Native Americans. *PLoS Genet* **3** (11): e185. Doi: 10.1371/journal.pgen.0030185

Artículo de revisión

Estudio del semiconductor magnético ZnO dopado con Fe obtenido por aleamiento mecánico

Study of the magnetic semiconductor of the Fe-doped ZnO system obtained by mechanical alloy

✉ Ligia E. Zamora

Departamento de Física y Centro de Excelencia de Nuevos Materiales, CENM,
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Artículo de posesión para admisión como miembro correspondiente a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Resumen

El sistema ZnO dopado con Fe presenta buenas propiedades como semiconductor magnético diluido para aplicaciones en espintrónica. En este artículo se hace una revisión de algunas propiedades estructurales y magnéticas del ZnO dopado con Fe. Inicialmente, se hace un resumen de los conceptos básicos para entender en qué consiste la espintrónica y sus posibles aplicaciones. Posteriormente, se presenta el estudio de dicho sistema mediante difracción de rayos X, espectroscopía Mössbauer y magnetometría de muestra vibrante en muestras obtenidas por aleamiento mecánico en diferentes condiciones de preparación. En la primera se aumentó la concentración de Fe de 3 a 10 % en un tiempo de molienda de 36 horas y una relación entre el peso de las bolas y el peso de los elementos (relación de peso bolas-polvo, RPB) de 15:1. En este caso se probó que hubo una concentración límite de Fe, aproximadamente de 5 %, que se diluyó dentro de la red del ZnO; el resto del Fe apareció segregado en la muestra. En la segunda condición se fijó la concentración de Fe en 10 % y se variaron las horas de molienda. Se encontró que después de 24 horas, la muestra se consolidó, pero el Fe no se diluyó completamente dentro de la red de ZnO. Por último, usando una concentración de 10 % en Fe y aumentando la RPB se encontró que todos los átomos de Fe se diluyeron dentro de la fase de ZnO y no quedaron segregados de Fe en la muestra, lo que se explica porque al aumentar la relación RPB aumenta la energía.

Palabras clave: Espintrónica; Semiconductores magnéticos diluidos; Magnetorresistencia gigante.

Abstract

The Fe-Doped ZnO system has good properties as a diluted magnetic semiconductor for spintronic applications. In this article, a review of some structural and magnetic properties of Fe-Doped ZnO is presented. Initially, a summary of the basic concepts is made to understand the spintronics concepts and their possible applications and, subsequently, the study of the Fe-Doped ZnO in samples obtained by mechanical alloy under different preparation conditions. Characterizations were made by means of X-ray diffractometry, Mössbauer spectroscopy, and vibrating sample magnetometry. The first preparation condition was an increase in the Fe concentration from 3 to 10 at % with 36 hours of milling time and a 15: 1 ball-to-powder weight ratio (BPR). In this case, there was a limited Fe concentration of approximately 5 % that was diluted into the ZnO matrix while the rest of Fe was segregated in the sample. For the second preparation condition, the Fe concentration was fixed at 10% and the milling time was varied. After 24 hours of milling, the sample was consolidated, but the Fe was not completely diluted into the ZnO matrix. Finally, using a 10% Fe concentration and increasing the BPR, all the Fe atoms were diluted in the ZnO phase without the presence of Fe segregates in the sample.

Keywords: Spintronics; Diluted magnetic semiconductors; Giant magnetoresistance.

Citación: Zamora, L.E. Estudio del semiconductor magnético ZnO dopado con Fe obtenido por aleamiento mecánico. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):716-728, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1130>

Editor: Gabriel Téllez

Correspondencia:

Ligia E. Zamora;
ligiazamora@correounivalle.edu.co

Recibido: 17 de diciembre de 2019

Aceptado: 3 de junio de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Introducción

La espintrónica es un campo de investigación relativamente nuevo cuya importancia ha ido creciendo debido a sus potenciales aplicaciones tecnológicas. El objetivo básico de la espintrónica es el de descubrir nuevos fenómenos que involucren tanto la carga como el espín del electrón, así como explorar posibles aplicaciones en dispositivos electrónicos. Se espera que estos dispositivos tengan nuevas funcionalidades y mejores rendimientos (**Wolf, et al., 2001**), por ejemplo, que con el uso del espín del electrón las memorias magnéticas o los computadores cuánticos incrementen su velocidad y su eficiencia y disminuyan el consumo de energía comparados con los dispositivos que solo utilizan la información eléctrica del electrón.

En la actualidad hay computadores que ya cuentan con materiales espintrónicos, por ejemplo, en las cabezas lectoras de los discos duros, ya que utilizan el fenómeno de la magnetorresistencia gigante (MRG). La espintrónica surge en 1988, precisamente con la publicación del primer artículo sobre MRG (**Baibich, et al., 1988**), merecedor del Premio Nobel de Física en el 2007 para Albert Fert y Peter Grünberg (**Binasch, et al., 1989**). La MRG utiliza el espín de los electrones en la conducción eléctrica en una multicapa magnética compuesta de capas ferromagnéticas y no magnéticas. Los experimentos originales se hicieron en multicapas de Fe/Cr en las que se reportó que un campo aplicado generaba una magnetorresistencia muy grande e inducía un acoplamiento antiparalelo entre las capas de Fe. Además, se habían publicado estudios teóricos sobre la utilización del espín y la corriente de los electrones (**Fert, et al., 1968**; **Loegel, et al., 1971**) antes del descubrimiento de la MRG.

Por otro lado, **Ohno (1998)** propuso un método para inducir magnetismo en materiales semiconductores. Un semiconductor, que no es magnético, se dopa con bajas concentraciones de átomos magnéticos (<10 %) dando lugar a los llamados semiconductores magnéticos diluidos (SMD). Estos SMD han suscitado un creciente interés debido a la posibilidad de obtener ferromagnetismo a temperatura ambiente y aplicarlos en dispositivos espintrónicos. El objetivo es conservar las propiedades eléctricas del semiconductor y, además, crear una interacción magnética entre los dopantes magnéticos. Posteriormente, se predijo teóricamente la existencia de magnetismo al dopar ZnO, que es un semiconductor, con Mn, que es un material magnético (**Dietl, et al., 2000**). A partir de esta publicación han aparecido varios estudios en los que el ZnO es dopado con diferentes átomos magnéticos, como Mn, Co, Cr y Ni (**Prellier, et al., 2003**; **Sharma, et al., 2004**; **Ahmed, 2017**; **Alsaad, 2014**; **Ghosh, et al., 2019**). También se ha investigado la posibilidad de dopar ZnO con átomos de Fe y se sabe que el ferromagnetismo que surge en estos sistemas depende de los diferentes métodos de preparación y de las concentraciones (**Karmakar, et al., 2007**; **Zhang, et al., 2007**; **Fan, et al., 2010**; **Lin, et al., 2007**; **Straumal, et al., 2013**; **Ramos, et al., 2014**; **Kumar, et al., 2014**; **Beltrán, et al., 2015**; **Zamora, et al., 2015**; **Casanova, et al., 2018**). Además de los estudios sobre su potencial eléctrico y magnético, también se han reportado estudios sobre el ZnO dopado con Fe en el campo de la óptica (**Elilarassi, et al., 2017**; **Beatriz, et al., 2019**; **Ghosh, et al., 2019**), específicamente para aplicaciones en espintrónica.

El presente artículo está organizado de la siguiente forma: primero, se hace una introducción sobre la espintrónica en la que se presentan las posibles aplicaciones y los conceptos básicos; segundo, se hace una breve presentación de la magnetorresistencia gigante (MRG); tercero, se hace una revisión de las teorías sobre magnetización en semiconductores magnéticos diluidos y, por último, se hace una revisión sobre el comportamiento de ZnO dopado con Fe utilizando la técnica del aleamiento mecánico, trabajo este realizado en la Universidad del Valle.

Fenómenos básicos en espintrónica

La principal motivación para investigar la espintrónica es aprovechar al espín del electrón teniendo en cuenta que la carga del electrón se utiliza en los equipos electrónicos, específicamente en los transistores, que son muy utilizados en los computadores.

Componentes de un computador

Componentes electrónicos

El procesador es una parte del computador compuesto por una gran cantidad de transistores. Hay dos aspectos importantes que deben considerarse con respecto a los transistores: primero, su tamaño, que se ha ido reduciendo con el paso de los años a la vez que su rendimiento es cada vez mayor. Desde el 2000, cuando tenían un tamaño de 180 nm, alcanzaron tamaños de 2,5 nm en el 2018 y se espera que en un futuro sean aún más pequeños (Matheson, 2018; Saracco, 2019; Webedia Branded Content Team, 2019), aunque, en la práctica, los computadores actuales utilizan transistores de 14 nm. El segundo aspecto es el conocido como la ley de Moore (Moore, 1965), la cual postula que el número de transistores que caben en un circuito integrado se dobla cada 18 meses; esta ley, inicialmente aplicada entre 1965 y 1975, sigue siendo representativa para la empresa Intel, cuyos representantes aseguran que se seguirá cumpliendo hasta el 2023, con la lógica reducción de costos. Un ejemplo del funcionamiento de esta ley es el procesador Intel Core i9 del 2017, el cual contenía 2.600 millones de transistores. El objetivo final en este campo es la reducción cada vez mayor del tamaño de los transistores y la consiguiente disminución del consumo de energía.

Componentes magnéticos

Además de los componentes eléctricos, un computador está compuesto por muchos elementos magnéticos: desde el disco duro hasta el ventilador del computador funcionan a partir de materiales magnéticos. Todo lo relativo a la grabación, la lectura y el almacenamiento de datos se hace por medios magnéticos. Con respecto a la grabación magnética, la primera propiedad que se busca es que la información guardada sea mucha y utilice poco espacio. La otra propiedad deseable es que la información se mantenga con los años y que no se borre fácilmente. El objetivo es que los componentes magnéticos sean cada vez más pequeños, que almacenen cada vez más información y que esta no se borre fácilmente. En la **tabla 1** se relacionan las ventajas de utilizar las componentes magnéticas y las componentes eléctricas en un computador.

Objetivo principal de la espintrónica

Los componentes eléctricos utilizan la carga del electrón, en tanto que los componentes magnéticos utilizan el espín del electrón. El objetivo principal de lo que se conoce como espintrónica es combinar lo mejor del aspecto eléctrico y del aspecto magnético del electrón de forma tal que se puedan obtener efectos novedosos y diferentes que los de la electrónica convencional. Se trata de usar el grado de libertad que tiene el espín en corrientes polarizadas buscando que el electrón utilice su carga y su espín al mismo tiempo para reducir el número de componentes necesarios en un computador. En otras palabras, tener en un solo componente la información magnética guardada y, además, que se mueva a la velocidad de la carga del electrón.

Conceptos físicos

Semiconductores

La conductividad eléctrica de diferentes materiales se puede explicar con base en la teoría de bandas, la cual describe la estructura electrónica como una estructura de bandas de energía. Esta teoría se basa en que los orbitales de un átomo se solapan, y cuando los átomos son muchos, se forman bandas continuas de energía: tenemos la banda de valencia (BV), ocupada por los electrones de valencia, los cuales no ayudan en la conducción, y la banda de conducción (BC), ocupada por los electrones libres responsables de la corriente (**Figura 1A**). Los materiales se clasifican según su resistividad en conductores, semiconductores y aislantes.

Los semiconductores son elementos que se comportan como conductores o aislantes dependiendo de diferentes condiciones externas como la temperatura y los campos eléctricos. En los semiconductores la BV y la BC se encuentran separadas por una barrera

Tabla 1. Ventajas de las propiedades magnéticas y eléctricas en los computadores

Propiedades magnéticas	Propiedades eléctricas
Memoria estable	Ancho de banda con aplicaciones de ingeniería
Alta temperatura de ordenamiento	Densidad de portadores
Transporte de espín	Puerta eléctrica
Base tecnológica para el grabado magnético.	Tecnología basada en electrónica
Se pueden desarrollar transistores basados en espín, interruptores y circuitos lógicos.	Crear controles propagando información en el espín en estructuras semiconductoras

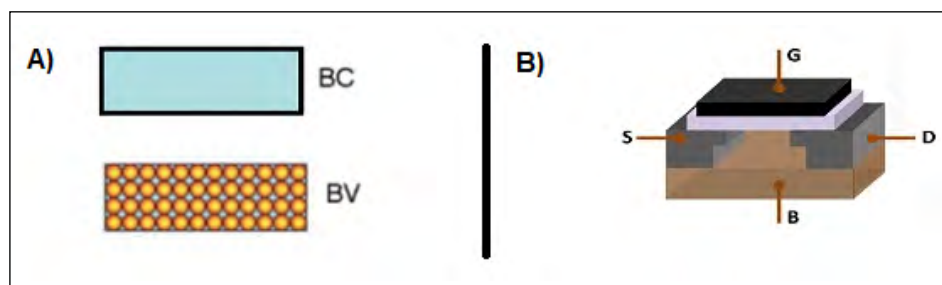


Figura 1. A). Población de las bandas de Valencia (BV) y Bandas de Conducción (BC) de un semiconductor. **B).** Estructura del MOSFET: puerta (G), sustrato (B), fuente (S) y drenador (D). El sustrato es el semiconductor.

de energía pequeña. En el estado aislante la BV se encuentra llena y la BC está vacía y se comporta como conductor cuando algunos electrones pasan a ella. Esta situación se puede alcanzar dopando el material con otro que ayude a reducir la barrera entre las bandas, y que algunos electrones puedan ubicarse en la BC; además, si se aplica una diferencia de potencial (V) aparece una corriente. Este es el principio fundamental para fabricar transistores que, como el que se muestra en la **figura 1 B**, se conocen como transistores MOSFET (*Metal-oxide-semiconductor Field-Effect Transistor*). El MOSFET es un dispositivo de cuatro terminales llamados fuente (S, de *Source*), drenador (D de *Drain*), puerta (G de *Gate*) y sustrato (B de *Bulk*) (**Quesada, et al., 2007**). Este tipo de transistor se utiliza para amplificar señales electrónicas y es muy común en la industria microelectrónica y en los computadores. En el transistor MOSFET hay una corriente entre S y D debida al voltaje, pero la puerta G permite o no el paso de dicha corriente. A cada estado se le asignan los valores de 0 y 1, es decir, una información binaria en la que 0 es el aislante y 1 el conductor. El conductor realiza muchas operaciones por segundo, pero la información es volátil, así que es necesario aplicar un voltaje para mantenerla almacenada en el dispositivo, lo que implica consumo de energía para obtener la información, y esto acarrea un costo.

Materiales magnéticos

El magnetismo de los materiales como el Fe se debe al espín de los electrones. Dependiendo de la manera como se acoplen los espines, los materiales magnéticos se clasifican en ferromagnéticos, antiferromagnéticos y otros. Los materiales ferromagnéticos con alta anisotropía magnética uniaxial (dirección preferencial de magnetización) tienen dos direcciones posibles de magnetización: para espines de $\frac{1}{2}$ valor estas son arriba o abajo, lo que ofrece la posibilidad de almacenamiento binario, 0 hacia arriba y 1 hacia abajo (**Figura 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1130/2805>). Un disco duro de computador graba la información y esta permanece guardada, en consecuencia, hay un bajo consumo de energía, pero la velocidad de grabado y de lectura es lenta.

Materiales espintrónicos

En los computadores, los semiconductores se encargan de organizar la información y los materiales magnéticos la almacenan. Los semiconductores magnéticos unen las dos propiedades en un solo dispositivo, de tal manera que sean rápidos, consuman poca energía y guarden la información. Al utilizar las dos propiedades, se almacena la información de forma permanente y rápida, lo que solo es posible si un mismo electrón es el responsable de la conducción (carga, q) y de la magnetización (espín, s). Si en un material magnético que genere corrientes polarizadas de espín (corriente de electrones), es decir, con el espín orientado en una dirección, se usa un filtro de espín (solo pasan corrientes en una dirección determinada de espín), ello permitiría tener la información magnética a través de una medida eléctrica, lo que implica que sería un proceso rápido.

Magnetorresistencia gigante (MRG)

La magnetorresistencia es la variación de la resistencia eléctrica cuando el sistema es sometido a un campo magnético. Esta fue descubierta en 1856, sin embargo, su efecto era tan solo del 5 %, pero este aumentó al 80 % cuando se descubrió la MRG (Baibich, *et al.*, 1988) (Figura 2A). La MRG es un efecto mecánico cuántico y se observa en estructuras de multicapas compuestas de películas delgadas que alternadamente son ferromagnéticas y no magnéticas (Figura 2B). Se manifiesta en forma de una disminución significativa de la resistencia eléctrica observada bajo la aplicación de un campo magnético externo. Cuando el campo es nulo, las dos capas ferromagnéticas adyacentes tienen una magnetización antiparalela, y con la aplicación de un campo magnético externo, las magnetizaciones respectivas de las dos capas se alinean y la resistencia de la multicapa cae de manera súbita. Los espines de los electrones de la sustancia no magnética se alinean paralela y antiparalelamente al campo magnético aplicado en igual número y, por lo tanto, sufren un cambio de difusión magnética en menor medida con respecto a las capas ferromagnéticas que se magnetizan de forma paralela. Este efecto se basa en la orientación del espín.

En el tratamiento físico de la MRG y de la espintrónica se trata de incluir “el grado de libertad del espín en corrientes polarizadas” para así obtener nuevas propiedades además de las ya conocidas en la electrónica normal (Fert & Campbell, 1968; Loegel & Gautier, 1971). Debido a la asimetría en la densidad de estados de los materiales ferromagnéticos, hay un estado del espín más abundante que otro, lo que resulta en distintas conductividades para los electrones de conducción según su espín (Figura 2S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1130/2806>). La conducción depende del estado del espín, lo cual lleva al “modelo de dos corrientes” para la conducción en ferromagnetos. Esta propiedad tiene muchas aplicaciones: sensores magnéticos para la industria automotriz, cabezas lectoras de los discos duros, en los que, además, se ha logrado aumentar la densidad de información almacenada.

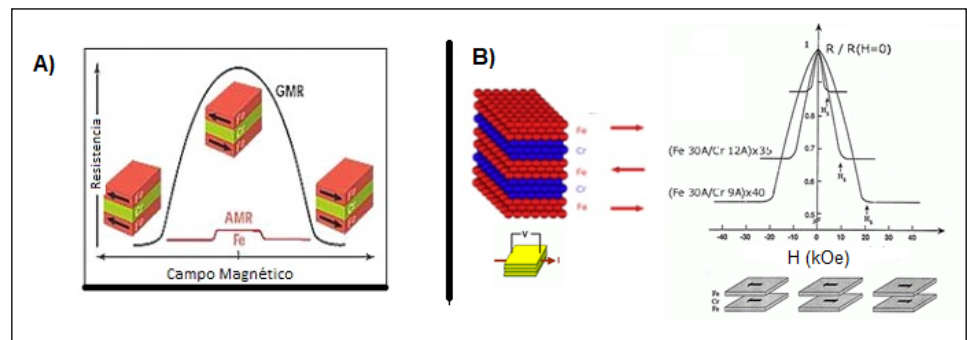


Figura 2. A) Variación de la resistencia en presencia de un campo magnético B) Orientación de espín en capas antiparalelas.

Espintrónica con semiconductores magnéticos

Los semiconductores magnéticos exhiben propiedades ferromagnéticas y de semiconducción que, al ser implementadas en diferentes dispositivos permitirían nuevos tipos de conducción. Los semiconductores magnéticos diluidos (SMD) se basan en semiconductores dopados con metales magnéticos (<10 %). En la **figura 3** se muestra un esquema representativo de una red semiconductora con iones magnéticos.

Teorías del magnetismo en los SMD

La primera contribución fue de **Onho** (1998), quien propuso dopar con una pequeña cantidad de átomos magnéticos la matriz de un semiconductor (**Figura 3**) para inducir, así, magnetismo en el semiconductor sin que cambie la estructura de bandas del semiconductor. Las impurezas magnéticas se encuentran en posiciones sustitucionales de la red del semiconductor, aisladas dentro de la matriz y separadas por largas distancias una de otra, de manera que no es posible una interacción ferromagnética directa entre átomos magnéticos en ausencia de campo. Pero hay una interacción indirecta entre las impurezas magnéticas a través de los electrones de conducción, el llamado mecanismo de **Zener** (1951). Puesto que los electrones tienen espín, la presencia de las impurezas magnéticas en la matriz semiconductora introduce un nuevo término de energía de intercambio en el sistema que es:

$$\Delta H = J_{pd} \sum_{ij} S_i \cdot s_j \quad (1)$$

donde S_i el espín de las impurezas magnéticas y s_j el espín de los electrones de conducción, J_{pd} es la energía de interacción entre el espín de los electrones de la banda de conducción que se forma a partir de orbitales p del semiconductor y los momentos magnéticos localizados del orbital d de la impureza magnética.

En ambos casos, los electrones de conducción del material están polarizados, por lo que, al aplicar una diferencia de potencial, se generan corrientes polarizadas en el espín, es decir, se crea un acoplamiento entre el estado magnético y las propiedades de conducción del material. Otro modelo es el *bond magnetic polaron* (BPM), propuesto por Torrence y después usado por Coey (**Torrace, et al., 1972; Coey, et al., 2005**) para explicar el ferromagnetismo de nitruros magnéticos diluidos por la acción de los electrones donadores superficiales en la formación de polarones magnéticos enlazados, los cuales se sobreponen para crear una banda de impureza espín-split. Los cálculos desarrollados por el grupo de Ohno predecían que la mayoría de los DMS presentarían temperaturas de Curie por debajo de la temperatura ambiente, pero que algunos compuestos sí podrían mostrar comportamiento ferromagnético a temperatura ambiente (**Dietl, et al., 2000**). Según estos cálculos, el óxido

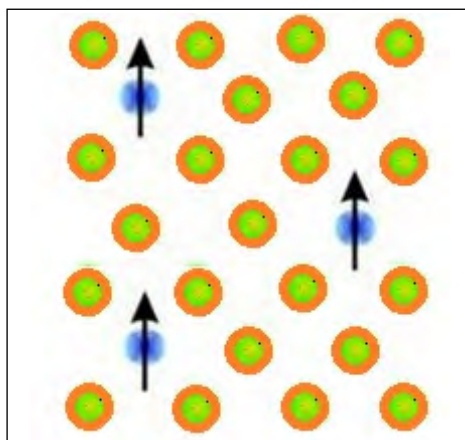


Figura 3. Iones magnéticos en una red semiconductora.

de zinc (ZnO) dopado con manganeso era el mejor candidato, ya que debería presentar una temperatura de Curie superior a los 400 K. A partir de esta predicción, se ha estudiado el semiconductor ZnO dopado con pequeñas cantidades de átomos magnéticos como Mn, Co, Cr y Ni con el objetivo de encontrar ferromagnetismo por encima de la temperatura ambiente (Ueda, *et al.*, 2001; Sharma, *et al.*, 2003). Las variaciones en los resultados indican que el ferromagnetismo del sistema depende mucho de la forma de preparación (Sharma, *et al.*, 2004; Ahmed, *et al.*, 2017). En los estudios de ZnO dopado con Fe por aleamiento mecánico (Debjani, *et al.*, 2007; Fan, *et al.*, 2010; Lin, *et al.*, 2010; Ramos, *et al.*, 2014; Beltrán, *et al.*, 2015; Zamora, *et al.*, 2015; Casanova, *et al.*, 2018), se ha evidenciado un comportamiento ferromagnético con temperatura de Curie por encima de la temperatura ambiente.

ZnO dopado con Fe preparado por aleamiento mecánico

En este apartado se presenta un resumen de los resultados obtenidos y publicados en el estudio del comportamiento estructural y magnético de ZnO dopado con Fe por aleamiento mecánico (Piamba, *et al.*, 2012; Zamora, *et al.*, 2015; Casanova, *et al.*, 2018). Se ensayaron tres rutas diferentes: 1) variando la concentración del dopante en porcentaje atómico; 2) dejando la concentración constante y variando el tiempo de molienda, y 3) dejando la concentración y el tiempo de molienda constantes y variando la RPB. Para la preparación de las muestras que fueron estudiadas se utilizaron polvos de alta pureza de ZnO y α -Fe, los cuales se mezclaron con la composición nominal deseada en porcentaje atómico y, posteriormente, aleados en un molino planetario de bolas. Las muestras se caracterizaron mediante difracción de rayos X (DRX), espectrometría Mössbauer (EM) y magnetometría de muestra vibrante (VSM).

Resultados y análisis

Variación de la concentración de Fe agregada a ZnO

El sistema estudiado fue el $\text{ZnO}_{1-x}\text{Fe}_x$, con $x = 0,03, 0,05$ y $0,1$ (3, 5 y 10 % de Fe, respectivamente). La relación entre el peso de bolas y el de elementos (RPB) fue de 15:1, con un tiempo de molienda de 36 horas. De los patrones de difracción de rayos-x (Figura 4A), y después de hacer los refinamientos con el método de Rietveld, se comprobó que el sistema con $x = 0,03$ presentaba la fase hexagonal wurtzita del ZnO, con parámetros de red de $a = 3.260 \text{ \AA}$ y $c = 5.200 \text{ \AA}$ y un tamaño medio de cristalito de $\sim 18 \text{ nm}$. Para $x = 0,05$ y $x = 0,10$, además de la wurtzita del ZnO, con parámetros de red similares a los de $x=0,03$, se obtuvo la fase de tipo bcc del α -Fe con un parámetro de red de $a = 2.885 \text{ \AA}$, y tamaños medios de cristalito de $\sim 93 \text{ nm}$ y $\sim 11 \text{ nm}$ para las muestras con $x = 0,05$ y $x = 0,10$, respectivamente. El espectro Mössbauer (Figura 4B) para $x = 0,03$ se ajustó con dos dobletes, el primero con valores de desvío isomérico de $\text{ISO} \sim 0,280 \text{ mm/s}$, desdoblamiento cuadrupolar de $\text{QUA} \sim 0,690 \text{ mm/s}$ y ancho de línea de $\Gamma \sim 0,52 \text{ mm/s}$, asociado al Fe^{3+} ; y el segundo con valores $\text{ISO} \sim 0,925 \text{ mm/s}$, $\text{QUA} \sim 1,52$, y Γ de $0,81 \text{ mm/s}$, asociado al Fe^{2+} , en concordancia con los parámetros reportados en la literatura (Murad & Cashion, 2004; Lin, *et al.*, 2007). Los espectros Mössbauer para las muestras con $x = 0,05$ y $x = 0,10$ se ajustaron con tres componentes, dos dobletes anchos y una distribución de campo. Los dos dobletes obtenidos para las muestras tuvieron parámetros Mössbauer medios muy similares a los obtenidos para la muestra con $x = 0,03$, por lo que correspondían a los sitios de Fe^{3+} y Fe^{2+} , y la distribución de campo se asoció al α -Fe. Este resultado con espectrometría Mössbauer está en concordancia con los resultados obtenidos mediante DRX. Los anchos de línea estuvieron por encima de $0,4 \text{ mm/s}$, lo que evidenció que esta muestra apareció desordenada como consecuencia del alto tiempo de molienda (36 horas) y por la distribución de los tamaños de los cristalitos. En todas las muestras se encontró Fe^{3+} y Fe^{2+} , a diferencia de los reportes de autores que han reportado que los iones de Zn^{2+} son sustituidos únicamente por Fe^{2+} (Zhang, *et al.*, 2007), y de otros que han reportado la sustitución del Fe únicamente como Fe^{3+} (Elilarassi, *et al.*, 2017). Los variados resultados reportados para el sistema ZnO dopado con Fe se deben a los diferentes procesos de

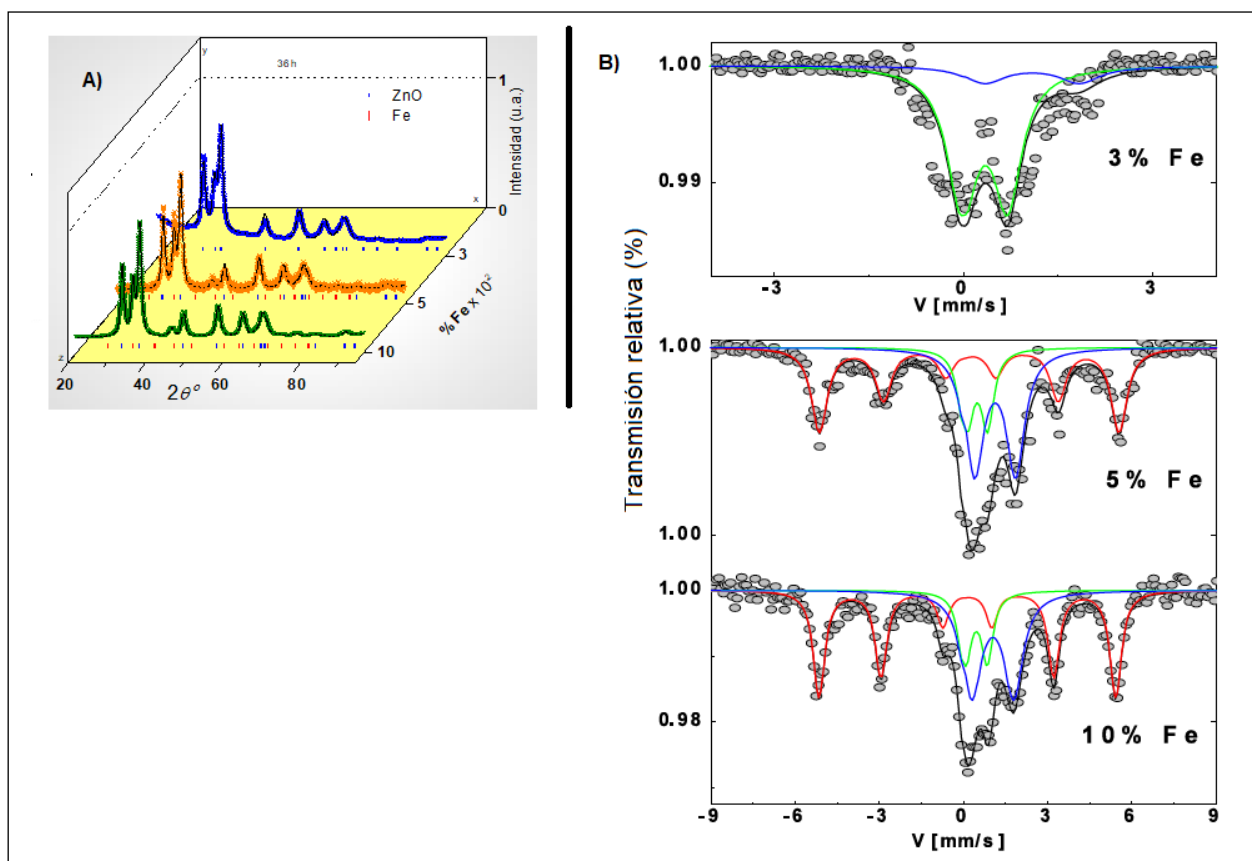


Figura 4. A) Espectros de rayos X para las muestras con $x=0.03$, 0.05 y 0.1 . B) Espectros Mössbauer para $x=0.03$, 0.05 y 0.1 (— α -Fe, — Fe^{3+} , — Fe^{2+})

preparación de las muestras, incluida la molienda mecánica, que tienen muchos parámetros que deben tenerse en cuenta. Para $x = 0,05$ y $0,10$ solo una parte de los átomos de Fe se introdujeron en la red de ZnO, los otros quedaron segregados dentro de la muestra. Los espectros Mössbauer para diferentes tiempos de molienda de este sistema fueron reportados por Zamora, *et al.* (2015) como se resume en la siguiente sección.

Variación de las horas de molienda y mantenimiento de la misma composición

En la segunda parte de la investigación se hizo la molienda con una concentración de 10 % de Fe y una relación RPB de 15:1 y se variaron las horas de molienda (6h, 12h, 24h, 36h y 99h). Tanto los patrones de rayos X como los espectros Mössbauer fueron similares a los mostrados en la figura 4 para $x = 0,1$ (Zamora, *et al.*, 2015). Después del refinamiento de los patrones de rayos X en todas las muestras se evidenciaron las estructuras wurtzita del ZnO y la bcc de la α -Fe.

Los espectros Mössbauer se ajustaron con tres componentes: una fase ferromagnética asociada con la α -Fe y dos sitios paramagnéticos asociados con los átomos de Fe que penetran dentro de la matriz de ZnO, comportándose como Fe^{3+} y Fe^{2+} , comportamiento similar al mostrado en la sección anterior para $x = 0,1$. Al analizar el comportamiento de las áreas espectrales en los ajustes de los espectros Mössbauer, se demostró que a medida que aumentan las horas de molienda, el área total de las fases paramagnéticas también lo hace, en tanto que el área de la fase magnética disminuye, lo que indica que el Fe se va introduciendo dentro de la matriz de ZnO; también se observó que a partir de 24 horas esta área ya no cambia, lo que indica que una molienda de más de 24 horas no permite que el Fe penetre más dentro de la ZnO.

En la **figura 5A** se muestran las medidas de ciclos de histéresis obtenidas por VSM. Al analizarlas, presentaron campos coercitivos típicos de materiales magnéticos semiblandos, que van desde 330 a 585 Oe. El campo coercitivo obtenido en las muestras utilizando un VSM fue mayor que el obtenido para el Fe, el cual fue menor de 12 Oe, lo que se explica por el tamaño nanométrico de los cristalitas que se obtuvieron como producto del proceso de molienda. Este tamaño hace que el número de dominios magnéticos dentro del grano sea menor, endureciendo así el material. Las medidas de resistencia en función de la temperatura se muestran en la **figura 5B**, con un comportamiento típico de un semiconductor, es decir, cuando el Fe sustituye al Zn la estructura de bandas no se modifica considerablemente y la banda de valencia continúa separada de la banda de conducción. Se puede decir que a temperatura ambiente y a bajas temperaturas, los materiales son ferromagnéticos débiles y semiconductores.

Variación de la relación RPB

Teniendo en cuenta que al variar la concentración y las horas de molienda no se logró introducir todo el Fe dentro de la matriz de ZnO, se decidió variar la relación RPB, es decir, aumentar la energía sobre el sistema. Este estudio se realizó para $x = 0,1$ y 24 horas de molienda, en tanto que los valores de RPB escogidos fueron de 15:1, 20:1, 25:1 y 30:1. Todos los patrones de rayos X y los espectros Mössbauer para estas muestras fueron similares a los mostrados en la **figura 4**.

En los refinamientos de los patrones de rayos X se encontró que todas las muestras presentaban solamente la estructura wurtzita, excepto la de 15:1, a la cual fue necesario adicionar la estructura del Fe. El tamaño medio de los cristalitas encontrados estuvo alrededor de 100 Å. En la **figura 6** se presenta la estructura de la muestra aleada con una RPB de 30:1, la cual se obtuvo con el programa VESTA (Izumi, 2007). Para la obtención de la estructura con dicho programa, se utilizó la última iteración del refinamiento con el método Rietveld obtenida con el programa GSAS, la cual permite obtener las fracciones de ocupación de los sitios de Zn y O. En la **figura 6** se ve que el Zn tiene una franja triangular amarilla asociada con la posible ocupación por Fe, en tanto que no hay probabilidad de sustituir los oxígenos, aunque sus átomos presentan también una franja triangular clara que se asoció con sus vacancias. Esto también se explica porque los tamaños iónicos del Fe^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} son similares (77, 65 y 75 pm, respectivamente). Los átomos de Zn están rodeados por 4 átomos de oxígeno, con una estructura tetraédrica, y el Zn tiene una probabilidad del 10 % de ser ocupado por átomos de Fe según el resultado del refinamiento del patrón de difracción y en concordancia con la franja clara de sustitución del Zn por el Fe de la **figura 6**. Los iones O^{2-} tienen tamaños iónicos de 140 pm y, si fuesen sustituidos por iones de Fe, implicaría una gran disminución de los parámetros de red, lo cual no se observó mediante DRX.

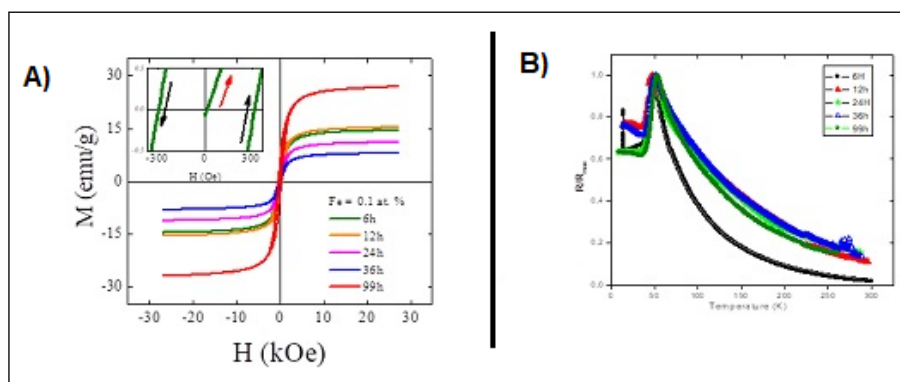


Figura 5. A) Ciclos de histéresis. **B)** Resistividad en función de la temperatura; para $\text{Zn}_{0,9}\text{Fe}_{0,1}\text{O}$, variando las horas de molienda.

Los espectros Mössbauer se ajustaron con dos dobletes correspondientes a Fe^{3+} y Fe^{2+} , excepto para la relación de 15:1, en la cual fue necesario un sextete adicional asociado con el Fe segregado dentro de la muestra, es decir, el Fe que no alcanzó a penetrar y disolverse en la matriz de ZnO. Al aumentar la RPB, se logró que todo el Fe se introdujera dentro de la matriz de ZnO. Las medidas de magnetización (VSM) revelaron un comportamiento magnético a temperatura ambiente. En la muestra con RPB de 15:1, el magnetismo se debió al Fe segregado, y en las otras muestras se adoptó el modelo de polarones para explicarlo. En este estudio, los difractogramas de rayos X y los espectros Mössbauer no se presentan, pero se reportan en *Casanova, et al.* (2018) y, además, son similares a los presentados en la **figura 4** para $x = 0,03$.

Sobre el modelo de polarones: en las muestras con $\text{RPB} \geq 20:1$, los átomos de Fe fueron solubles dentro de la matriz de ZnO. Además, esta observación sugiere que a temperatura ambiente los iones de Fe en la estructura de ZnO no presentan un orden magnético (son dobletes). En las medidas de VSM todas las muestras presentaron un comportamiento ferromagnético sin ninguna dependencia progresiva con el aumento de los valores de RPB. Las curvas M-H en las muestras con RPB igual o mayor a 20:1 parecen ser contrarias a los espectros Mössbauer. Este comportamiento es similar al reportado por varios autores (*Fan, et al.*, 2010; *Lin, et al.*, 2007; *Beltrán, et al.*, 2015; *Mishra, et al.*, 2010). El origen de esta discrepancia está aún sin resolver y se han propuesto varios modelos para explicar este comportamiento. *Lin, et al.* (2007) consideraron que la diferencia se explicaba por un proceso de relación espín-red y *Mishra & Das* (2010) propusieron que se debía al tiempo de escala de medida entre ambas técnicas (~ 100 s para magnetización y $\sim 10^{-8}$ s para espectroscopía Mössbauer). En muestras preparadas en películas delgadas el magnetismo se explica por la acumulación de Fe en las fronteras de grano (*Boris, et al.*, 2013; *Protasova, et al.*, 2014).

Después del refinamiento de los difractogramas con el método de Rietveld, se encontró que en todos ellos los sitios correspondientes a los átomos de O presentaban una fracción de ocupación menor a 1, lo que indica que existen vacancias de O, tal como lo ilustra la franja triangular clara de la **figura 6**; por ese motivo se propone el modelo para explicar el magnetismo ilustrado en la **figura 7**. Este modelo se postula con base en la propuesta del polarón magnético ligado (PML) hecha por *Torrace, et al.* (1972) utilizada luego por *Coy, et al.* (2005) para explicar el ferromagnetismo de nitruros magnéticos diluidos. En la **figura 7** se ilustra cómo los electrones de conducción ocupan los huecos del oxígeno y como los dos próximos vecinos de Fe son polarizados antiparalelamente a estos electrones de forma

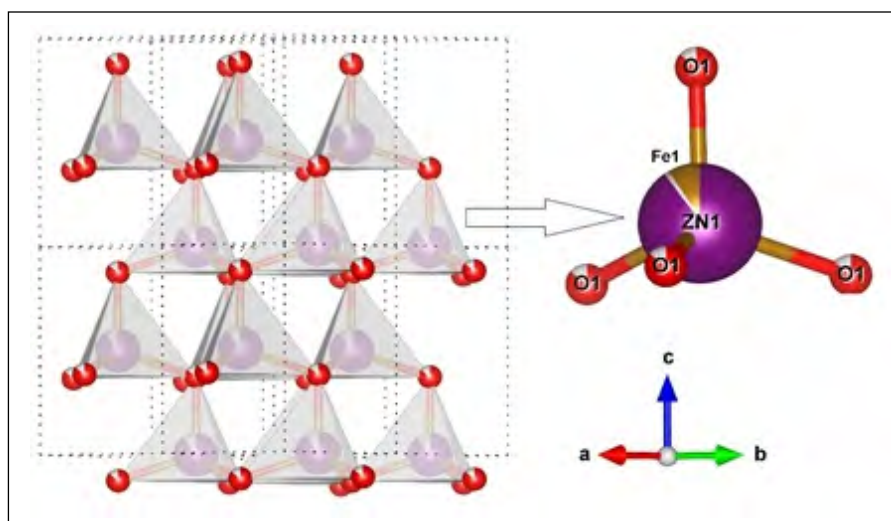


Figura 6. Diagrama esquemático de la estructura cristalina de $(\text{Zn}_{0.9}\text{Fe}_{0.1})\text{O}$ con RPB 30:1.

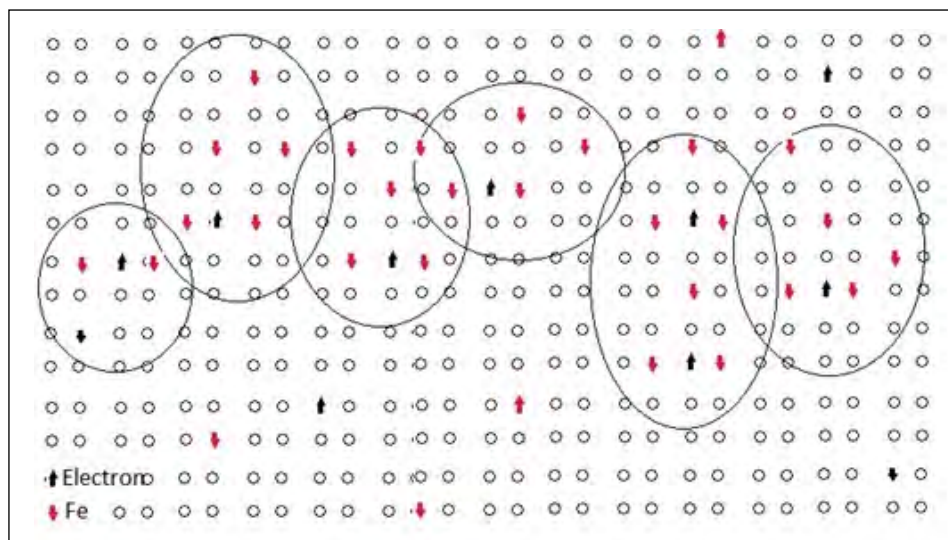


Figura 7. Dibujo esquemático de la percolación de los plasmones de diferentes tamaños.

que los espines de Fe se alinean paralelamente entre sí. Estos espines afectan su entorno y crean una región de influencia llamada polarón; además, debido al desorden inducido por la molienda, diferentes tipos y tamaños de polarones se forman y pueden percolar para producir un orden ferromagnético. El fenómeno colectivo se detecta mediante VSM, pero no con espectroscopía Mössbauer, ya que las medidas de magnetización detectan el momento magnético medio por unidad de volumen de los polarones, en tanto que la espectroscopía Mössbauer detecta la interacción local entre los momentos magnéticos de los átomos de Fe con el campo interno en su posición, el cual no existe debido a la gran separación entre los pares de átomos de Fe alineados por los electrones de conducción.

Conclusión

Con el objetivo de dopar materiales semiconductores con iones magnéticos, se estudió el sistema ZnO dopado con Fe utilizando aleamiento mecánico. Se concluye que el uso del aleamiento mecánico tiene muchas variables que deben tenerse en cuenta: la concentración del material dopante (Fe), las horas de molienda y la relación RPB. Todos los sistemas reportados en este artículo presentan comportamiento ferromagnético y semiconductor a temperatura ambiente. Con aleamiento mecánico solo se logró que los átomos de Fe se diluyeran dentro de la red de ZnO cuando se aumentó la energía de molienda, es decir, al aumentar la RPB. Para explicar el magnetismo en este sistema, se propuso un modelo de polarones. Todavía quedan muchas variables que deben considerarse para tener claro el origen del magnetismo y sus posibles aplicaciones. La explicación teórica del magnetismo en los semiconductores magnéticos diluidos sigue siendo un reto y, en la práctica, el almacenamiento de la información es importante; se necesitan sistemas magnéticos semiduros y, además, que la temperatura de Curie sea alta. Estos son los retos de la espintrónica que hay que seguir estudiando.

Material suplementario

Figura 1S. **A)** Eje fácil de magnetización (arriba y abajo). **B)** Disco duro y orientación de la magnetización. Vea la figura 1S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1130/2805>

Figura 2S. **A)** Esquemas de bandas de un metal ferromagnético. **B)** La conductividad puede ser interpretada en dos canales independientes de cada espín. Vea la figura 2S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1130/2806>

Agradecimientos

Agradezco a mis estudiantes Juan Carlos Paz, Jefferson Piamba y Angela Casanova, en cuyas tesis se expusieron los resultados. A Germán Pérez por la discusión de los resultados y su apoyo incondicional. Por último, agradezco el apoyo de la Universidad del Valle por la financiación del proyecto CI. 71181 y a Colciencias por la del proyecto 110671250407.

Contribución de autores

La autora hizo la revisión bibliográfica sobre los semiconductores magnéticos y sus posibles aplicaciones en espintrónica. Se expusieron los resultados obtenidos de la investigación realizada en la Universidad del Valle.

Conflicto de intereses

La autora manifiesta que no hubo ningún tipo de conflicto de intereses en el desarrollo de la investigación ni para la publicación de los resultados.

Referencias

- Ahmed, S.A. (2017). Structural, optical, and magnetic properties of Mn-doped ZnO samples. *Results Phy.* **7**: 604. Doi: 10.1016/J.RINP.2017.01.018
- Alsaad, A. (2014). Structural, electronic and magnetic properties of Fe, Co, Mn-doped GaN and ZnO diluted magnetic semiconductors *Physica B.* **440**: 1-9. Doi: 10.1016/j.physb.2014.01.029
- Baibich, G M.N., Broto, J.M., Fert, A., van Dau, F.N., Petroff, F., Etienne, P., Creuzet, G., Friederich, A., Chazelas, J. (1988). Giant Magnetoresistance of (001)Fe/(001)Cr Magnetic Superlattices. *Phys. Rev. Lett.* **61**: 2472. Doi: 10.1103/PhysRevLett.61.2472
- Beltrán, J. J., Barrero, C. A., Punnoose, A. (2015). Understanding the role of iron in the magnetism of Fe doped ZnO nanoparticles. *Phys. Chem.* **17**: 15284. Doi: 10.1039/C5CPO1408E
- Binasch, G., Grünberg, P., Saurenbach, F., Zinn, W. (1989). Enhanced magnetoresistance in layered magnetic structures with antiferromagnetic interlayer exchange. *Physical Review B.* **39** (7): 4828-4830. Doi: 10.1103/PhysRevB.39.4828
- Casanova, A., Pérez-Alcázar, A., Aguirre, W.R., Salazar, D., Zamora, L.E. (2018). Effect of the Milling Conditions on the Properties of ZnO Doped with Fe. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.* **31** (4): 4021-4028. Doi: 10.1007/s10948-018-4657-0
- Chandrasekaran, E.G. (2017). Optical, electrical and ferromagnetic studies of ZnO:Fe diluted magnetic semiconductor nanoparticles for *spintronic* applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* **186**: 120-131R. Doi: 10.1016/j.saa.2017.05.065
- Coey, J. M. D., Venkatesan, M., Fitzgerald, C. B. (2005). Donor impurity band exchange in dilute ferromagnetic oxides. *Nature Materials.* **4**: 173-179. Doi: 10.1038/nmat1310
- Dietl, T., Ohno, H., Matsukura, F., Cibert, J., Ferrand, D. (2000). Zener Model Description of Ferromagnetism in Zinc-Blende Magnetic Semiconductors. *Science.* **287** (5455): 1019. Doi: 10.1126/science.287.5455.1019
- Fan, L., Dongmei, J., Xueming, M. (2010). The influence of annealing on the magnetism of Fe doped ZnO prepared by mechanical alloying. *Physica B: Condensed Matter.* **405** (6): 1466. Doi: 10.1016/J.PHYSB.2009.12.010
- Fert, A. & Campbell, I.A. (1968). Two-Current Conduction in Nickel. *Phys. Rev. Lett.* **21**: 1190. Doi:10.1103/PhysRevLett.21.1190
- Ghosh, S. S., Choubey, C., Sil, A. (2019). Photocatalytic response of Fe,Co, Ni doped ZnO-based diluted magnetic semiconductors for spintronics applications. *Superlattices and Microstructures.* **125**: 271-280. Doi: 10.106/j.spmi.2018.10.028
- Ghosh, S.S., Choubey, C., Sil, A. (2019). Photocatalytic response of Fe, Co, Ni doped ZnO-based diluted magnetic semiconductors for spintronics applications. *Superlattices and Microstructures.* **125**: 271-280. Doi: 10.2016/j-spmi.2018.10.028
- Izumi, F. & Momma, K. (2007). Three-Dimensional Visualization in Powder Diffraction. *Solid State Phenomena.* **130**: 15-20. Doi: 10.4028/www.scientific.net/SSP.130.15
- Karmakar, D., Mandal, S.K., Kadam, R.M., Paulose, P.L., Rajarajan, A. K., Nath, T.K., Das, A.K., Dasgupta, I., Das, G.P. (2007). Ferromagnetism in Fe-doped ZnO nanocrystals: Experiment and theory. *Physical Review B.* **75**: 144404. Doi: 10.1103/PhysRevB.75.144404

- Lin, Y., Jiang, D., Lin, F., Shi, W., Ma, X.** (2007). Fe-doped ZnO magnetic semiconductor by mechanical alloying. *Journal of Alloys and Compounds*. **436** (1-2): 30. Doi: 10.1016/j.jallcom.2006.07.011
- Loegel, B. & Gautier, F.** (1971). Origine de la resistivite dans le cobalt et ses alliages dilues. *J. Phys. Chem. Sol.* **32**: 2723. Doi: 10.1016/S0022-3697(71)80364-5
- Mishra, A.K. & Das, D.** (2010). Investigation on Fe-doped ZnO nanostructures prepared by a chemical route. *Materials Science and Engineering B*. **171** (5): 5-10. Doi: 10.1016/j.mseb.2010.03.045
- Moore, G.E.** (1965). Cramming more components onto integrated circuits *Electronics*. **38** (8): 19.
- Ohno, H.** (1998). Making Nonmagnetic Semiconductors Ferromagnetic. *Science*. **281**: 951. Doi: 10.1126/science.281.5379.951
- Quesada, A., García, M.A., Costa-Krämer, J.L., Fernández, J.F., Martín-González, M., Hernando, A.** (2007). Semiconductores magnéticos diluidos: materiales para la espintrónica. *Revista española de física*. **21** (1): 37-41
- Ramos, J.E., Montero-Muñoz, M., Coaquira, J.A.H., Rodríguez-Páez, J. E.** (2014). Evidence of a cluster glass-like behavior in Fe-doped ZnO nanoparticles. *Journal of Applied Physics*. **115**: 17E123. Doi: 10.1063/1.4864246
- Sharma, P., Gupta, A., Owens, F.J., Inoue, A., Rao, K.V.** (2004). Room temperature spintronic material Mn-doped ZnO revisited *J. Magn. Magn. Mater.* **282**: 115-121. Doi: 10.1016/J.JMMM.2004.04.028
- Sharma, P.A., Gupta, K.V., Rao, F.J., Owens, R., Sharma, R., Ahuja, J.M. Guillen, B., Johansson, B., Gehring, G.A.** (2003). Ferromagnetism above room temperature in bulk and transparent thin films of Mn-doped ZnO. *Nat. Mater.* **2**: 673. Doi: 10.1038/nmat984
- Simões, C.B., de Sousa e Silvaa, R.L., Banerjeea, B., Franco Jr., P.** (2019). Investigation of Fedoped room temperature dilute magnetic ZnO semiconductors. *Materials Science in Semiconductor Processing*. **96**: 122-126 Doi: 10.1016/j.mssp.2019.02.021
- Torrance, J.B., Shafer, M.W., McGuire, T. R.** (1972). Bound Magnetic Polarons and the Insulator-Metal Transition in EuO. *Phys. Rev. Lett.* **29**: 1168. Doi: 10.1103/pHYsrEVIETT.29.1168
- Ueda, K., Tabata, H., Kawai, T.** (2001). Magnetic and electric properties of transition-metal-doped ZnO films *Appl. Phys. Lett.* **79**: 988. Doi: 10.1063/1.1384478
- Wolf, S.A., Awschalom, D.D., Buhrman, R.A., Daughton, J. M., von. Molnár, S., Roukes, M. L.; Chtchelkanova, A.Y., Treger, D. M.** (2001). Spintronics: a spin-based electronics vision for the future. *Science*. **294**: 1488. Doi: 10.1126/science.1065389
- Zamora, L.E., Paz, J. C., Piamba, J. F., Tabares, J. A., Pérez-Alcázar, G. A.** (2015). A Mössbauer and magnetic study of ball milled Fe-doped ZnO Powders. *Hyperfine Interact.* **232**: 111-118. Doi: 10.1007/s10751-015-1155-7
- Zener, C.** (1951). Interaction Between the d Shells in the Transition Metals. *Physical Review*. **81440**: 440-444. Doi: 10.1103/pHYsrEV.81.440

Original article

**The genetic structure of *Pristimantis latro*
(Anura: Craugastoridae) mirrors traits of their life history**

**La estructura genética de *Pristimantis latro*
(Anura: Craugastoridae) refleja rasgos de su historia de vida**

**Gilcilene Santana-Cornélio¹, Elciomar Araújo-de-Oliveira², Keila Magalhães-Xavier³,
Gabriela Wemilly Barros-da-Silva¹, Isadora-França¹, Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues⁴,
Emil José Hernández-Ruz^{5,*}**

¹ Faculdade de Ciências Biológicas, Campus Universitário de Altamira, Universidade Federal do Pará, Altamira, Pará, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

³ Faculdade de Medicina, Campus Universitário de Altamira, Universidade Federal do Pará, Altamira, Pará, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brazil; Laboratório de Genética & Biodiversidade, Instituto de Ciências da Educação, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Campus Universitário de Altamira, Universidade Federal do Pará, Altamira, Pará, Brazil

Abstract

One of the main hypotheses to explain the origin of Amazonian diversity is the barrier effect of the rivers known as the riverine-barrier hypothesis, which suggests that riverine barriers isolated once continuous populations leading to differentiation and speciation. In this context, we studied the genetic structure of *Pristimantis latro*, a newly described species that inhabits a region under marked anthropic pressure due to expansive livestock, illegal mining, and hydroelectric dam construction. The DNA was extracted from 52 *P. latro* individuals and then amplified via polymerase chain reaction (PCR) using the mitochondrial 16S rRNA and COI markers. To infer the time of divergence between the *P. latro* localities, we built a species tree and performed an analysis of molecular variance (AMOVA) to infer the genetic differentiation between and within the *P. latro* populations. We found that *P. latro* has a marked genetic structure in the populations of the right and left margins of the Xingu River and within the Tapajós-Xingu and Xingu-Tocantins interfluvial regions and that the time of divergence between the populations of the East and West banks of the Xingu River occurred approximately 380,000 years ago. This pattern of genetic structure corresponds to that reported in recent articles for the *Pristimantis* genus evidencing that species without tadpoles exhibit a genetic structure explained by the hypothesis of rivers as barriers.

Keywords: Mitochondrial DNA; Isolation by distance; Rivers as barrier; Terrarana; Divergence times.

Resumen

Una de las principales hipótesis para explicar el origen de la diversidad amazónica invoca el efecto de barrera de los ríos para explicar los patrones de diversidad. Esa hipótesis propone que algunos ríos pueden separar poblaciones continuas conduciendo a la diferenciación y la especiación. En ese sentido nos propusimos estudiar la estructura genética de *Pristimantis latro*, una especie recién descrita que habita una región bajo fuerte presión antrópica producto de la ganadería expansiva, la minería ilegal y la construcción de represas hidroeléctricas. El ADN se extrajo de 52 individuos de *P. latro* y se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los marcadores mitocondriales 16S rRNA y COI. Para inferir el tiempo de divergencia entre las localidades de *P. latro*, construimos un árbol de especies e hicimos análisis de varianza molecular (AMOVA) para inferir la diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones de *P. latro*. Encontramos que *P. latro* presenta una estructuración genética en las poblaciones de las márgenes derecha e

Citation: Santana-Cornélio G, Araújo-de-Oliveira E, Magalhães-Xavier K, *et al.* The genetic structure of *Pristimantis latro* (Anura: Craugastoridae) mirrors traits of their life history. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172): 729-739, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.956>

Editor: Martha Patricia Ramírez Pinilla

***Corresponding autor:**

Emil José Hernández-Ruz;
emilhjh@yahoo.com

Received: July 31, 2019

Accepted: March 27, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

izquierda del río Xingu y dentro de las regiones interfluviales de Tapajós-Xingu y Xingu-Tocantins. Asimismo, el tiempo de divergencia entre las poblaciones de las márgenes derecha e izquierda del río Xingu aconteció hace aproximadamente 380.000 años. El patrón de estructura genética que se encontró se corresponde con el indicado en artículos recientes para el género *Pristimantis*, el cual revela que las especies sin renacuajos exhiben una estructura genética que responde a la hipótesis de los ríos como barreras.

Palabras clave: ADN mitocondrial; Aislamiento por distancia; Ríos como barrera; Terrarana; Tiempo de divergencia.

Introduction

One of the premises about population genetics predicts that dispersion decreases with an increased geographic distance where gene flow is generally lower among geographically distant populations causing a pattern of isolation by distance (Wright, 1943). It is well known that, besides dispersion, there are vicariant events (river and mountain formation) that explain biologic diversification.

Many hypotheses have been put forward to explain the high levels of diversity in Amazonia (Da Rocha & Kaefer, 2019). One of them, known as the riverine-barrier hypothesis, invokes the barrier effect of the rivers to explain patterns of diversity (Wallace, 1852; Bates, 1874) and proposes that riverine barriers separate once continuous populations leading to differentiation and speciation. However, we know little about the genetic structure of tropical anuran populations, especially those groups with cryptic diversity in tropical regions due to the marked phenotypic conservatism present between species as compared to the marked structuring and high genetic differentiation observed between different populations (Vieites, *et al.*, 2009; Kaefer, *et al.*, 2013; Guayasamin, *et al.*, 2017).

A good example of this effect on anurans is the genus *Pristimantis* Jiménez De la Espada 1870, the most diverse among all vertebrate groups (Fouquet, *et al.*, 2013). This diversity may be associated with the evolution of the direct development characteristic of Terrarana, which makes them interesting for evolution studies since species with such traits have poor dispersion capacity and philopatry (Beebe & Griffiths, 2005; Fouquet, *et al.*, 2012). As a consequence of their life history, populations tend to be highly genetically structured and retain marked signs of past evolutionary processes making them good models for testing evolutionary hypotheses (Funk, *et al.*, 2012; Fouquet, *et al.*, 2012).

Pristimantis latro Oliveira, Rodrigues, Kaefer, Pinto, and Hernández-Ruz 2017 is found in the eastern Amazon between the Tapajós and the Tocantins–Araguaia Rivers occupying both banks of the Xingu River (Oliveira, *et al.*, 2017). In the region, primary forests have a high degree of fragmentation and degradation with the substitution of the land cover mainly by extensive livestock and the advance of soy crops (Almeida, *et al.*, 2014). Given the increase in environmental threats and habitat reduction on the newly described species and the lack of knowledge about the genetic structure of *P. latro*, we used fragments of the mitochondrial 16s rRNA and COI genes to: 1) Evaluate patterns of genetic structure; 2) test whether there is a relationship between the genetic distance and the geographic distance of different localities; 3) to reconstruct the phylogenetic relationships among the populations, and 4) to estimate the time of divergence between the sampled localities.

Methodology

Study area and sampling

Fifty-two individuals of *P. latro* were collected in eight municipalities in the state of Pará, Brazil: Santarém, Medicilândia, Brasil Novo, Vitória do Xingu, Altamira, Anapu, Senador José Porfírio, and Marabá (Figure 1). The forest composition in the study area varies from dense ombrophylous forest to lowland ombrophylous forest (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2012) with immense pasture areas.

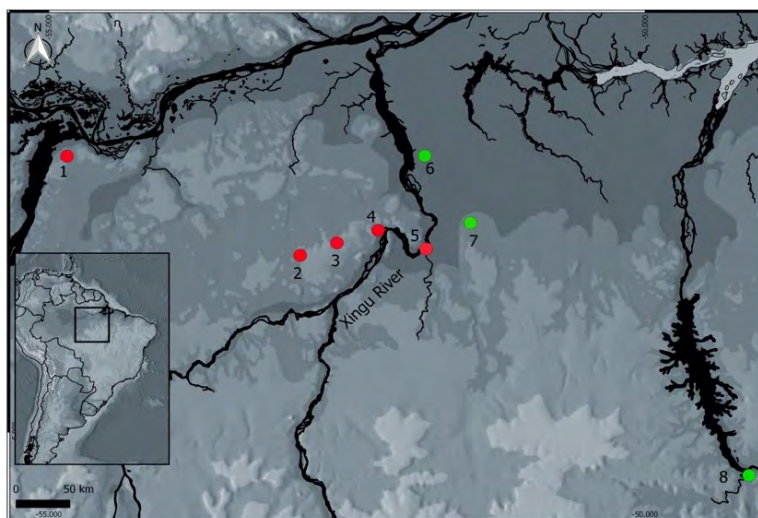


Figure 1. Map of *Pristimantis latro* capture localities. The red circles represent the localities from the left bank of the Xingu River and the green ones the localities from the right bank. The numbers correspond to the following sampled localities: 1) Santarém; 2) Medicilândia; 3) Brasil Novo; 4) Altamira; 5) Vitória do Xingu; 6) Senador José Porfírio; 7) Anapu (Type locality), and 8) Marabá.

The specimens collected in the field were euthanized with topical lidocaine ointment (benzotop®). The muscle or liver tissues were removed and stored in 95% ethanol. Specimens were fixed in 10% formalin, stored in 70% alcohol, and deposited in the Zoology Laboratory Collection- Adriano Giorgi of the Faculty of Biological Sciences at the Federal University of Pará – UFPA, Altamira Campus.

DNA extraction, amplification, and sequencing

The total genomic DNA was extracted with the CTAB protocol (Doyle & Doyle, 1987) and resuspended with 30 μ L of ultrapure water. DNA quality was verified using 1% agarose gel in electrophoresis. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify a 600 bp fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene and a 600 bp fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene.

The amplification reaction of the mitochondrial 16S rRNA gene fragment was done under the following conditions: An initial temperature of 92°C (60 sec.), followed by 35 cycles of 92°C (60 sec), 50°C (50 sec) and 72°C (1.5 min) and a final extension at 72°C for 7 min. For the amplification of the mitochondrial COI gene fragment, we used the following conditions: 95°C (3 min), followed by 35 cycles of 95°C (of 30 sec), 53°C (30 sec), and 72°C (40 sec), and a final extension of 72°C (7 min).

The sequencing reactions were performed using the BigDye™ Terminator kit (Life Technology) following the manufacturer's protocol and using the forward primers 16S A (mtDNA) (Palumbi, 1991) and COI LCO 1590 (Folmer, *et al.*, 1989). The products were precipitated with ethanol according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems™), resuspended in 10 μ L of formamide (Thermo Scientific™), and subsequently injected into the automatic ABI sequencer 3500XL (Applied Biosystems™).

Alignment of sequences and molecular dating

We aligned the sequences using the BioEdit software (Hall, 1999) using the ClustalW algorithm (Thompson, *et al.*, 1996) and edited manually (checking the spectrograms for errors). To infer the time of divergence between the *P. latro* localities, we built a species tree using the software BEAST v1.8 (Drummond, *et al.*, 2012) using both the 16S and COI genes with the GTR + G evolutionary model chosen in the jModelTest software (Darriba *et al.*, 2012) via corrected Akaike information criterion (AICc) and using a coalescent:

constant size as tree prior. The species of *Pristimantis* used as outgroup were described by **Oliveira, *et al.*** (2020). The total number of sequences used for each locality in this study are shown in **table 1**. Given the absence of a fossil record, we used a general mutation rate for the 16S of 0.0028 per lineages per millions of years (**Lymberakis, *et al.***, 2007; **Lemmon, *et al.***, 2008) and a fixed substitution rate of 1.0 to COI mtDNA according to **Fourdrilis, *et al.*** (2016). The chain (MCMC) had 500 million generations with a tree sampled every one thousand generations. Thus, we recorded 50.000 trees and discarded the first 10.000 considering a 20% burn-in.

We performed such analyses assuming a lognormal relaxed molecular clock, which presumes independent rates in different branches (**Drummond, *et al.***, 2006). The previous trees were modeled according to the Yule speciation process. The burn-in value was selected by viewing the log likelihoods associated with the distribution of the tree with the Tracer v1.5 software (**Drummond & Rambaut, 2007**), discarding 20% of the trees with the TreeAnnotator v1.6.6 (**Drummond & Rambaut, 2007**).

We obtained the uncorrected pairwise genetic distances p between localities in the program MEGA 6.0 (**Tamura, *et al.***, 2013) using the p distance for the 16S rRNA and the Kimura 2 parameter (K2P) for the COI.

Population structure analysis

We only used the COI gene as it had the largest number of sequenced locations compared to the 16S. We implemented a Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) in the BAPS 5.0 software (**Corander, *et al.***, 2008) to find clusters formed with the COI gene sequences (eight localities). The BAPS software uses nucleotide frequencies of the samples to infer the K number of genetically different groups through Bayesian analysis allocating similar sequences in the same group. The maximum number of K chosen for the analysis was eight, which corresponded to each locality. We used the log-likelihood value to choose the most likely grouping configuration. We performed an analysis of molecular variance (AMOVA) to infer the genetic differentiation between and within the *P. latro* populations using the Arlequin 3.0 program (**Excoffier, *et al.***, 2005).

To estimate the genealogical relationships among individuals, we produced a network of haplotypes based on the topology of a phylogenetic tree for the COI gene built with the TreeFinder software (**Jobb, 2011**) with 10,000 non-parametric bootstrap replicas (**Felsenstein, 1985**). We built the haplotypes network using the HaploView software (**Salzburger, *et al.***, 2011) to determine the number of haplotypes shared based on likelihood calculations. We did not use 16S gene sequences in the BAPS analysis and haplotypes network.

Table 1. Sampling localities of *Pristimantis latro* and respective numbers of mitochondrial genes (16S rRNA and COI) samples

Cluster	Local.	Locality	Coordinates	16S	COI
1	1	Santarém (PA)	2°1'24.44"S; 51°36'4.80"O	3	3
2 and 3	2	Medicilândia (PA)	3°26'37.93"S; 52°53'35.26"O	10	8
3	3	Brasil Novo (PA)	3°40'14.23"S; 52°30'51.87"O	1	1
3	4	Altamira (PA)	3°13'24.85"S; 52°14'22.74"O	16	8
3	5	Vitória do Xingu (PA)	3°23'12.95"S; 51°50'14.23"O	12	10
4 and 5	6	S. José Porfírio (PA)	2°34'7.60"S; 51°50'54.90"O	3	2
4 and 5	7	Anapu (PA)	3°9'28.15"S; 51°27'51.67"O	7	4
4 and 5	8	Marabá (PA)	5°22'50.86"S; 49° 7'46.12"O	-	2
Total				52	38

To calculate the relative importance of isolation by distance, we used the simple Mantel test performed in the Alleles In Space (AIS) program (Miller, 2005) for the COI marker only as it presented more localities. The Mantel test involves estimating the correlation between two matrices through Pearson's correlation r coefficient. The significance of r values was estimated by 1.000 permutations.

Results

Molecular dating and genetic distance

We obtained 52 sequences of the 16S rRNA gene fragment corresponding to eight haplotypes with 521 bp, 507 preserved sites, 14 variable sites, and 11 informative sites, as well as 41 COI DNAm sequences equivalent to 14 haplotypes with 617 bp, 579 preserved sites, 38 variable sites, and 31 informative sites. Within *P. latro*, the first cladogenesis event occurred around 0.860 Ma (95% HPD: 0.26 - 1.87 Ma), which separated the populations of Santarém (STM) from the others of *P. latro*. The second cladogenesis event was between the east and west margins around 0.380 Ma (95% HPD: 0.16 - 0.67 Ma) (Figure 2). Table 2 shows all the divergence times and the HPD interval.

The genetic distance within *P. latro* presented a variation of 0.1 – 8.3% for the COI gene (Supplementary material 1, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/956/2807>) and 0 – 1.7% for the 16S rRNA gene (Supplementary material 2, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/956/2808>). Between the left and right banks, the distance was 2.8 – 4.6% for COI and 0 – 1.5% for 16S. The greatest genetic

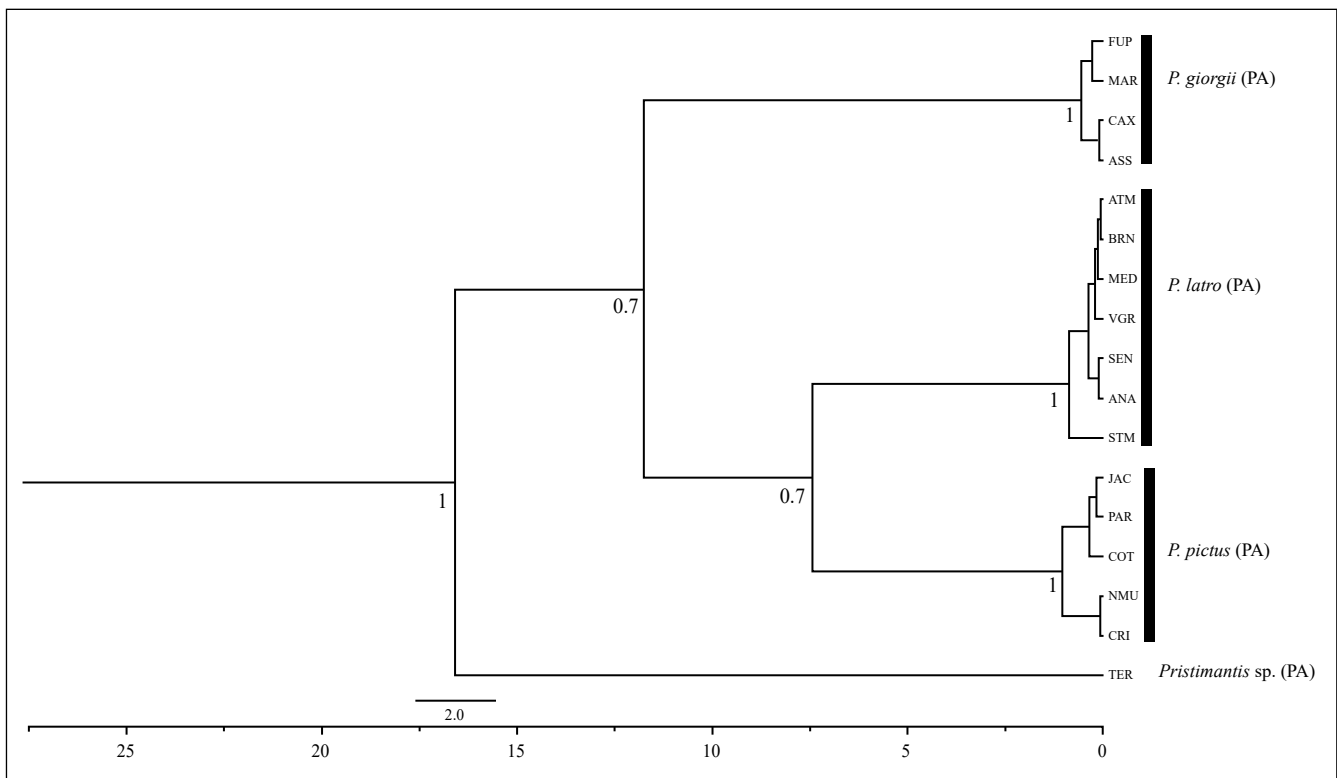


Figure 2. Tree of *P. latro* species based on the Bayesian analysis for the 16S and COI genes. The values of the branches indicate the posterior probability. The scale bar shows the number of replacements per site. Abbreviations represent the localities where *P. latro* was studied in the Xingu region: Municipality of Santarém (STM), Municipality of Medicilandia (MED), Brazil Novo (BRN), Altamira (ATM), Vitória do Xingu (VTX), Senador José Porfirio (SEN), and Anapu (ANA), those for *Pristimantis giorgii*: (FUP, Fazenda Uberlândia Portel - PA; MAR, Marabá - PA, and CAX, Caxiuanã - PA), for *P. pictus*: (JAC, Jacareacanga; PAR, Paranaíta - MT; COT, Cotriguaçu - MT; NMU, New World - MT; CRI, Cristalino - MT), and *Pristimantis* sp. (TER, Terra do Meio - PA).

distance (8.3% for COI) was between *P. latro* from the Marabá and Senador José Porfirio municipalities with a geographic distance of 443 Km, whereas for 16S (1.7%), it was between *P. latro* from the Brasil Novo + Medicilândia and Santarém municipalities with a geographic distance of 240 Km. The most geographically distant localities (Santarém and Marabá, located on the opposite banks of the Xingu River, 701 Km), showed a genetic distance of 5.1% for the COI. Due to the absence of sequences for the 16S gene from Marabá, this comparison could not be made, therefore, we compared the Santarém and Anapu municipalities (opposite banks of the Xingu River) ~377 Km apart, which presented a 1% genetic distance between one another.

Population structure

Pristimantis latro presented a marked genetic structure for the COI gene (logML = -382.8427; probability = 0.99) forming five clusters (**Figure 3**): Cluster 1 (Santarém); Cluster 2 (Medicilândia – A); Cluster 3 (Medicilândia-B, Brasil Novo, Altamira, and Vitória do Xingu); Cluster 4 (Senador José Porfirio-A and Anapu – A); and Cluster 5 (Anapu-B, Senador José Porfirio-B, and Marabá). In the haplotypes network (**Figure 4**), we observed no shared of haplotype between the east and west banks of the Xingu River corroborating the result of the BAPS.

The result of the AMOVA for the COI gene revealed that most of the genetic differentiation is distributed among the five clusters resulting from the haplotypes network and the BAPS (79.51%) while a smaller part within them (20.49%) ($\phi_{ST} = 0.79$; $p=0.00$) (**Table 3**) showed a marked population structure in *P. latro*. The Mantel test revealed a positive and significant correlation between geographic and genetic distances ($P<0.001$; $r=0.558$) indicating a marked role of random events in the reproductive isolation between populations and genetic drifting in the process of evolutionary diversification of the studied marker.

Table 2. Divergence time between populations of *Pristimantis latro*. Terra do Meio (TER); Santarém (STM); Medicilândia (MED); Brasil Novo (BRN); Altamira (ATM); Vitória do Xingu (VTX); Senador José Porfirio (SEN), and Anapu (ANA)

	Millions of years (Interval HPD 95%)
TER/ <i>Pristimantis</i> spp.	16.50 (4.16 - 24.81)
<i>P. giorgii</i> / <i>P. latro</i> + <i>P. pictus</i>	11.74 (6.04 - 16.83)
<i>P. pictus</i> / <i>P. latro</i>	7.43 (3.91 - 11.26)
STM/ANA+SEN+VTX+MED+BRN+ATM	0.86 (0.26 - 1.87)
SEN+ANA/VTX+MED+BRN+ATM	0.38 (0.16 - 0.67)

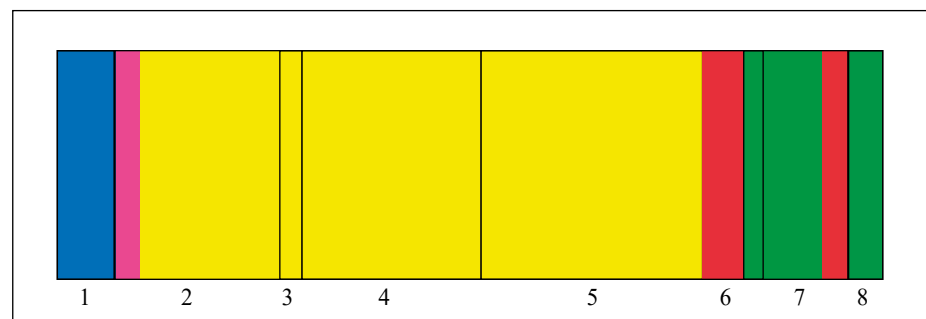


Figure 3. Population structure of *P. latro* from the COI mtDNA data. The vertically arranged colors represent each of the genetic groups (clusters). The numbers correspond to the sampled localities: 1) Santarém; 2) Medicilândia; 3) Brasil Novo; 4) Altamira; 5) Vitória do Xingu; 6) Senador José Porfirio; 7) Anapu, and 8) Marabá.

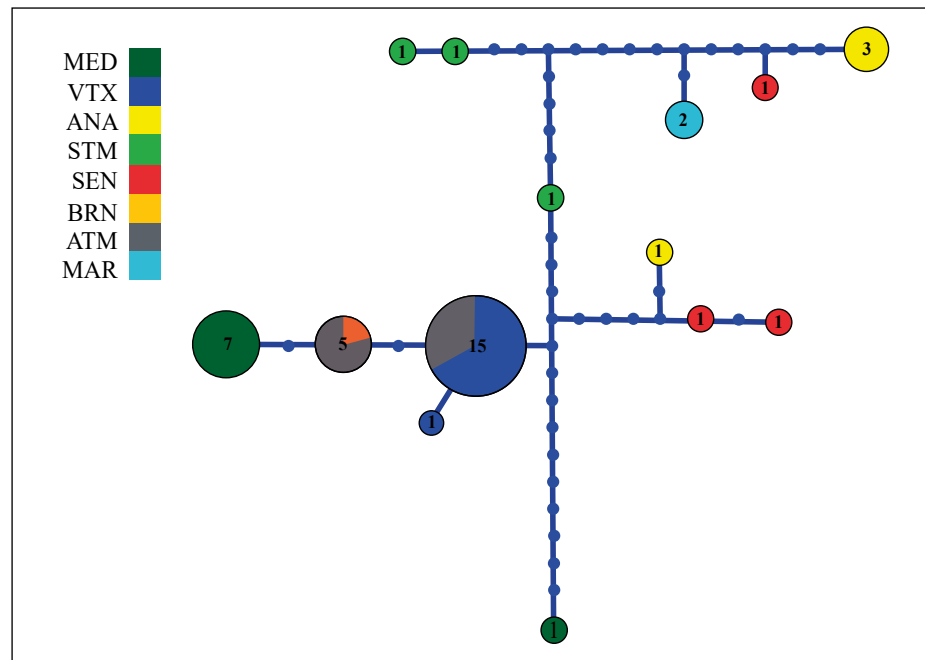


Figure 4. Median-joining haplotypes network based on DNAmT COI between populations of *Pristimantis latro*. Each haplotype is represented by a circle where the area is proportional to its frequency. The traits indicate additional mutational steps of branches with more than one mutation. The colors indicate each location. Blue dots represent lost or unsampled haplotypes. The abbreviations correspond to the sampled localities: Santarém (STM); Medicilândia (MED); Brasil Novo (BRN); Altamira (ATM); Vitória do Xingu (VTX); Senador José Porfírio (SEN); Anapu (ANA), and Marabá (MAR).

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) estimated to evaluate the genetic differentiation between and within the five clusters of *Pristimantis latro*

Source of variation	Component of variance	Variance %	Statistic ϕ	p value
COI				
Between populations	15.289 Va	79.51	$\phi_{ST} = 0.795$	0.00
Within populations	3.940 Vb	20.49		

Discussion

Pristimantis latro showed a strong genetic structure between the populations of the left and right bank of the Xingu River, as well as in the same bank. Anurans with direct development have life strategies that promote high population structure with species dispersing only by land where habitat heterogeneity inhibits dispersal across the landscape (Voss, *et al.*, 2001).

The genetic structure pattern found in the present study is similar to those described in other Amazon frogs by Fouquet, *et al.* (2015) where species without tadpoles exhibited a genetic structure associated with rivers as barriers. Also consistent with our results are those of the report by Guayasamin, *et al.* (2017) showing that color patterns in *Pristimantis ornatissimus* can be delimited by geographical barriers (elevation gradients, rivers). However, we could not make a thorough comparison with other species of the genus *Pristimantis* since most of the published works refer to Andean species while *P. latro* is found in lowlands.

We found a spatial pattern of distribution of genetic variability similar to that proposed in the rivers-as-barrier hypothesis by **Wallace** (1852). Such a pattern has been found in several studies of different terrestrial vertebrates (**Antonelli, et al.**, 2010). Finally, the sample design used in the present study did not evaluate if there was “permeability” of the rivers to gene flow in the respective extensions. Thus, our results add to a growing body of knowledge indicating that genetic variability at intra and interspecific levels in amphibians is related to the transposition of large Amazonian rivers (**Funk, et al.**, 2007; **Fouquet, et al.**, 2012; **Kaefer, et al.**, 2012; 2013; **Simões, et al.**, 2014).

The municipalities of Medicilândia (left bank of the Xingu River) and Senador José Porfírio and Anapu (right bank) presented more than one cluster per locality supporting local genetic structuring. Genetic structuring in amphibians at distances less than 5 km has already been documented (**Lampert, et al.**, 2003; **Andersen, et al.**, 2004; **Burns, et al.**, 2004) showing that limited gene flow can promote differentiation in local populations mainly due to habitat fragmentation. The Mantel test explains that 31% (r^2) of the variation is caused by geographic distance, but is not responsible for all structuring, which indicates that other factors are associated with this pronounced structuring (rivers).

The separation between the left and right banks of the Xingu River (middle of the Pleistocene) is relatively recent, however, it played an important role in population structuring (BAPS in **figure 3**) and the absence of haplotypes shared between the banks (haplotypes network in **figure 4**). **Ribas, et al.** (2012) suggested that the Xingu River acted a geographic barrier separating *Psophia interjecta* and *P. dextralis* around 0.8 – 0.3 Ma and was responsible for the separation of younger lineages. Recent rivers may represent recent or semipermeable barriers, as found for Amphibia and Squamata in the Tapajós River (**Moraes, et al.**, 2016).

Conclusions

Pristimantis latro presents genetic structure between the left and right banks of the Xingu River, as well as within the Tapajós-Xingu and Xingu-Tocantins interfluvial regions. The pattern of genetic structure found here corresponds to that described in recent articles for the genus *Pristimantis*, which reveals that species without tadpoles exhibit a genetic structure explained by the hypothesis of rivers as barriers.

Supplementary information

Supplementary material 1: Genetic distance p uncorrected (in %) COI between sampling locations of *P. latro*; 1) *P. latro* (Altamira); 2) *P. latro* (Brasil Novo); 3) *P. latro* (Medicilândia); 4) *P. latro* (Santarém); 5) *P. latro* (Vitória do Xingu); 6) *P. latro* (Anapu); 7) *P. latro* (Senador José Porfírio); 8) *P. fenestratus* (Borba); 9) *P. fenestratus* (Manaus); 10) *P. latro* (Marabá); 11) *Pristimantis* sp.; (Maranhão); 12) *P. zeeuctotylus* (Monte Alegre); 13) *P. bipunctatus* (Peru) and 14) *P. vilarsi* (Colombia). See the Supplementary material 1 in <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/956/2807>

Supplementary material 2?: Genetic distance p uncorrected (in %) 16S rRNA between sampling locations of *P. latro* 1) *P. latro* (Santarém, PA); 2) *P. latro* (Anapu, PA); 3) *P. latro* (Altamira, PA); 4) *P. latro* (Senador José Porfírio, PA); 5) *P. latro* (Altamira, PA); 6) *P. latro* (Medicilândia, PA); 7) *P. latro* (Brasil Novo, PA); 8) *P. fenestratus* (Manaus, AM); 9) *P. psamaipatae* (Bolivia); 10) *P. koehleri* (Bolívia); 11) *P. chiastonotus* (French Guyana) 12) *P. fenestratus* (Borba, AM); 13) *P. fenestratus* (Bolivia); 14) *P. fenestratus* (Borba, AM); 15) *P. vilarsi* (Colombia); 16) *P. conspicillatus* (Ecuador); 17) *P. zeeuctotylus* (Monte Alegre, PA); 18) *P. achatinus* (Colombia); 19) *P. zeeuctotylus* (Obidos, PA); 20) *P. zeeuctotylus* (Alenquer, PA) and 21) *P. skydmainos* (Peru). See the Supplementary material 2 in <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/956/2808>

Acknowledgments

We thank Faculdade de Ciências Biológicas Zoology Laboratory at the Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Altamira, the three anonymous reviewers for their contributions, and Dr. Jesus Rivas for reviewing the English of the abstract.

Authors contribution

GSC laboratory work and writing of the manuscript; EAO laboratory work, statistical analysis, writing and revision of the manuscript; KMX statistical analysis (AMOVA) and review of the manuscript; GWBS revision of the manuscript; IF manuscript writing; LRRR writing and revision of the manuscript; EJHR writing and revision of the manuscript.

Conflicts of interest

None

References

- Almeida, A.S. de, Vieira, I.C.G., Barros, M.N.R., Rocha, D.P.N.** (2014). Área de endemismo Belém e Xingu: configuração e espacialização do uso da terra e da cobertura vegetal. In: Thaise Emilio; Flávio Luizão. (Org.). Cenários para Amazônia: clima, biodiversidade e uso da terra. 1ed. Manaus: INPA, p. 57-66.
- Andersen, L.W., Fog, K., Damgaard, C.** (2004). Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. **271**: 1293-1302. Doi: 10.1098/rspb.2004.2720
- Antonelli, A., Quijada-Mascareñas, A., Crawford, A.J., Bates, J.M., Velazco, P.M., Wuster, W.** (2010). Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. Molecular studies of Amazonian tetrapods. En C. Hoorn and F. P. Wesselingh (Ed), Amazonia: Landscape and Species Evolution: A look into the past (pp. 385-404). Wiley-Blackwell
- Bates, H.** (1874). The naturalist on the River Amazon. John Murray, London. 506 pp.
- Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A.** (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? Biological Conservation. **125**: 271-285. Doi: 10.1016/j.biocon.2005.04.009
- Bogart, J. P.** (1991). The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego. p. 233-258.
- Burns, E.L., Eldridge, M.D.B., Houlden, B.A.** (2004). Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid *Litoria aurea*. Molecular Ecology. **13**: 1745-1757. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02190.x
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J.** (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. BMC bioinformatics. **9**: 1-14. Doi: 10.1186/1471-2105-9-539
- Da Rocha, D.G., Kaefer, I.L.** (2019). What has become of the refugia hypothesis to explain biological diversity in Amazonia? Ecology and Evolution. **9**: 4302-4309. Doi:10.1002/ece3.5051
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.** (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. **9**: 772. Doi: 10.1038/nmeth.2109
- Doyle, J.J., Doyle, J.L.** (1987). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. **12** (1): 13-15.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A.** (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology. **4**: 699-710. Doi: 10.1371/journal.pbio.0040088
- Drummond, A.J., Rambaut, A.** (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology. **7**: 1-8. Doi: 10.1186/1471-2148-7-214
- Drummond, A. J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A.** (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution. **29**: 1969-1973. Doi: 10.1093/molbev/mss075
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S.** (2005). Arlequin 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolution Bioinformatics Online. **1**: 47-50.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution. **39**: 783-791. Doi: 10.2307/2408678
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology Biotechnology. **3**: 294-299.

- Fouquet, A., Ledoux, J.B., Dubut, V., Noonan, B.P., Scotti, I.** (2012). The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog. *Biological Journal of the Linnean Society*. **106**: 356-373. Doi: 10.1111/j.1095-8312.2012.01871.x
- Fouquet, A., Martínez, Q., Courtois, E.A., Dewynter, M., Pineau, K., Gaucher, P., Blanc, M., Marty, C., Kok, P.J.R.** (2013). A new species of the genus *Pristimantis* (Amphibia, Craugastoridae) associated with the moderately elevated massifs of French Guiana. *Zootaxa*. **3750**: 569-586. Doi: 10.11646/zootaxa.3750.5.8
- Fouquet, A., Courtois, E.A., Baudain, D., Lima, J.D., Souza, S.M., Noonan, B.P., Rodrigues, M.T.** (2015). The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. *Journal of Tropical Ecology*. **31**: 361-373. Doi: 10.1017/S0266467415000206
- Fourdrilis, S., Mardulyn, P., Hardy, O.J., Jordaens, K., Freitas Martins, A.M. de, Backeljau, T.** (2016). Mitochondrial DNA hyperdiversity and its potential causes in the marine periwinkle *Melarhappe neritoides* (Mollusca: Gastropoda). *PeerJ*. **4**: e2549. Doi: 10.7717/peerj.2549
- Funk, W.C., Caldwell, J.P., Peden, C.E., Padial, J.M., De la Riva, I., Cannatella, D.C.** (2007). Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **44**: 825-837. Doi: 10.1016/j.ympev.2007.01.012
- Funk, W.C., Caminer, M., Ron, S.R.** (2012). High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **279**: 1806-1814. Doi: 10.1098/rspb.2011.1653
- Guayasamin, J.M., Hutter, C.R., Tapia, E.E., Culebras, J., Pyron, R.A., Morochz, C., Funk, W.C., Arteaga, A.** (2017). Diversification of the rainfrog *Pristimantis ornatissimus* in the lowlands and Andean foothills of Ecuador. *PLoS ONE*. **12**: 1-21.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*: 95-98.
- Heinicke, M.P., Duellman, W.E., Trueb, L., Means, D.B., Macculloch, R.D., Hedges, S.B.** (2009). A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa*. **2111**: 1-35. Doi: 10.11646/zootaxa.2211.1.1
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE** (2012). Manual técnico da vegetação brasileira. Rio de Janeiro. 271p.
- Jobb, G., Haeseler, A. V., Strimmer, K.** (2011). TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, **4**:18. doi: 10.1186/1471-2148-4-18.
- Kaefler, I.L., Kaefler, I.L., Tsuji-Nishikido, B.M., Lima, A.P.** (2012). Beyond the river: Underlying determinants of population acoustic signal variability in Amazonian direct-developing *Allobates* (Anura: Dendrobatoidea). *Acta Ethologica*. **15**: 187-194. Doi: 10.1007/s10211-012-0126-0
- Kaefler, I.L., Tsuji-Nishikido, B.M., Mota, E.P., Farias, I.P., Lima, A.P.** (2013). The Early Stages of Speciation in Amazonian Forest Frogs: Phenotypic Conservatism despite Strong Genetic Structure. *Evolutionary Biology*. **40**: 228-245. Doi: 10.1007/s11692-012-9205-4.
- Lampert, K.P., Rand, A.S., Mueller, U.G., Ryan, M.J.** (2003). Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology*. **12**: 3325-3334. Doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.02016.x
- Lemmon, E.M., Lemmon, A.R., Collins, J.T., Cannatella, D.C.** (2008). A new North American chorus frog species (Amphibia: Hylidae: *Pseudacris*) from the south-central United States. *Zootaxa*. **1675**: 1-30.
- Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthalous, G., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M.** (2007). Mitochondrial phylogeography of *Rana (Pelophylax)* populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **44**: 115-125. Doi: 10.1016/j.ympev.2007.03.009
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G.** (1991) "The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0." Privately published document compiled by S. Palumbi, Dept. Zoology, Univ. Hawaii.
- Miller, M.P.** (2005). Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. *Journal of Heredity*. **96**: 722-724. Doi: 10.1093/jhered/esi119
- Moraes, L.J.C.L., Pavan, D., Barros, M.C., Ribas, C.C.** (2016). The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *Journal of Biogeography*. **43**: 2113-2124. Doi: 10.1111/jbi.12756

- Oliveira, E.A., Rodrigues, L.R., Kaefer, I.L., Pinto, K.C., Hernández-Ruz, E.J.** (2017). A new species of *Pristimantis* from eastern Brazilian Amazonia (Anura: Craugastoridae). *ZooKeys*. **2017**: 101-129. Doi: 10.3897/zookeys.687.13221
- Oliveira, E.A., Silva, L.A., Silva, E.A.P., Guimaraes, K.L.A., Penhacek, M.P., Martínez, J.G., Rodrigues, L.R.R., Santana, D.J., Hernández-Ruz, E.J.** (2020). Four new species of *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870 (Anura: Craugastoridae) in the eastern Amazon. *PLoS One*. **15** (3): e0229971.
- Ribas, C.C., Aleixo, A., Nogueira, A.C.R., Miyaki, C.Y., Cracraft, J., Andre, A.** (2012). A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **279**: 681-689. Doi: 10.1098/rspb.2011.1120
- Rodríguez, A., Bomer, M., Pabijan, M., Gehara, M., Haddad, C.F.B.** (2015). Genetic divergence in tropical anurans: Deeper phylogeographic structure in forest specialists and in topographically complex regions. *Evolutionary Biology*. **29**: 765-785.
- Salzburger, W., Ewing, G.B., von Haeseler, A.** (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*. **20**: 1952-1963. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05066.x
- Simões, P.I., Stow, A., Hödl, W., Amézquita, A., Farias, I.P., Lima, A.P.** (2014). The value of including intraspecific measures of biodiversity in environmental impact surveys is highlighted by the Amazonian brilliant-thighed frog (*Allobates femoralis*). *Tropical Conservation Science*. **7**: 811-828. Doi: 10.1177/194008291400700416
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. **30**: 2725-2729. Doi: 10.1093/molbev/mst197
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1996). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. **22**: 4673-4680. Doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Vieites, D.R., Wollenberg, K.C., Andreone, F., Kohler, J., Glaw, F., Vences, M.** (2009) Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106**: 8267-8272. Doi: 10.1073/pnas.0810821106
- Vos, C.C., Antonisse-de Jong, A.G., Goedhart, P.W., Smulders, M.J.M.** (2001). Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*. **86**: 598 - 608. PMID: 11554976
- Wallace, A.R.** (1852). On the Monkeys of the Amazon. *Zoological Society of London*. **20**: 107-110.
- Wells, K.D.** (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago, USA: The University of Chicago Press. Pp. 1148
- Wright, S.** (1943). Isolation by distance. *Genetics*. **28**: 114-138. Doi: 10.5194/isprs-Archives-XLII-5-W1-419-2017

Artículo original

Densidad poblacional de la guacharaca colombiana (*Ortalis columbiana*) en un fragmento de bosque subandino en el Valle del Cauca, Colombia

Ortalis columbiana population density in a sub-Andean forest fragment in Valle del Cauca, Colombia

✉ Néstor Javier Roncancio-Duque

Fundación EcoAndina-Wildlife Conservation Society, Programa Colombia; Doctorado en Ciencias Agrarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Resumen

Las especies endémicas con requerimientos ecológicos muy específicos o bajas densidades poblacionales son prioritarias en términos del diagnóstico de su estado de conservación. Para conocer el de una especie es necesario determinar su abundancia y su tendencia en el marco de programas rigurosos de monitoreo. El territorio del Valle del Cauca ha sido muy intervenido y actualmente solo existen remanentes de bosque, entre ellos, la Reserva Natural Bosque de Yotoco (RNBY), en el municipio de Yotoco. Allí habita *Ortalis columbiana*, especie endémica de Colombia, cuya densidad no ha sido documentada. En ese contexto, se estimó la densidad poblacional para conocer el estado de conservación de esta especie en la RNBY mediante el método de muestreo por distancia con 32 transectos lineales y más de 200 km de esfuerzo de muestreo. Se encontró una densidad poblacional de 19,2 ind/km² (IC_{95%}: 9,8-37,6) con un tamaño medio de grupo de 1,56 individuos (IC_{95%} = 1,4-1,8). Este resultado es relativamente mayor que las estimaciones hechas para otras especies de crácidos, únicos referentes de comparación, y sugiere que la población sería de cerca de 100 individuos solo en la Reserva. Este tamaño poblacional podría considerarse bajo para mantener una población viable, no obstante, es importante considerar su presencia y abundancia en los agroecosistemas adyacentes para llegar a conclusiones sobre su viabilidad poblacional.

Palabras clave: Fragmentación; Guacharaca colombiana; Reserva Natural Bosque de Yotoco.

Abstract

The conservation of endemic species with high ecological requirements or low population densities is a priority to diagnose their status. For such a diagnosis, it is necessary to determine their abundance and trends in the framework of a rigorous monitoring program. The Cauca River valley has been highly transformed and currently there are only forest remnants like the one in the natural reserve *Bosque de Yotoco* (RNBY) where *Ortalis columbiana*, an endemic species from Colombia, can be found. The species density has not been documented; to determine its conservation status in the RNBY, the population density was estimated using the distance sampling method with 32 line transects and more than 200 km of sampling effort. The population density was 19,2 ind/km² (95% confidence interval: 9.8-37.6) while the mean group size was 1,56 individuals (95%CI: 1,4 – 1,8), which is relatively higher than the estimations done for other Cracides species, only referents to compare. These figures suggest a population of around 100 individuals just in the Reserve, which could be insufficient for a viable population. It is important to consider the species presence and abundance in the adjacent agroecosystems to get to conclusions about its population viability.

Keywords: *Bosque de Yotoco* Natural Reserve; Colombian *Chacalaca*; Fragmentation.

Citación: Roncancio-Duque NJ. Densidad poblacional de la guacharaca colombiana (*Ortalis columbiana*) en un fragmento de bosque subandino en el Valle del Cauca, Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):740-746, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1145>

Editor: Martha Patricia Ramírez Pinilla

Correspondencia:

Néstor Javier Roncancio-Duque;
nroncanciod@gmail.com

Recibido: 17 de enero de 2020

Aceptado: 28 de marzo de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Introducción

El conocimiento de los patrones de la abundancia de especies animales es fundamental para deducir la dinámica de los ecosistemas (Stephens, *et al.*, 2019). Cuando se trata de especies raras, es decir, aquellas con requerimientos ecológicos específicos, bajas densidades poblacionales y una distribución geográfica restringida (<50.000 km², endemismo) (Rabinowitz, *et al.*, 1986), el establecimiento de los límites de las abundancias y los factores que las determinan permite precisar los umbrales de tolerancia frente a la disponibilidad de recursos (Carbone, *et al.*, 2011) y predecir las potenciales respuestas a los cambios ambientales para orientar su manejo (Bayliss & Choquenot, 2002; Lindenmayer, *et al.*, 2011).

Cuando las densidades poblacionales son bajas, las especies quedan expuestas a eventos estocásticos, ya que en lugares intervenidos las abundancias absolutas pueden llegar a ser muy bajas (Flather, *et al.*, 2011). En ese sentido, la población global de una especie rara puede reducirse y aislarse rápidamente debido a las presiones antropogénicas o naturales (Gaston, 1994; Gaston & Blackburn, 2000).

En el valle geográfico de río Cauca se distribuyen varias especies de crácidos, entre ellos, la guacharaca colombiana (*Ortalis columbiana*) (Kattan, *et al.*, 2016). En esta zona las coberturas vegetales naturales se han reducido en cerca del 90 % pasando de alrededor de 14.000 km² a cerca de 1.600 km², con un poco más de 900 fragmentos de bosque de 183 ha en promedio (coeficiente de variación, CV=759), los cuales tienden a ser alargados (índice medio de forma de 2,6 según cálculos del autor para el presente trabajo). Así, los remanentes de bosque están sometidos a los efectos de la fragmentación (tamaño, distancia de aislamiento y borde) (Bennett & Saunders, 2010).

Ortalis columbiana es una especie endémica y, por ello, inherentemente vulnerable, aunque está categorizada como una especie de “preocupación menor” (Birdlife International, 2016). No obstante, parece que sus poblaciones tienden a reducirse y no se han hecho diagnósticos cuantitativos que permitan describir su estado de conservación y su tendencia con precisión (Birdlife International, 2016). Por otro lado, frecuentemente se la ha registrado en agroecosistemas, por ejemplo, en la zona rural subandina del municipio de Palmira, Valle del Cauca, y en ambientes periurbanos en los municipios del Valle de Aburrá, Antioquia (Observación personal), lo que permitiría suponer un cierto nivel de tolerancia a la modificación del paisaje.

Para conocer el estado de una población es necesario estimar su abundancia y uno de los indicadores más adecuados es la densidad poblacional, dado que esta variable refleja la relación entre la población y el área que ocupa (Witmer, 2005). Considerando que los parámetros demográficos cambian en espacio y tiempo, su monitoreo es esencial para determinar las tendencias y las relaciones con los factores que las determinan, sobre todo en lugares de disturbio natural o antrópico, de tal forma que se tenga información confiable para adoptar estrategias de manejo en el marco de la adopción estructurada de decisiones (Lindenmayer, *et al.*, 2011).

En este contexto, y con el objetivo de aproximarse al estado de conservación de la especie, por lo menos en una localidad, se estimó la densidad poblacional de *O. columbiana* en la Reserva Natural Bosque de Yotoco (RNBY) (municipio de Yotoco, Valle del Cauca), una de las únicas áreas protegidas donde se registra la especie en el valle geográfico del río Cauca y, ante la ausencia de estimaciones de densidad para la especie, se la comparó con las estimaciones hechas para otras especies de crácidos bajo diferentes condiciones.

Materiales y métodos

La RNBY es un fragmento de 559 ha ubicado en el departamento del Valle del Cauca, en la vertiente oriental de la cordillera Occidental (3°52' Norte – 76°26' Oeste) (Figura 1) entre los 1.200 y 1.700 m de altitud; su temperatura media es de 19,98 °C (desviación estándar, DE: +/- 0,4) y la precipitación promedio de 1.294 mm anuales (DE +/- 52) (Hijmans, *et al.*, 2005). La reserva se encuentra en transición entre las zonas naturales de vida de

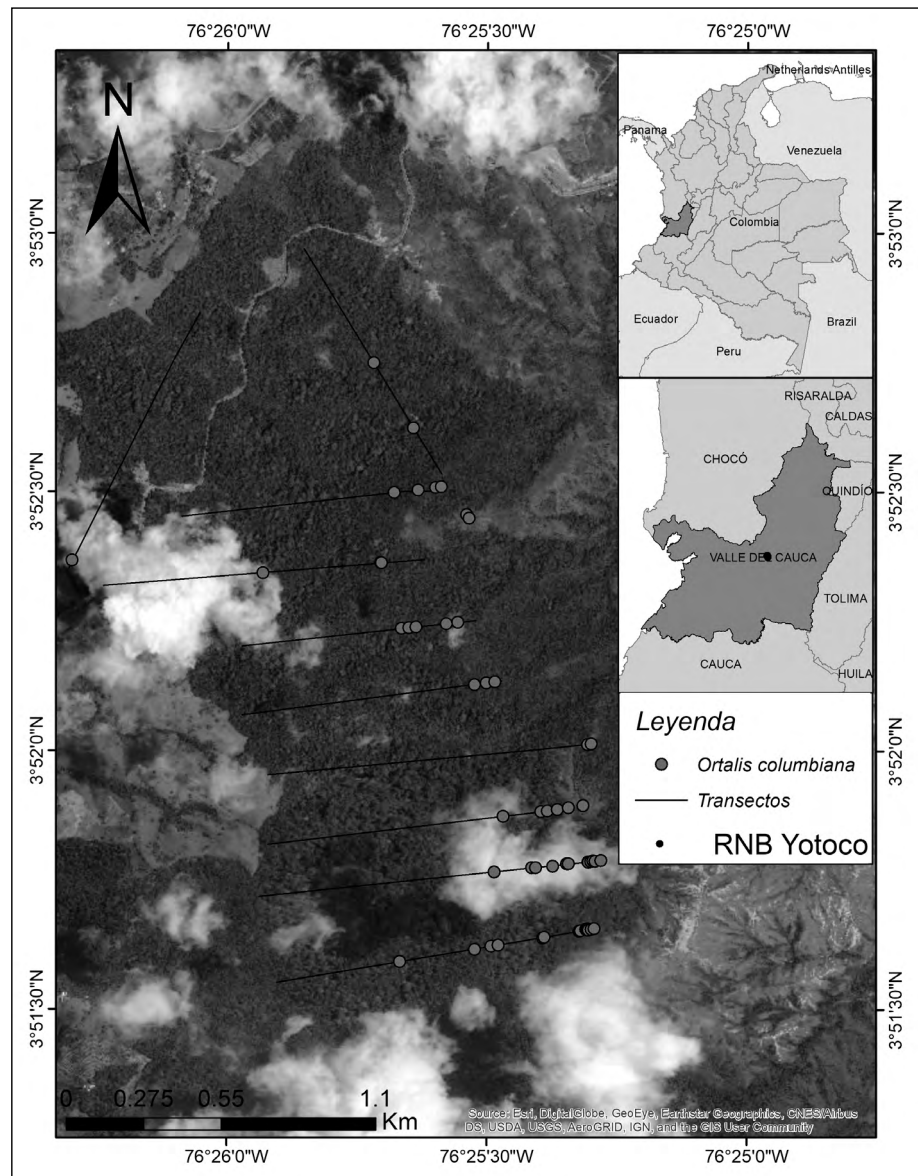


Figura 1. Área de estudio en la Reserva Natural Bosque de Yotoco, Valle del Cauca, Colombia. Los puntos grises sobre la cobertura boscosa indican los registros visuales de *Ortalis columbiana* obtenidos en los muestreos. Algunas áreas por donde pasaban los transectos aparecen cubiertas por nubes, pero allí la cobertura vegetal es homogénea con la del resto de la reserva. El borde oriental del bosque está en la zona más baja, 1.200 m s.n.m., y el occidental en la zona más alta, 1.700 m s.n.m.

bosque premontano húmedo y seco (Holdridge, 1947) y la mayor parte está cubierta por vegetación de bosque maduro y en regeneración en diferentes estados de sucesión, proceso iniciado después de su establecimiento como área protegida en 1959. Recientemente, se han agregado a la RNBY áreas previamente usadas para pastoreo en donde se está permitiendo la regeneración de la cobertura vegetal natural (Jaramillo, comunicación personal).

Los datos para estimar la densidad poblacional de *O. columbiana* se recolectaron entre febrero y junio de 2004 mediante el método de muestreo por distancias con transectos lineales (Buckland, et al., 2007). Se hizo un muestreo con 32 transectos y una longitud promedio de 369 m (DE=22,7), distribuidos sistemáticamente en todo el fragmento sin discriminar por tipo de cobertura vegetal dada su relativa homogeneidad. La velocidad

media de desplazamiento de los observadores fue de 0,5 km/hora y cada transecto se muestreó en promedio 21 veces (rango: 14 a 26) para un esfuerzo de muestreo acumulado de 241,1 km. Los recorridos se realizaron entre las 8:00 y las 11:00 horas y entre las 14:00 y las 18:00. Las distancias perpendiculares fueron medidas con cinta métrica hasta el sitio inicial de la detección del individuo o el centro geográfico de la bandada.

El análisis de los datos se hizo con el programa Distance 7,1 (Thomas, *et al.*, 2009). Para seleccionar el modelo matemático que mejor se ajustara a la distribución de frecuencias de las distancias perpendiculares, se compararon los datos mediante pruebas de bondad de ajuste con seis modelos: 1) semi-normal con serie de expansión de tipo coseno; 2) semi-normal con polinomio de Hermite; 3) uniforme con coseno; 4) uniforme con polinomio simple; 5) de tasa de riesgo con coseno, y 6) de tasa de riesgo con polinomio simple. El modelo seleccionado para las inferencias finales fue el que presentó el menor valor en el criterio de información de Akaike (AIC) (Buckland, *et al.*, 2007). El CV de la densidad se estimó a partir de la varianza muestral del tamaño del grupo, la tasa de encuentro y la probabilidad de detección. En el análisis exploratorio de los datos se encontraron valores extremos en las medidas de distancia perpendicular, por lo que se truncaron los datos después de los 16 m para un mejor ajuste (Buckland, *et al.*, 2007).

Resultados y discusión

En el muestreo se registraron 56 observaciones de *O. columbiana* para una tasa de encuentro de 0,23 registros por kilómetro recorrido (IC_{95%}: 0,12 – 0,44). La distribución de frecuencias de las distancias perpendiculares presentó un mejor ajuste al modelo uniforme con serie de expansión de tipo coseno (Tabla 1S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1145/2809> y figura 1S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1145/2810>). La densidad poblacional estimada para *O. columbiana* fue de 19,2 ind/km² (IC_{95%}: 9,8-37,6) con un tamaño medio de grupo de 1,56 individuos (IC_{95%}: 1,4 – 1,8; rango: 1 – 3). La abundancia total estimada estuvo alrededor de 107 individuos (IC_{95%}: 55- 210). El coeficiente de variación para la densidad de individuos y la densidad de grupos fue de 34,11 y 33,59 %, respectivamente. El componente que más aportó a la varianza de la densidad fue la tasa de encuentro, con un 90,3 %, seguido por la probabilidad de detección, con 6,7 %, y el tamaño de grupo, con 3,0 %.

La densidad poblacional de *O. columbiana* en este muestreo resultó mayor comparada con algunas estimaciones de especies de crácidos de otros géneros, entre ellos, *Crax allector* (Thiollay, 1989), *Mitu tuberosa* (Begazo & Bodmer, 1998), *Penelope jacuaco* (Begazo & Bodmer, 1998) y *Pipile cumanensis* (Begazo & Bodmer, 1998), incluidas las estimaciones en zonas sin presión de cacería en hábitats continuos (Kattan, *et al.*, 2016). También resultó mayor a la densidad de *Crax daubentoni* en sabanas tanto en la época seca como en la húmeda (Bertsch & Barreto, 2008). Este resultado era de esperar dado que el género *Ortalis* comprende un grupo de pequeños crácidos que, dada la relación alométrica inversa entre el tamaño corporal y la densidad, tienden a presentar densidades más altas que otros crácidos de mayor tamaño (Jenkins, *et al.*, 2007). Sin embargo, la densidad de *O. columbiana* en la RNBY no fue significativamente mayor a la estimada para *Penelope perspicax* en un muestreo simultáneo en la misma localidad (Kattan, *et al.*, 2014). Asimismo, la densidad de *O. columbiana* en la RNBY resultó menor que la de *C. daubentoni* en las épocas seca y húmeda en bosques de galería y bosques secos. No hay estimaciones de densidad comparables para *O. columbiana*. Para otras especies del género *Ortalis* se han estimado densidades en diferentes tipos de hábitat (bosque continuo, agroecosistemas, bosques urbanos, bosques de tierra firme, bosques de várzea o igapós) y con diferente presión de cacería. Las estimaciones documentadas están entre 1,0 y 1,5 ind/km² y hasta 50 y 172 ind/km², en tanto que para *O. ruficauda* han sido de 48 a 67 ind/km² y 17 a 20 ind/km² (Schmitz-Ornés, 1999), para *O. guttata* de 1,44 ind/km² en bosques de várzea y de 1,05 en los igapós (Haugaasen & Peres, 2008), y de 3,28, 3,6 y 5,95 ind/ km² en diferentes tipos de hábitat (Begazo & Bodmer, 1998), en tanto que para

O. canicollis han sido de 172,1 y 41,9 en hábitats sin presión de cacería y en otros con alta presión de cacería, respectivamente (Mamani, 2001). En comparación con *O. ruficauda* en Venezuela, específicamente, la densidad de *O. columbiana* fue similar a la encontrada en zonas urbanizadas adyacentes a bosques continuos, aunque menor a la de agroecosistemas también adyacentes a bosques continuos (Schmitz-Ornés, 1999). Este resultado podría deberse a una menor presión de cacería en las zonas urbanizadas o a la oferta de un recurso puntual. Comparada con *O. guttata*, especie más emparentada filogenéticamente con *O. columbiana* (Salaman, et al., 2001; Donegan, et al., 2010), la densidad fue entre 4 y 20 veces mayor (Haugaasen & Peres, 2008), lo que se podría explicar por la menor productividad de la Amazonia comparada con los bosques andinos, y la mayor diversidad de especies en los bosques continuos que pueden competir en algunas dimensiones del nicho con las *Ortalis* (Hutchinson, 1957). Sin embargo, es esencial adelantar estudios inferenciales (comparativos o que evalúen relaciones) de *O. columbiana* controlando factores alineados para poder determinar con mayor confianza aquellos que determinan la abundancia de esta especie y que ayuden a comprender la gran variación en este indicador para la familia (Kattan, et al., 2016).

A pesar del número de transectos establecidos (32) y del número de registros obtenidos (56), el coeficiente de variación fue de 34 %, siendo más afectado por la variación en la tasa de encuentro (90 %). Esto refleja que la especie está haciendo un uso diferencial, probablemente agregado, del área de la reserva, es decir, pocos transectos acumularon una mayor cantidad de registros (Tabla 2S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1145/2811>). Con este muestreo no es posible plantear conclusiones sobre las causas de este probable uso diferencial y saber si obedece a la concentración de un recurso o a un desplazamiento generado por otra especie, si la situación es temporal o responde a un patrón constante. *O. columbiana* se ha concebido usualmente como una especie generalista y se detecta incluso en zonas periurbanas (Birdlife International, 2016). Sin embargo, los resultados presentados sugerirían que hay factores limitantes o de preferencia todavía por evaluar, los cuales puedan limitar el uso del espacio y la probabilidad de ocupación, incluso en fragmentos relativamente bien conservados.

Es necesario considerar el paisaje en el cual se encuentra la RNBY, que incluye otros fragmentos de bosques y agroecosistemas, y verificar la presencia de la especie haciendo estimaciones de abundancia para plantear conclusiones sobre la viabilidad de esta población. Además, teniendo en cuenta el CV de la densidad, la potencia estadística para hacer un monitoreo efectivo (detectar cambios o tendencias) implica que se den cambios de 4,59 ind/km², casi un 24 %, para poder detectarlos (Matthews, 2006). En ese sentido es necesario refinar el diseño de muestreo, por ejemplo, determinando probables factores que actúan sobre la densidad, de tal forma que se puedan diferenciar estratos o bloques y explicar mejor la varianza en la tasa de encuentro. Asimismo, debe incrementarse el esfuerzo de muestreo, preferiblemente con más unidades muestrales (transectos), e ir más allá de la reserva para involucrar la gestión en los agroecosistemas adyacentes en un trabajo articulado con las comunidades locales, con el fin de propiciar la conectividad funcional del paisaje, aspecto que probablemente favorezca la especie tal como se encontró para *O. ruficauda*, cuya abundancia en los fragmentos aislados de bosques continuos fue muy baja (Schmitz-Ornés, 1999).

Conclusión

La densidad poblacional estimada para *O. columbiana* en la Reserva Natural Bosque de Yotoco fue de alrededor de 19 individuos por kilómetro cuadrado. Este valor permite inferir un tamaño poblacional de aproximadamente 100 individuos. Si se considera solo la reserva, esta población podría llegar a no ser viable; dada la precisión del estimador, los cambios deben ser significativos para poder ser detectados. Es necesario hacer replicas temporales de esta medición y refinar el diseño de muestreo, además de considerar otras áreas cercanas a la reserva para llegar a conclusiones sobre la tendencia de esta población y su estado de conservación.

Material suplementario

Tabla 1S. Relación de los modelos teóricos probados y los parámetros estimados para determinar el ajuste de los datos de distancia perpendicular. AIC= Criterio de información de Akaike (Sigla en inglés), ESW= Ancho efectivo de transecto (Sigla en inglés), P= probabilidad de detección. Ver la tabla 1S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1145/2809>

Figura 1S. Histograma de frecuencias de las medidas de distancia perpendicular de las detecciones. La línea roja determina el modelo teórico, *Uniforme coseno*, que presentó el mejor ajuste y menor número de parámetros (menor AIC). Ver la figura 1S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1145/2810>

Tabla 2S. Relación de número de registros, esfuerzo de muestreo y abundancia relativa (Número de registros/kilometro recorrido). Ver la tabla 2S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1145/2811>

Agradecimientos

Los datos empleados en el artículo se tomaron durante el muestreo del proyecto “Densidad poblacional de mono aullador rojo en el Valle del Cauca”, llevado a cabo por la Fundación EcoAndina y el programa Colombia de la *Wildlife Conservation Society* dirigido por María Carolina Gómez-Posada. Se agradece a la Fundación EcoAndina-WCS por el apoyo técnico, a la CVC por la financiación y a la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por la autorización y el apoyo para trabajar en la Reserva. Se agradece asimismo a Paola Wanesa Hincapié por la ayuda en la toma de los datos y a Sandy Pestaña por el apoyo en la edición del documento, así como a los revisores anónimos por sus correcciones y comentarios para mejorar el documento.

Conflicto de intereses

Declaro no tener ningún tipo de conflicto de intereses frente al contenido de este documento.

Referencias

- Bayliss, P. & Choquet, D. (2002). The numerical response: rate of increase and food limitation in herbivores and predators. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. **357** (1425): 1233-1248.
- Begazo, A. J. & Bodmer, R. E. (1998). Use and conservation of Cracidae (Aves: Galliformes) in the Peruvian Amazon. *Oryx*. **32** (4): 301-309.
- Bennett, A. F. & Saunders, D. A. (2010). Habitat fragmentation and landscape change. *Conservation Biology for All*. **93**: 1544-1550.
- Bertsch, C. & Barreto, G. R. (2008). Abundancia y área de acción del paují de copete (*Crax daubentoni*) en los llanos centrales de Venezuela. *Ornitología Neotropical*. **19** (Supplement): 287-293.
- BirdLife International. (2016). *Ortalis columbiana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22728519A94989120. Doi: 10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22728519A94989120.en
- Buckland, S. T., Anderson, D. R., Burnham, K. P., Thomas, L. (2007). Advanced distance sampling: Estimating abundance of biological populations. Oxford, UK: Oxford University Press. p. 416.
- Carbone, C. & Gittleman, J.L. (2002). A common rule for the scaling of carnivore density. *Science*. **295**: 2273-2276.
- Donegan, T., Salaman, P., Caro, D., McMullan, M. (2010). Revision of the status of bird species occurring in Colombia 2010. *Conservación Colombiana*. **13**: 25-54.
- Flather, C.H., Hayward, G.D., Beissinger, S.R., Stephens, P.A. (2011). Minimum viable populations: is there a “magic number” for conservation practitioners? *Trends Ecol. Evol.* **26**: 307-316.
- Gaston, K. J. (1994). *Rarity*. London, UK: Chapman and Hall. p. 224.
- Gaston, K. J. & Blackburn, T. M.. (2000). *Pattern and process in macroecology*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. p. 392.
- Haugaasen, T. & Peres, C. A. (2008). Population abundance and biomass of large-bodied birds in amazonian flooded and unflooded forests. *Bird Conservation International*. **18** (2): 87-101.

- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., Jarvis, A.** (2005). Very High Resolution Interpolated Climate Surfaces for Global Land Areas. *International Journal of Climatology*. **25** (15): 1965-1978.
- Holdridge, L. R.** (1947). Determination of World Plant Formations From Simple Climatic Data. *Science*. **105** (2727): 367-68.
- Hutchinson, G. E.** (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **22** (2): 415-427.
- Jenkins, D. G., Brescacin, C. R., Duxbury, C. V., Elliott, J. A., Evans, J. A., Grablow, K. R., Hillegass, M., Lyon, B. N., Metzger, G. A., Olandese, M. L., Silvers, G. A., Suresch, H. N., Thompson, T. N., Trexler, C. M., Williams, N. C., Williams, S. E.** (2007). Does size matter for dispersal distance?. *Global Ecology and Biogeography*. **16** (4): 415-425.
- Kattan, G. H., Roncancio, N., Banguera, Y., Kessler, M., Londoño, G. A., Marin, O., Munoz, M. C.** (2014). Spatial variation in population density of an endemic and endangered bird, the Cauca Guan (*Penelope perspicax*). *Tropical Conservation Science*. **7** (1): 161-170
- Kattan, G. H., Muñoz, M. C., Kikuchi, D. W.** (2016). Population densities of curassows, guans, and chachalacas (Cracidae): Effects of body size, habitat, season, and hunting. *The Condor*. **118** (1): 24-32.
- Lindenmayer, D.B., Likens, G.E. Haywood, A., Miezi, L.** (2011). Adaptive monitoring in the real world: proof of concept. *Trends in Ecology & Evolution*. **26** (12): 641-646.
- Mamani, A. M.** (2001). Aspectos biológicos y evaluación de la densidad poblacional de la charata *Ortalis canicollis* en Izozog, Prov. Cordillera del Dpto. Santa Cruz, Bolivia. En D.M. Brooks and F. González-García (Ed.). *Cracid ecology and conservation in the new millenium* (pp. 87-100). Houston, USA: Miscellaneous Publications of the Houston Museum of Natural Science.
- Matthews, J.N.S.** (2006). *Introduction to Randomized Controlled Clinical Trials*. New York, USA: Chapman & Hall. p. 302.
- Rabinowitz, D., Cairns, S., Dillon, T.** (1986). Seven forms of rarity and their frequency in the flora of the British isles. En M. E. Soulé (Ed.) *Conservation biology: the science of scarcity and diversity* (pp. 182-204). Sunderland MA, USA: Sinauer Associates.
- Salaman, P., Cuadros, T., Jaramillo, J.G., Weber, H.** (2001). Lista de chequeo de las aves de Colombia. Medellín, Colombia: Sociedad Antioqueña de Ornitología. p. 112.
- Schmitz-O, A.** (1999). Vulnerability of Rufous-Vented Chachalacas (*Ortalis ruficauda*, Cracidae) to man-induced habitat alterations in northern Venezuela. *Ornitología Neotropical*. **10**: 27-34.
- Stephens, P. A., Vieira, M. V., Willis, S. G., & Carbone, C.** (2019). The limits to population density in birds and mammals. *Ecology letters*, **22**(4), 654-663.
- Thiollay, J. M.** (1994). Structure, density and rarity in an Amazonian rainforest bird community. *Journal of Tropical Ecology*. **10**: 449-481.
- Thomas, L., Buckland, S. T., Rexstad, E. A., Laake, J. L., Strindberg, S., Hedley, S. L., Bishop, J.R.B.** (2009). *DISTANCE*. St. Andrews, UK: Research Unit for Wildlife Population Assessment.
- Witmer, G. W.** (2005). Wildlife population monitoring: some practical considerations. *Wildlife Research*. **32** (3): 259-263.

Original article

***In vitro* effect of four fungicides on *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on the Red Globe grape variety**

Efecto *in vitro* de cuatro fungicidas sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis de la uva variedad Red Globe

✉ Silvia Patricia López-Zapata*, ✉ Jairo Castaño-Zapata

Programa de Maestría en Fitopatología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

Abstract

Anthracnose is considered one of the most important diseases of grape crops. In this study, we evaluated the *in vitro* effect on potato dextrose agar (PDA) of four fungicides: benomyl (Benlate® 50 WP), carbendazim (Belico® 500 SC), chlorothalonil (Odeon® 720 SC), and dodine (Syllit® 400 SC) using three concentrations on a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate. This species complex causes anthracnose on the Red Globe grape variety. The concentrations of each fungicide were: benomyl at 0.5, 0.25, and 1 g.L⁻¹; carbendazim at 0.6, 0.3, and 1.2 mL.L⁻¹; chlorothalonil at 2.4, 1.2, and 4.8 mL.L⁻¹, and dodine at 1.6, 0.8, and 3.2 mL.L⁻¹. Evaluated the inhibition of mycelial growth and the sporulation of the fungus. The fungus mycelium exposed to the commercial dose of the fungicides was observed using environmental scanning electron microscopy (ESEM). We used a completely randomized design with 13 treatments and five repetitions. Our results showed a degree of differential efficacy for the four fungicides and their effects were directly proportional to the dose used, benomyl and chlorothalonil being the most efficient in controlling the mycelial growth of the fungus. At the commercial dose, sporulation was inhibited at a higher rate by benomyl showing no statistically significant differences with the other products except chlorothalonil and dodine when the recommended dose was reduced by half. The damage observed by ESEM on the fungus mycelium ratified the effect obtained *in vitro*, i.e., deformed hyphae and irregular growth. The results of this study, complemented by electron microscopy, are promising for the appropriate selection of the best fungicides for controlling anthracnose on grape fruits, subject to the timely and correct diagnosis of the disease.

Keywords: Fungus; Fungicides; Red Globe.

Resumen

La antracnosis es una de las enfermedades más importantes del cultivo de la uva. En este estudio se evaluó el efecto *in vitro* en agar de papa y dextrosa (PDA) de cuatro fungicidas: benomil (Benlate® 50WP), carbendazim (Belico® 500 SC), clorotalonil (Odeon® 720 SC) y dodine (Syllit® 400 SC) usando tres dosis en un aislamiento perteneciente al complejo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis en la uva de la variedad Red Globe. Las concentraciones evaluadas fueron: 0,5, 0,25 y 1 g.L⁻¹ de benomil; 0,6, 0,3 y 1,2 mL.L⁻¹ de carbendazim; 2,4, 1,2 y 4,8 mL.L⁻¹ de clorotalonil, y 1,6, 0,8 y 3,2 mL.L⁻¹ de dodine. Las variables evaluadas fueron la inhibición del crecimiento micelial y la esporulación del hongo. El micelio del hongo expuesto a la dosis comercial de los fungicidas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Se usó un diseño completamente al azar con 13 tratamientos y cinco repeticiones. Los resultados mostraron un grado de eficacia diferencial para los cuatro fungicidas y sus efectos fueron directamente proporcionales a la dosis empleada, siendo el benomil y el clorotalonil los más eficientes para controlar el crecimiento micelial del hongo. Con la dosis comercial, la esporulación fue inhibida en mayor tasa por el benomil sin diferencias estadísticas significativas con los demás productos

Citation: López-Zapata SP, Castaño-Zapata J. *In vitro* effect of four fungicides on *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnosis on the Red Globe grape variety. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172): 747-758, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1139>

Editor: Elizabeth Castañeda

***Corresponding autor:**
Silvia Patricia López-Zapata;
silvia.821517448@ucaldas.edu.co

Received: December 23, 2019

Accepted: April 21, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

excepto con clorotalonil y dodine al reducir la dosis recomendada a la mitad. Los daños observados con ESEM en el micelio del hongo ratificaron el efecto obtenido *in vitro*, es decir, hifas deformadas y crecimiento irregular. Los resultados obtenidos en este estudio, complementados con microscopía electrónica, son promisorios para la selección apropiada de los mejores fungicidas para controlar la antracnosis en frutos de uva, supeditado al diagnóstico oportuno y correcto de la enfermedad.

Palabras clave: Hongo; Fungicidas; Red Globe.

Introduction

Grapes are one of the most economically important crops in the world (Khilare & Chavan, 2010; Lei, *et al.*, 2016). In Colombia, the planted area is 2,500 ha and the production in 2016 was 30,156 t with an average yield of 10.51 t.ha⁻¹. The department of Valle del Cauca, with a harvested area of 1,940 ha, produced that year 24,379 t of grape, which represents 80.84% of the national production (Agronet, 2018).

One of the pathologies of fungal origin affecting the crop is anthracnose, which has been reported in Japan (Shiraishi, *et al.*, 2006), India (Khilare & Chavan, 2010; Shetty, *et al.*, 2014), China (Lei, *et al.*, 2016) and Australia (Greer, *et al.*, 2011). The disease, caused by species of the genus *Colletotrichum*, affects a wide variety of crops and fruit trees including grapes (*Vitis vinifera*) (Lei, *et al.*, 2016), especially in tropical and subtropical areas (Hyde, *et al.*, 2009; Wikee, *et al.*, 2011; Cannon, *et al.*, 2012; Lei, *et al.*, 2016); this genus has been designated as the eighth most important group of pathogenic plant fungi in the world for its economic and scientific importance (Dean, *et al.*, 2012).

In Virginia, United States, the losses caused by the disease between 2010 and 2014 ranged between 15 and 30% significantly reducing the quality of the wine as well (Nita, 2015). In some provinces of China, the losses by insects and diseases, among which anthracnose stands out, reached 50% (Peng, *et al.*, 2013). In Colombia, there is still no data on losses associated with this disease, although in the municipality of La Unión, Valle del Cauca, the disease has been present since 2016 where symptoms were initially detected in a batch of Red Globe table grape variety. From then on, farmers, without knowing its true etiology, have applied different chemical products with no success because the pathology is spread by foci within the same batch.

The disease occurs mainly on ripe fruits (Lei, *et al.*, 2016), although infections are also present in developing fruits (Gil, *et al.*, 2002; Jiang, *et al.*, 2014) as has been observed at La Union vineyards (López-Zapata, *et al.*, 2019). Grapes infected with *Colletotrichum* present lesions characterized by dark circular spots on the epidermis resulting in total damage to the berries that are then covered with masses of salmon-colored spores (Shiraishi, *et al.*, 2006).

The etiology of the disease is complex: although in the United States it was initially identified as *C. gloeosporioides* (Daykin & Milholland, 1984), different species have been found in other wine-growing regions causing very similar symptoms. In China, for instance, *C. viniferum*, *Colletotrichum* sp. (Lei, *et al.*, 2016), *C. fruticola*, and *C. gloeosporioides* (Peng, *et al.*, 2013) have been identified. *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* have been found in Australia and in the United States (Greer, *et al.*, 2011; Nita, 2015). In India, the disease is attributed to *Gloeosporium ampelophagum* (Khilare & Chavan, 2010) and recently in Colombia, an isolate genetically close to *C. aenigma* and *C. siamense*, both belonging to the *C. gloeosporioides* complex (López-Zapata, *et al.*, 2019), was identified as the agent causing anthracnose in grape fruits.

Chemical fungicides occupy the first place in the control of plant diseases (Gaviria, *et al.*, 2013). In grapes, their applications must be frequent to ensure the quality for markets and consumers (Shiraishi, *et al.*, 2006). However, *Colletotrichum* species present different responses to fungicides possibly due to continuous applications. For example, wild *C. gloeosporioides* isolates are sensitive to carbamate methyl-benzimidazole fungicides while *C. acutatum* is tolerant to this group (Han, *et al.*, 2018). Likewise, different studies indicate that carbendazim, of the benzimidazoles group, has lost effectiveness on *G. ampelophagum*

in grapes (Khilare & Chavan, 2010; Sawant, *et al.*, 2014) and *C. gloeosporioides* in strawberries and yam (Han, *et al.*, 2018). Similarly, *C. gloeosporioides* isolated from mango and strawberry in Taiwan showed resistance to benzimidazoles.

This behavior has led to suggest that the difference between resistant and moderately resistant isolates is due to the application of the product at doses higher than 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Chung, *et al.*, 2010), especially benzimidazoles which have been historically used for the management of anthracnose in grape, strawberry, and mango crops (Xu, *et al.*, 2014) resulting in resistant pathogens genotypes that can remain dominant in a field even after suspending the application of this group of fungicides (Hwang, *et al.*, 2010). Given that the true etiology of this vine pathology is not well known in Colombia, knowledge of the *in vitro* effect of fungicides on *C. gloeosporioides* is of vital importance to establish efficient and lasting management measures to avoid production decreases and resistance problems that are common in the wine-growing regions of the world.

Materials and methods

Fungal isolates

We collected 200 fruits showing the symptoms of the initial stages of the disease, such as the reddish-brown discoloration, and those of the most advanced stages, i.e., sunken and necrotic Red Globe berries, following a rectangle sampling pattern in an eight-year-old vineyard of approximately three ha in physiological stage 79 (Lorenz, *et al.*, 1994) located in the municipality of La Unión, Valle del Cauca. The berries were stored in transparent plastic bags and taken to the plant pathology laboratory of the *Facultad de Ciencias Agrícolas* at *Universidad de Caldas* for their analysis.

Tissue sections of approximately 5 mm² including healthy and diseased tissue were cut and subsequently disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 1 min; consecutively, they were transferred to 70% alcohol for 50 s, washed three times with sterile distilled water, and then placed on sterile paper towels to remove excess moisture. The disinfected tissue was placed into Petri dishes containing Merck potato-dextrose-agar (PDA) (39 g.L⁻¹) culture medium and they were incubated at 28°C for 3 to 7 days with periodic observations. After incubation, agar sections taken from the active growth site of the colonies were aseptically transferred to new Petri dishes with PDA.

We obtained an isolate identified as *Colletotrichum* sp. for its macroscopic and microscopic morphology. The pathogenicity of grapes in physiological stage 79 (Lorenz, *et al.*, 1994) was subsequently tested and Koch's postulates were verified. Later, we determined that it belonged to the *C. gloeosporioides* species complex using molecular tools (López-Zapata, *et al.*, 2019) and with it, we carried out the sensitivity tests of the four fungicides.

In vitro sensitivity bioassay

We determined the efficiency of two systemic fungicides, benomyl (Benlate®50 WP) and carbendazim (Bélico® 500 SC), and two protectants, chlorothalonil (Odeon® 720 SC) and dodine (Syllit®400 SC) with the following three concentrations of each product corresponding to the commercial dose, half the commercial dose, and twice the commercial dose expressed in grams per liter or milliliters per liter: benomyl, 0.5, 0.25, and 1 g.L⁻¹; carbendazim, 0.6, 0.3, and 1.2 mL.L⁻¹; chlorothalonil, 2.4, 1.2, and 4.8 mL.L⁻¹, and dodine, 1.6, 0.8, and 3.2 mL.L⁻¹. Product effectiveness was measured by the inhibition of mycelial growth and the sporulation.

Inhibition of mycelial growth

We used dilutions on Petri dishes containing PDA and added each of the concentrations when the medium reached a temperature of 45°C. Once solidified, a 5 mm portion of the active growth site of the fungus in a five-day culture was placed in the center of the Petri dish with mycelial growth making direct contact with the medium supplemented with the respective fungicide (Han, *et al.*, 2018). As a control we used a seeding under similar

conditions on PDA but no addition of fungicide. The dishes were incubated at 28°C until the control reached the maximum growth and the percentage of inhibition was calculated using the formula:

$$I(\%) = \frac{c - t}{t} \times 100$$

where I is the percentage of reduction in pathogen growth, *c*, the growth of the colony (cm) in the control, and *t*, the growth of the colony (cm) in the treatment.

Inhibition of the sporulation

Once the control reached the maximum growth, circular portions of 1 cm in diameter were taken from the active growth site of each treatment and the corresponding repetitions and then placed on Petri dishes containing 5 mL of sterile distilled water; with the help of a handle, the mycelium was removed gently and the spores were counted by product, treatment, and repetition with a hemocytometer. The same process was carried out with the control.

Effect of fungicides on the mycelial morphology

We observed portions of mycelium from the cultures corresponding to the commercial doses of each of the four fungicides using an environmental scanning electron microscope (ESEM) and we processed the images obtained with the ImageJ program (Ferreira & Rasband, 2012).

Statistical analysis

We used a completely randomized statistical design with thirteen treatments and five repetitions. Experimental units corresponded to the Petri dishes. We created an Excel database, entered the information from the laboratory, and analyzed it using the Statistical Analysis System (SAS) v.9.0. We used an analysis of variance to evaluate the variables and averages were compared with a 5% probability Tukey test. We used the following mathematical model:

$$y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

where y_{ij} equals the value of the response variable of the experimental unit associated with the *i*-th treatment, *j*-th repetition; μ corresponds to the general average of the response variable in the experiment; t_i is the effect of the *i*-th treatment; ε_{ij} is the error of the experimental unit associated with the *i*-th treatment, *j*-th repetition; *i* equals 1, 2, 3, 4... 13, and *j* equals 1, 2, 3, 4, 5.

Results

Effects on the development of the colony, mycelial growth, and sporulation of the fungus

Our results indicated that all the treatments showed highly significant statistical differences ($\text{Pr} > F = < 0.0001$) between doses as to the diameter of the colony, the percentage of inhibition, and the number of spores, as well as to the interaction active ingredient per dose at a 95% reliability level (Table 1).

All the fungicides inhibited *C. gloeosporioides* mycelial growth compared to the control (Table 1). However, benomyl was the best fungicide, with significant statistical differences compared to the other products and doses, totally inhibiting the fungal growth and sporulation at twice the commercial dose (1 g.L^{-1}) (Figure 1). Although carbendazim at double the commercial dose (1.2 g.L^{-1}) showed a lower effect on mycelial growth, it completely inhibited the sporulation of the fungus as did benomyl. Both benzimidazole-group products had similar effects on sporulation, which demonstrates the high effectiveness of the systemic fungicides on this fungus (Table 1).

Among the protective fungicides, chlorothalonil at double the commercial dose was the best followed by dodine. Based on the recommended commercial dose, this product had the least effect. In general, as the dose of the four fungicides was reduced, the effectiveness decreased in the three variables evaluated (Table 1).

Table 1. *In vitro* effectiveness of four fungicides on the diameter of the colony, mycelial growth, and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*

Fungicides	Dose (g pc.L ⁻¹ or mL pc.L ⁻¹)	Diameter of the colony (cm)	Inhibition of mycelial growth (%)	Number of spores.cm ² ⁻¹
Control	-	9.00±0.00 a*	0.00±0.00 k	5,302,500±632,264.45 a
Benomyl (Benlate® 50WP)	0.5	1.65±0.44 i	79.75±9.31 b	25,000±41,833 d
	0.25	2.64±0.24 h	70.62±2.70 c	250,000±41,834 cd
	1	0.00±0.00 j	100 a	0.00±0.00 d
Carbendazim (Belico® 500 SC)	0.6	6.30±0.7 d	29.96±0.78 h	30,000±44,721.36 d
	0.3	6.80±0.27 c	24.40±3.29 i	130,000±75,828.75 d
	1.2	5.16±0.24 e	42.60±2.70 g	0.00±0.00 d
Chlorothalonil (Odeon® 720 SC)	2.4	2.85±0.17 gh	57.50±1.73 e	87,500±47,871.35 d
	1.2	4.38±0.41f	51.40±4.98 f	470,000±225,277.61 c
	4.8	3.14±0.09 g	64.60±1.34 d	50,000±0.00 d
Dodine (Syllit® 400 SC)	1.6	7.52±0.19 b	16.48±2.32 j	190,000±151,657.51 cd
	0.8	7.48±0.28 b	16.90±3.05 j	1,187,500±492,231.31 b
	3.2	6.46±0.44 cd	28.6±4.83 hi	110,000±65,192.02 d
Significance of the dose		<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
Significance of product by dose		<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
R²		0.9910	0.9839	0.9775
Sn¹		0.2721	3.9714	21,9450.8
CV		5.6788	8.6562	42.0456

Numbers followed by the same letters are not significant at 5% probability.

** Highly significant

Effect on the development and morphology of hyphae

The effect of the four fungicides at commercial doses on the development and morphology of the hyphae and sporulation of *C. gloeosporioides* was corroborated through environmental scanning electron microscopy (ESEM) showing a marked inhibition of the development and pronounced deformation of the hyphae, septum formation, and little sporulation in comparison with the control (**Figure 2**).

With benomyl and carbendazim, distortion, deformation, excessive branching, and the collapse of the hyphae were evident, as well as their granular and swollen appearance; no spores were observed in the analyzed portions. The hyphae in formation were thinner presenting rough surfaces (**Figure 2 A, B**).

With chlorothalonil, the hyphae became weak, translucent, and empty with irregular morphology that included thickened sections with reduced sizes. Additionally, clusters of conidia were observed (**Figure 2C**). With dodine, hyphae were disrupted and appeared coiled, shrunken, and curled forming blisters while spores were apparently dehydrated and deformed (**Figure 2D**).

In contrast to the effect of the fungicides, the control grown on PDA produced long, dense, uniform, tubular, and smooth surface hyphae, as well as abundant sporulation (**Figure 2E**).

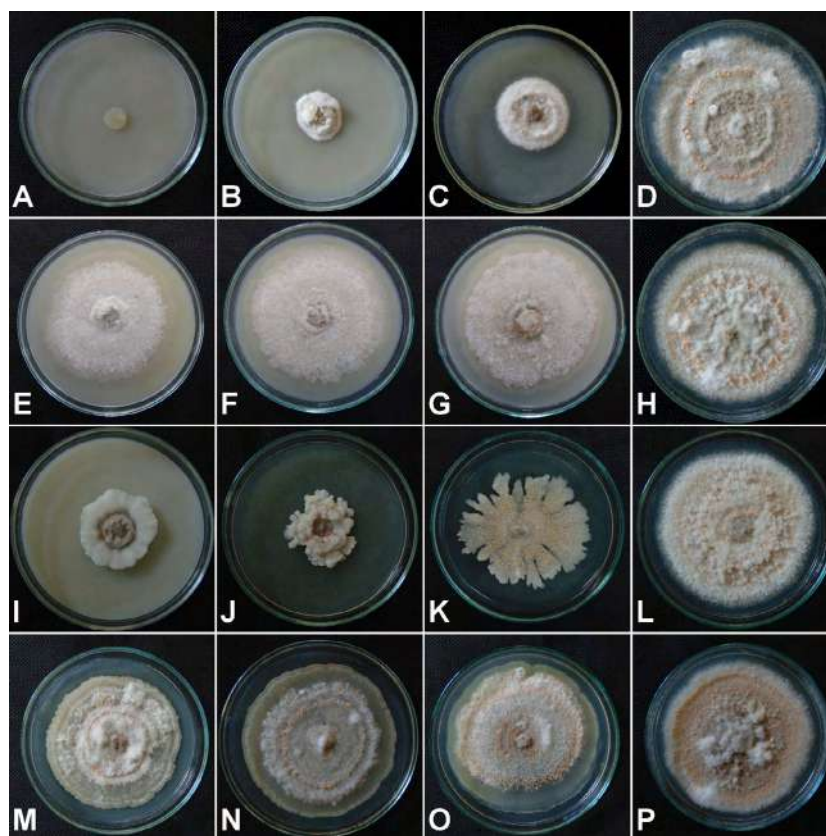


Figure 1. Effect *in vitro* of four fungicides on the diameter of *Colletotrichum gloeosporioides* colony from grape (*Vitis vinifera*). **A-D.** Benomyl in doses of 1, 0.50, and 0.25 g.L⁻¹ and control, respectively. **E-H.** Carbendazim in doses of 1.2, 0.6, and 0.3 mL.L⁻¹ and control, respectively. **I-L.** Chlorothalonil in doses of 4.8, 2.4, and 1.2 mL.L⁻¹ and control, respectively. **M-P.** Dodine in doses of 3.2, 1.6, and 0.8 mL.L⁻¹ and control, respectively.

Discussion

With the increased doses of the four fungicides under study, the mycelial growth of the fungus decreased, although fungi toxicity varied notably depending on the fungicides and their concentrations; the systemic fungicides were more effective than the protectants (**Table 1**) but, as a general trend, the growth of the pathogen decreased with the products compared to the control. However, after 15 days of incubation of *C. gloeosporioides* at 28 ± 2°C, benomyl was the best product inhibiting completely the growth of the fungus.

Our results confirmed other findings regarding the antifungal activity of benomyl on *Colletotrichum* species: *C. capsici* from peppers whose growth was 100% inhibited (**Subhani, 2015**); *C. gloeosporioides* from mango with an inhibition percentage ranging between 75% and 90% (**Kumar, et al., 2007**), and *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* from citrus whose growth was inhibited at a concentration of 1.0 μ a.i. L⁻¹ (**Peres, et al., 2004**).

The percentage of inhibition of *C. gloeosporioides* mycelial growth with benomyl and carbendazim differed statistically, although they belong to the same chemical group, which agrees with **Gaviria, et al. (2013)**, who found inhibition percentages for *C. acutatum* ranging from 8.25% to 46.50% using the commercial doses.

Although strictly speaking no resistance to carbendazim was found in our study, given that sporulation was similar to that obtained with benomyl, it is necessary to consider that its loss of effectiveness has been reported in different crops and species of the pathogen:

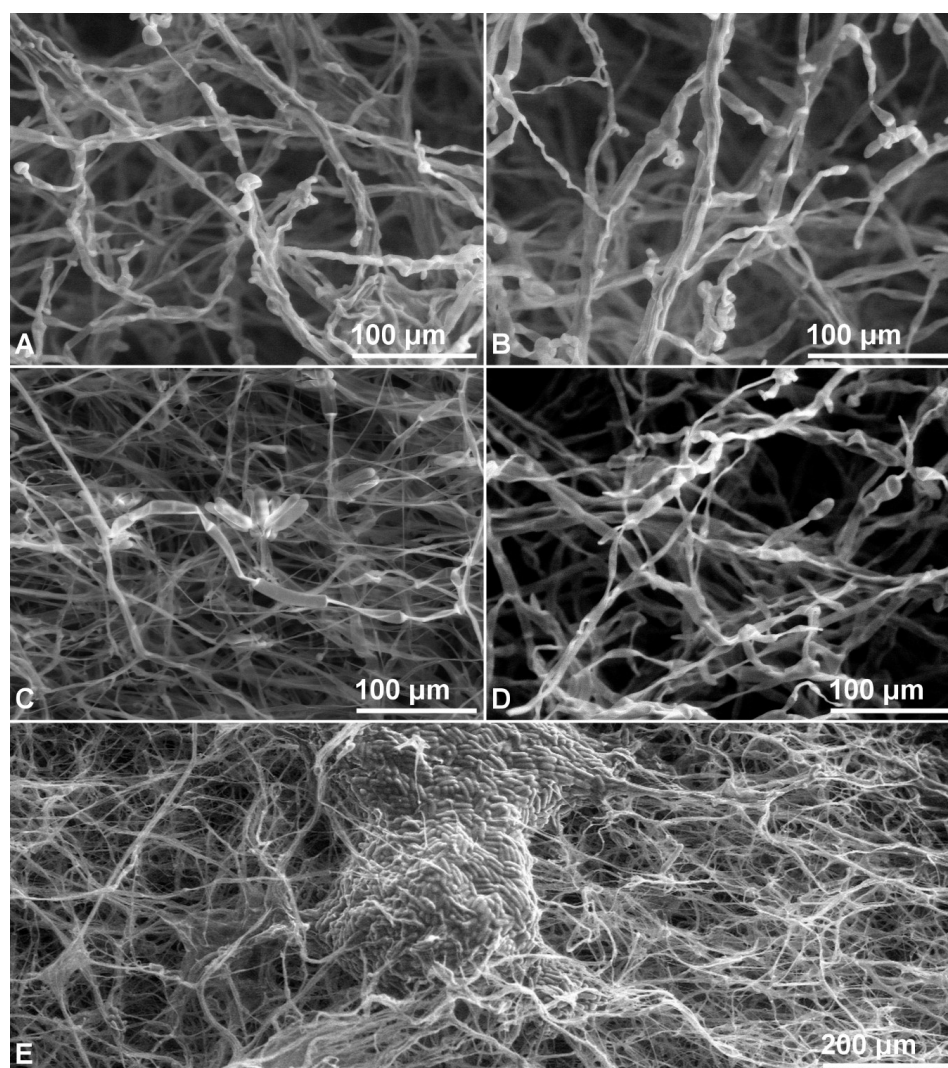


Figure 2. ESEM image of *Colletotrichum gloeosporioides* using the commercial doses of the evaluated products. **A.** Treated with 0.5 g.L^{-1} of benomyl. **B.** Treated with 0.6 g.L^{-1} of carbendazim. **C.** Treated with 2.4 mL.L^{-1} of chlorothalonil. **D.** Treated with 1.6 mL.L^{-1} of dodine. **E.** Absolute control, not treated.

C. gloeosporioides isolated from strawberry (*Fragaria* sp.) and grape (Han, *et al.*, 2018; Lin, *et al.*, 2016), *C. siamense* and *C. fructicola* from strawberry and yam (*Dioscorea* sp.), respectively, whose level of resistance to the fungicide was different depending on the region of origin of the isolate (Han, *et al.*, 2018).

In the particular case of anthracnose, the continuous use of carbendazim for managing the pathogen has reduced its sensitivity (Deokate, *et al.*, 2002) and it has been documented that highly resistant isolates have not been controlled even at concentrations of $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Narkar, *et al.*, 2012). In the case of grapes, more than 1% of the active ingredient was needed to obtain effective control.

As we mentioned already, the effect of carbendazim was comparable to that of benomyl on the sporulation of *C. gloeosporioides*, which has been previously demonstrated on this pathogen in grapes, with very similar effectiveness to that of the quinone inhibitors and demethylation (Shetty, *et al.*, 2014), as well as on *C. capsicum* in chili pepper (*Capsicum annuum*) (Kumar, *et al.*, 2016).

The effect of carbendazim on *Colletotrichum* species is differential: it is more effective for the control of species of the *C. gloeosporioides* complex than for *C. acutatum* (Cao, et al., 2017). This difference in the efficacy of fungicides according to the fungus species has also been documented for benomyl.

According to Peres, et al. (2005), doses of 0.1 to 1.0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibit the growth of some species of *Colletotrichum* while in *C. acutatum*, the inhibition ranges between 20% and 50%, which is consistent with the results reported by Greer, et al. (2011) who observed that benomyl inhibited mycelial growth by 97% and 53% in *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* isolates, respectively. Likewise, it inhibited the mycelial growth of *C. gloeosporioides* in strawberry (*Rubus glaucus*) by 74% to 83% and between 7% and 16% in *C. acutatum* while with carbendazim it was 85% and 33%, respectively (Gaviria, et al., 2013). However, Santamaría, et al. (2011) in their study on the *in vitro* effect of benomyl on *C. gloeosporioides* and *C. dematium* isolated from papaya did not observe any effect on the development of these fungal species even at concentrations of 4 g pc.L⁻¹ of water.

These studies show once again the versatility of pathogens to overcome the active ingredients and their mechanisms of action, which in the case of benzimidazoles has been widely known and reported on species such as *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. cereale*, and *C. siamense* (Hu, et al., 2015; Peres, et al., 2004; Wong, et al., 2008).

In this sense, the Fungicide Resistance Action Committee - FRAC (2020) stated that the benzimidazole group fungicides (including carbendazim) are highly conducive to the development of resistance in many fungal species, which has already been widely demonstrated for benomyl. Although it is not yet the case, this may alert grape growers about the implications of ignoring the loss of effectiveness of active ingredients, as *C. gloeosporioides* isolates resistant to benomyl have been recovered after more than 10 years of ceasing its application and even in places where its use was not known (Peres, et al., 2004).

Resistance to these products in grape crops has resulted from the excessive use of chemicals to control anthracnose in recent years because, until the 1980s, studies conducted on muscadine grapes showed the effectiveness of benomyl at a dose of 100 μg a.i. mL⁻¹ (Daykin & Milholland, 1984). Likewise, the loss of efficacy of benzimidazoles has been explained by the continuous use of this group of fungicides for the control of *Botrytis cinerea*, causing pathogenic strains of *C. acutatum* to be less sensitive to benomyl and damage the bunch (Greer, et al., 2011), also reducing the effect of the fungicide when it is applied near the time of grape sprouting (Shiraishi, et al., 2006).

After benomyl and carbendazim, chlorothalonil (chloronitriles group) was the active ingredient inhibiting the mycelial growth of *C. gloeosporioides* and with similar effects on sporulation using the commercial dose. This broad-spectrum protectant fungicide is widely used in agriculture and it has shown significant effects against anthracnose reducing vine leaf damage caused by *Elsinoe ampeliana* (Magarey, et al., 1993), as well as the incidence of anthracnose in pepper (*Capsicum annuum*) (Kumar, et al., 2016) and of *C. acutatum* sporulation in cherry (*Prunus cerasus*) (Tóth, et al., 2012).

The promising results of chlorothalonil allow for suggesting it as an alternative for the management of the disease and as prevention against the resistance induced by the continuous, excessive, and undue use of benzimidazoles. Considering the time of appearance of the first symptoms of the disease, preventive applications would be advisable. Besides, the product can also be effective against other vine pathogens such as *Phomopsis viticola* inhibiting the viability of the spores and its mycelial growth (Król, 2005). However, although chlorothalonil showed more than a 50 % inhibition effect in this study, it should be used carefully as a mild activity has been documented on *C. gloeosporioides* and *C. dematium* (Santamaría, et al., 2011) and resistance in other *Colletotrichum* species (Andriani, et al., 2017).

Dodine is a fungicide used to control diseases in apples, pears, nuts, peaches, cherries, and strawberries, as well as a biocide and preservative (Çördük, et al., 2016). In Colombia, it is registered for the control of flowers, bananas, and coffee pathogens; in other countries,

its bactericidal activity has been studied mainly for the disruption of the cytoplasmic membrane and cell death, and on fungi for the loss of amino acids and materials absorbing UV rays (Cabral, 1991).

The results obtained using dodine against *C. gloeosporioides* sporulation had no statistical difference compared to chlorothalonil at twice the commercial dose, which corroborates its point and mechanism of action. It is also worth noting that, although the diameter of the colony was not noticeably affected in comparison with the other products, we observed a decrease in the volume of the mycelium. However, since it is not recommended for this fungal species in the country, laboratory tests to corroborate the average lethal dose and subsequent field evaluations to analyze possible side effects are necessary, as studies have shown that it can cause oxidative stress by inhibiting protein synthesis and degradation, although it can also stimulate plant defense systems (Çördük, *et al.*, 2016).

The applications of chemical synthesis products are essential for disease control and to ensure the quality that markets and consumers expect (Shiraishi, *et al.*, 2006), which is not alien to the vine crops at La Union, Valle del Cauca, where the use of fungicides is a frequent practice resorting to benzimidazoles among the products used. This would partially explain the behavior of benomyl and carbendazim in this study and constitutes an alert on the implications of an eventual resistance of *C. gloeosporioides* to this type of product.

Given the possible resistance to benzimidazoles, the quinone outside (QoI) and demethylation inhibitors could be an alternative for the management of *C. gloeosporioides* resistant isolates in grapes (Shetty, *et al.*, 2014). However, this hypothesis should be validated on isolates from a specific region as in some areas of the United States, for example, several isolates of this fungus have already shown resistance to QoI fungicides (Nita, 2015).

The mixture of benzimidazoles with dietofencarb is usually an alternative to handle resistant *C. gloeosporioides* isolates. However, this is not recommended in grapes without taking strict measures to avoid the development of resistance (Lin, *et al.*, 2016), even more so when it has been demonstrated that there is no specificity between pathogen and host as *C. acutatum* isolates from different crops can infect grape crops further evidencing possible cross-infection (Whitelaw-Weckert, *et al.*, 2007), which very possibly may be happening in the study area.

Additionally, it is important to consider other aspects recently elucidated regarding the role of temperature in the effectiveness of fungicides on resistant isolates through its inhibitory effect on them, which underlines the need to have information on the sensitivity of resistant isolates since this can have an impact on the strategies for applying fungicides (Ma & Michailides, 2005).

Conclusions

Benomyl was the most efficient fungicide in *in vitro* conditions for the control of *C. gloeosporioides* causing anthracnose in grapefruits inhibiting mycelial growth and the production of spores at twice the commercial dose.

Although the effectiveness of dodine on the mycelial growth and sporulation of the fungus was the lowest in comparison with the other fungicides, it deserves more detailed laboratory and field studies on its effectiveness as an alternative against *C. gloeosporioides*.

Considering that fruit infections occur in the early physiological stages, apparently from the flowering phase itself, it is important to apply a preventive fungicide at this time followed by applications to protect the berries during their development.

Using various strategies such as the collection and destruction of diseased fruits and the combination of systemic products with protectants would help to mitigate the effects of the pathogen.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to *Universidad de Caldas*, the Plant Pathology Laboratory, and *Casa Grajales* for supplying the samples.

Authors contribution

SPLZ: Collection of berries, analysis of laboratory samples and data; JCZ: consultancy in the laboratory phase and experimental design. Both authors participated in the writing and editing of the document.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Agronet.** (2018). Estadísticas del cultivo de la uva en Colombia. Accessed on: August 19, 2018. Available at: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Andriani, D., Wiyono, S., Widodo, W.** (2017). Sensitivity of *Colletotrichum* spp. on chili to benomyl, chlorotalonil, mancozeb, and propineb. *J. Fitopatol Indones.* **13** (4): 119-126. Doi: 10.14692/jfi.13.4.119
- Cabral, J.** (2017). Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by dodine (dodecyl guanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. *Antimicrob Agents Chemother.* **35** (2): 341-344. Doi: 0066-4804/91/020341-04\$02.00/0
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S.** (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Stud. Mycol.* **73** (1): 181-213. Doi: 10.3114/sim0014
- Cao, X., Xu, X., Che, H., West, J., Luo, D.** (2017). Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species complexes from rubber tree in Hainan, China. *Plant Dis.* **101** (10): 1774-1780 Doi: 10.1094/PDIS-03-17-0352-RE
- Çördük, N., Akinci, N., Kaya, N., Yücel, G., Aki, C.** (2016). Effects of dodine on total protein content and peroxidase activity in *Vicia faba* L. *SAÜ Fen Bil Der.* **20** (3): 627-633. Doi: 10.16984/saufenbilder.22241
- Chung, W.H., Chung, W.C., Peng, M.T., Yang, H.R., Huang, J.W.** (2010). Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *N Biotechnol.* **27** (1): 17-24. Doi: 10.1016/j.nbt.2009.10.004
- Daykin, M.E. & Milholland, R.D.** (1984). Ripe rot of muscadine grape caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and its control. *Phytopathology.* **74**: 710-714. Doi: 10.1094/Phyto-74-710
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Foster, G.D.** (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13** (4): 414-430. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Deokate, A.S., Khilare, V.C., Gangawane, L.V.** (2012). Resistance to carbendazim in *Gloeosporium ampelophagum* (Pass) Sacc. causing anthracnose of grapevine in Maharashtra. *Indian J. Plant Prot.* **30** (1): 69-70.
- Ferreira, T. & Rasband, W.** (2018). ImageJ User Guide/IJ 1.46r. 2012. Bioimage Informatics.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC).** (2020). FRAC code list ©*. Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. Accessed on august 10, 2020. Available at: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2
- Gaviria, H.V., Patiño, H.L., Saldarriaga, C.A.** (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de Castilla. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecuaria.* **14** (1): 67-75.
- Gil, L.F., Varzea, V.M., Do Ceu Silva M.** (2002). La enfermedad de las cerezas del café –CBD causada por *Colletotrichum kahawae*. *Avance técnico Cenicafé* 298.
- Greer, L., Harper, J., Savocchia, S., Samuelian, S., Steel, C.** (2002). Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of *Colletotrichum*: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity. *Aust. J. Grape Wine Res.* **17**: 123-128. Doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00143.x
- Han, Y.C., Zeng, X.G., Xiang, F.Y., Zhang, Q.H., Guo, C., Chen, F.Y., Gu, Y.C.** (2018). Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *J. Integr. Agric.* **17** (6): 1391-1400. Doi: 10.1016/S2095-3119(17)61854-9
- Hu, M., Grabke, A., Dowling, M., Holstein, H., Schanabel, G.** (2002). Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate methyl and azoxystrobin. *Plant Dis.* **99**: 806-814.

- Hwang, S., Kim, H. R., Kim, J., Park, J. J. H., Lee, S. B., Cheong, S. R., Kim, T. H.** (2010). Sensitivity of *Colletotrichum* spp. isolated from grapes in Korea to carbendazim and the mixture of carbendazim plus diethofencarb. *P. Pathol. J.* **26** (1): 49-56. Doi: 10.5423/PPJ.2010.26.1.049
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U.** (2009). *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Divers.* **39**: 147-182.
- Jiang, J., Zhai, H., Li, H., Wang, Z., Chen, Y., Hong, N., Wang, G., Chofong, G.N., Xu, W.** (2014). Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Prot.* **58**: 41-48. Doi: 10.1016/j.cropro.2014.01.003
- Khilare, V.C. & Chavan, S.S.** (2010). Effect of passage on the development of carbendazim resistance in *Gloeosporium ampelophagum* causing anthracnose of grapes. *Biosci. Biotech. Res. Asia.* **8** (2): 501-504. Doi: 10.13005/bbra/892
- Krol, E.** (2005). Influence of some chemicals on the viability of *Phomopsis viticola* Sacc. spores. *J Plant Prot. Res.* **45** (3):194-203.
- Kumar, A.S., Reddy, N.E., Reddy, K.H., Devi, M.C.** (2007). Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in agriculture export zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathol. Bulletin.* **16**: 157-160.
- Kumar, N., Singh, R., Kumar, A., Yadav, R.S.** (2016). Evaluation of bio-efficacy of some novel fungicides against *Colletotrichum capsici* (Sydow) disease of chilli (*Capsicum annum* L.). *Plant Archives.* **16** (2): 845-848.
- Lei, Y., Tang, X.B., Jayawardena, R.S., Yan, J.Y., Wang, X.D., Liu, M.** (2016). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in southern China. *Mycosphere.* **7** (8): 1177-1191. Doi: 10.5943/mycosphere/si/2c/8
- Lin, T., Xu, X.F., Dai, D.J., Shi, H.J., Wang, H.D., Zhang, C.Q.** (2016). Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex populations from strawberry and grape hosts. *Australas. Plant Pathol.* **45** (3): 241-249. Doi: 10.1007/s13313-016-0413-8
- López-Zapata, S.P., Castaño-Zapata, J., Arango-Isaza, R., Vásquez-Barajas, D.A.** (2019). Caracterización del agente causante de la deformación de los frutos de la uva (*Vitis vinifera* L.) var. Red Globe, en La Unión, Valle del Cauca, Colombia. *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* **43** (167): 241-249. Doi: 10.18257/raccefyn.844
- Lorenz, D.H., Eichorn, K.W., Bleiholder, H., Klose, R., Meier, U., Weber, E.** (1994). Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala, *Vitic. Enol. Sci.* **49**: 66-70.
- Ma, Z. & Michailides, T.** (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection.* **24** (10): 853-863. Doi: 10.1016/j.cropro.2005.01.01
- Magarey R.D, Emmett RW, Magarey PA, Franz PR.** (1993). Evaluation of control of grapevine anthracnose caused by *Eisinoe ampelina* by pre-infection fungicides. *Australas. Plant Pathol.* **22** (2): 48-52. Doi: 10.1071/APP9930048
- Narkar, S.P., Shetty, D.S., Sawant, I.S., Sawant, S.D.** (2012). Paradigm shift in the resistance of grape isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim and their bio-control by *Trichoderma harzianum*. *Indian Phytopathol.* **65**: 373-377.
- Nita, M.** (2015). Species identification and examining QoI and Captan resistance among *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates found in VA vineyards. 1-10. SRSFC Project Progress Report.
- Peres, N., Souza, N., Peever, T., Timmer, L.** (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* **88** (2): 125-130. Doi: 10.1094/PDIS.2004.88.2.125
- Peres, N., Timmer, L., Adaskaveg, J., Correl, J.** (2005.). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* **89** (8):784-796. Doi: 10.1094/PD-89-0784
- Peng, L.J., Sun, T., Yang, Y., Cai, L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H., Li, Z.Y.** (2013). *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience.* **54** (1): 29-41. Doi: 10.1016/j.myc.2012.07.006
- Santamaría, F., Díaz, R., Gutiérrez, O., Santamaría, J., Larqué, A.** (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya Maradol. *Rev. Mex. de Cienc. Agric.* **2** (5): 631-643.

- Sawant, I.S., Narkar, S.P., Shetty, D.S., Upadhyay, A., Sawant, S.D.** (2012). Emergence of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato as the dominant pathogen of anthracnose disease of grapes in India as evidenced by cultural, morphological and molecular data. *Australas. Plant Pathol.* **41** (5): 493-504. Doi: 10.1007/s13313-012-0143-5
- Shetty, D., Narkar, S., Sawant, I., Sawant, S.** (2014). Efficacy of quinone outside inhibitors (QoI) and demethylation inhibitors (DMI) fungicides against grape anthracnose. *Indian Phytopathol.* **67** (2): 174-178.
- Shiraishi, M., Yamada, M., Mitani, N., Ueno, T., Nakaune, R., Nakano, M.** (2006). Rapid screening assay for ripe rot resistance in grape cultivars. *J. Japan Soc. For Hortic. Sci.* **75** (3): 264-266. Doi: 10.2503/jjshs.75.264
- Subhani, M.** (2015). Isolation and Efficacy of Fungicides and Homeo-Fungicides against Anthracnose of Chilies Caused by *Colletotrichum capsici*. *Pak. J. Nutr.* **14** (6): 325-329. Doi: 10.3923/pjn.2015.325.329
- Tóth, A., Petrocczy, M., Hedegús, M., Nagy, G., Lovász, C., Ágoston, J., Palkovics, L.** (2012). Development of plant protection technology against sour cherry anthracnose. *J. Agric Sci.* **50**: 54-59.
- Whitelaw-Weckert, M.A., Curtin, S.J., Huang, R., Steel, C.C., Blanchard, C.L., Roffey, P.E.** (2007). Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathol.* **56** (3): 448-463. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01569.x
- Wong, F.P., De La Cerda, K.A., Hernández, R., Midland, S.** (2008). Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant Dis.* **92**: 239-24.
- Xu, X.F., Lin, T., Yuan, S.K., Dai, D. J., Shi, H. J., Zhang, C. Q., Wang, H. D.** (2014). Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. *Australasian Plant Pathol.* **43**: 605-613. Doi: 10.1007/s13313-014-0321-8

Original article

Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellite loci for a sea urchin (*Echinometra lucunter*: Echinometridae)

Aislamiento y caracterización de 17 microsatélites polimórficos en un erizo de mar (*Echinometra lucunter*: Echinometridae)

✉ Milena Benavides-Serrato^{1,2*}, ✉ Yully Fernanda Contreras-Rueda¹,
✉ Lina M. Barrios-Gardelis³, ✉ Graeme Fox³, ✉ Thomas D. Hughes³,
✉ Néstor Hernando Campos-Campos¹, ✉ Richard Preziosi³

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe - Instituto de Estudios en Ciencias del Mar—Cecimar, El Rodadero, Santa Marta, Colombia

² CEMarin – Corporation Center of Excellence in Marine Sciences, Bogotá, Colombia

³ Ecology and Environment Research Centre, Department of Natural Sciences, Manchester Metropolitan University, Manchester, United Kingdom

Abstract

As a first step to establish the genetic structure of the sea urchin *Echinometra lucunter lucunter* throughout the Caribbean Sea, 26 microsatellite loci were isolated using Illumina paired-end sequencing, Next Generation Sequencing (NGS). We successfully optimized 17 loci for genotyping and the variation tested for 23 individuals from the Caribbean Sea and Tropical Eastern Atlantic Ocean. The allele number per locus (Na) ranged from four to 24, the observed heterozygosity (Ho) from 0.682 to 1, and the expected heterozygosity (He) from 0.609 to 0.9304. We detected no linkage disequilibrium between pairs of loci. These microsatellites will be used for the first time to detect the influence of marine barriers to genetic flow in the sea urchin *E. lucunter lucunter* throughout the Caribbean Sea. These new validated markers will be essential for current conservation and connectivity studies across the Caribbean Sea and the Atlantic Ocean.

Keywords: Marine connectivity; Echinodermata; Caribbean Sea; Microsatellites; Nuclear markers; *Echinometra lucunter*.

Resumen

Como primer paso para establecer la estructura genética del erizo de mar *Echinometra lucunter lucunter* a lo largo del Caribe, se aislaron 26 microsatélites usando secuenciación de extremo pareado (*Next Generation Sequencing*, NGS) Illumina. Se optimizaron exitosamente 17 marcadores y se probó su variación alélica en 23 individuos recolectados a lo largo del mar Caribe y en Cabo Verde, Atlántico oriental tropical. El número de alelos por locus (Na) fluctuó entre cuatro y 24, la heterocigosidad observada (Ho) entre 0,682 y 1 y la heterocigosidad esperada (He), entre 0,609 y 0,9304. No hubo desequilibrio de ligamento entre los pares de locus detectados. Los microsatélites aislados e identificados se usarán por primera vez para detectar la influencia de las barreras marinas en el flujo génico del erizo *E. lucunter lucunter* a lo largo del mar Caribe. Estos nuevos marcadores serán esenciales para la conservación y los estudios de conectividad a través del mar Caribe y el océano Atlántico, área donde se distribuye la especie.

Palabras clave: Conectividad marina; Echinodermata; Mar Caribe; Microsatélites; Marcadores nucleares; *Echinometra lucunter*.

Citation: Benavides-Serrato M, Contreras-Rueda YF, Barrios-Gardelis LM, *et al.* Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellite loci for a sea urchin (*Echinometra lucunter*: Echinometridae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):759-767, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefn.1113>

Editor: Jaime Cantera

***Corresponding autor:**
Milena Benavides-Serrato;
mbevaidess@unal.edu.co

Received: December 7, 2019

Accepted: March 31, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Introduction

Sea urchins play an ecologically important role in marine coastal ecosystems because of their high abundance and herbivorous feeding preference. *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) is often the dominant herbivore of benthic algae in shallow intertidal areas making it an excellent model to identify connectivity patterns for benthic organisms of the Atlantic Ocean.

E. lucunter is the most widely distributed species of the genus *Echinometra*. It has two subspecies, one in the Eastern Atlantic (*Echinometra lucunter polypora* Pawson, 1978) and the other in the Greater Caribbean (*E. lucunter lucunter* Linnaeus, 1758) which are separated from each other by 200000-250000 million years (McCartney, et al., 2000). The subspecies *E. lucunter polypora* was proposed by Pawson (1978) based on morphological differences found in specimens that live in the Central Atlantic islands of Ascension and St. Helena. Molecular analyses based on the CO1 gene (McCartney, et al., 2000) show that the closest approach is found between populations present in the African Atlantic, the Central Atlantic Islands (Ascension and St. Helena), and Brazil, suggesting that these populations belong to the subspecies *E. lucunter polypora*. The subspecies *E. lucunter lucunter* is present only in the Greater Caribbean.

Researchers have designed and used several types of molecular markers in the past to study genetic diversity within a species and analyse population distribution. Marker choice depends on the study, the particular species, and the questions to be answered (Sunnucks, 2000), therefore, it is necessary to use the correct molecular marker in line with the goals of the research and the available budget.

Microsatellites, or simple sequence repeats of loci (SSR), are tandem repeats of up to six nucleotides in the nuclear genome. The number of repeat units commonly ranges from around 5 to 40, with the number of repeats (and therefore sequence length) corresponding to different alleles (Selkoe & Tonnen, 2006).

As a first step to establish the genetic structure and the influence of the marine barriers to the sea urchin *Echinometra lucunter lucunter* throughout the Caribbean Sea, we present the design, development, and characterization of 17 microsatellite markers in the sea urchin *E. lucunter*.

Materials and methods

Development of microsatellites

We selected eight *E. lucunter lucunter* individuals from three sites: Venezuela, Honduras, and Puerto Rico to develop microsatellite markers (Table 1).

Table 1. Samples used to design the simple sequence repeats (SSRs) of *Echinometra lucunter*

Country	Coordinates	Collection date	Sites/Number of samples	Approval organization samples / approval number
Venezuela	10°41'20.7" N 63°52'29.11" W	15/02/2016	Islote Lobos/2	Universidad Simón Bolívar/ by-product of the artisanal fishery of the Araya Peninsula in Venezuela
Honduras	15°58'17.92" N 86°28'14.36" W	14/05/2015	Cayos Cochinos/3	Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal Áreas Protegidas y Vida Silvestre (ICF)/ Resolution-DE-MP-080-2015
Puerto Rico	17°57'08.61" N 67°03'24.30" W	15/06/2016	Cayo Enrique/3	Departamento de Recursos Naturales y Ambientales/ DRNA: 2016-IC-052

Genomic DNA was extracted from tube feet using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) (Qiagen, 2006). The resulting DNA extractions were indexed and pooled to create a paired-end library using the Illumina Nextera® DNA Library Preparation Kit (Illumina, California, USA). Sequencing was carried out using an Illumina MiSeq platform (Illumina, California, USA) at the University of Salford, Salford, UK.

Microsatellite PCR markers were developed in-house using a previously published microsatellite design method (Fox, et al., 2019). The Griffiths, et al. (2016) workflow was used to detect microsatellites in the sequence data and design PCR primers. Multi-individual microsatellite identification (MiMi) (Fox, et al., 2019) was used subsequently as further quality control on potential markers.

To check for amplification success, we tested potential markers with the same eight DNA extractions used to design the microsatellites and extractions from additional individuals from the Colombian Caribbean Sea and the Tropical Eastern Atlantic Ocean. For the amplification steps we used the specifications of the Type-it® Microsatellite PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), (Qiagen, 2009) in a reaction volume of 5µl and the following thermal cycle: Step 1: 95°C/5 minutes; step 2: 28 cycles x (95°/30 seconds for denaturation, 61°C/90 seconds for annealing, and 72°C/30 seconds for elongation); step 3: 60°C/30 minutes, and step 4: hold at 4°C. We checked the final 5µl of PCR product solution on 1.8% agarose electrophoresis gel against a Hyperladder IV size standard (Bioline, London, UK) to confirm successful PCR amplification and the approximate size range of the fragments. Twenty-six SSR's were successfully visualized with these steps. To facilitate multiplexing, a universal tail PCR approach (Blacket, et al., 2012; Culley, et al., 2013) was used to add a fluorochrome to each of the markers (6FAM, TAMRA, HEX, and PET). Amplification success, thermal cycles, PCR features, and confirmation of successful gels were used as in the earlier step.

Microsatellite screening

In order to assess polymorphism of SSR's, we analysed 23 DNA samples from Cape Verde (Africa) and Caribbean localities (Table 2) using six multiplex (three-four markers each) and seven singleplex reactions (Table 3) using the PCR thermal cycles described previously. Confirmation of amplified SSR was again through visualizing on 1.8% agarose gels.

Table 2. Populations used to observe behaviour and polymorphism of microsatellites loci developed for *Echinometra lucunter*

Country	Coordinates	Collection date	Sites / number of samples	Approval organization samples / approval number
Honduras	15°58'17.92" N 86°28'14.36" W	14/05/2015	Cayo Cochinos/3	<i>Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal Áreas Protegidas y Vida Silvestre</i> (ICF)/ Resolution-DE-MP-080-2015
Puerto Rico	17°57'08.61" N 67°03'24.30" W	15/06/2016	Cayo Enrique/3	<i>Departamento de Recursos Naturales y Ambientales</i> / DRNA: 2016-IC-052
Colombia	12°27'3.6" N 72°7'17.4" W	01/07/2016	Cabo de la Vela/1	<i>Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, República de Colombia, Autoridad Nacional de Licencias Ambientales</i> (ANLA): Resolution number 255, 12 of March of 2014 Export permit #00848
	8°41'8.2" N 77°19'12.7" W	15/06/2016	Capurganá/2	
	12°32'34" N 81°44'45" W	14/08/2016	San Andrés/3	
	14°17'4.52" N 80°22'55" W	18/08/2016	Isla Cayo Serrana /1	
Venezuela	10°41'20.7" N 63°52'29.11" W	15/02/2016	Islote Lobos/2	<i>Universidad Simón Bolívar</i> / by-product of the artisanal fishery of the Araya Peninsula in Venezuela
Cape Verde-Africa	16°35'39.4"N 22°53'42.6" W	11/08/2011	Santa María, Sol Island/8	Donation by Owen Wangensteen, Department of Animal Biology at University of Barcelona.

Capillary electrophoresis of PCR products was performed using an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer at the Genomic Technologies Facility, University of Manchester (UK). Length and allele scoring of PCR products were estimated using the GeneMapper 5 (ThermoFisher Scientific) and PeakScanner v1.0 software (Applied Biosystems). Seventeen primers showed successful amplification, variable microsatellite loci, and were successfully genotyped in all 23 samples used.

Data analysis

We used the microsatellite genotypes of 23 individuals from several localities in the Caribbean and at Cape Verde (Africa) for analysis. Data were edited in Excel (Microsoft, Washington, USA) tables and converted to input files (Microsatellite Toolkit) to produce the genepop data. To detect and estimate genotyping error, data were probed using the Microchecker (Van Oosterhout, *et al.*, 2004) software. We then tested for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), calculated the number of alleles per loci (Na) and population, and observed heterozygosity (Ho) and expected heterozygosity (He) with the GenAlEx platform (<http://biology.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>). We estimated

Table 3. Characteristics of 26 nuclear microsatellite markers developed for *Echinometra lucunter*. F: Forward. R: Reverse. F.L: Fluorescent label. Grey: No development

Reactions	Locus	Universal tail used	Primer sequences	F.L	Repeat motif	Allele size range (bp)	
Singleplex	EL1	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	AATGCTCCCCAAATTTCTCG	6-FAM	AAG*81	
		R:		GCCTGTTACAATTCCTGGGG			
Singleplex	EL2	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	ATGGCTTTTGGGACAGATGG	6-FAM	AAG*111	394-434
		R:		TCCTCAGAAATTATGCCCGC			
Singleplex	EL3	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	CGATGTGAGACTAGAAATGTACGG	6-FAM	AAC*93	390-407
		R:		CGACAACCTGGTACCTGGACG			
Singleplex	EL4	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	GCATGTTACGATTTGAAGG	6-FAM	AAG*90	241-269
		R:		GCAGATGGTGGAGAAGAGG			
Singleplex	EL5	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	CTTCAAAGACCCGATAACAACG	6-FAM	AG*90	296-324
		R:		TGCACCGAATAATGATGAGC			
Singleplex	EL6	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	TGATCGAAACGGTGACATCC	6-FAM	AAAC*104	209-253
		R:		AGTCAGATCACCGCCATGC			
Singleplex	EL7	F:	GCCTCCCTCGCGCCA	TGGGACAAAGAGAGAGCTTGG	6-FAM	AG*72	162-171
		R:		AGCGGATGTTGATTTACGGC			
Multiplex1	EL8	F:	CAGGACCAGGCTACCGTG	GGCTTATGGTCACAGGACTGG	6-FAM	AG*68	
		R:		GGAAGAGCTCGCTTGATTCG			
	EL14	F:	CACTGCTTAGAGCGATGC	TCTTCTCGATCCCTCTTTGTCC	PET	AAG*84	333-345
Multiplex1	EL20	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	CGCCATTAATGTCAACACCG	HEX	ATC*69	249-318
		R:		AGCATCTGAATCCCCACCC			
Multiplex2	EL9	F:	CAGGACCAGGCTACCGTG	CCGTCTTGAGAGCTATCGGC	6-FAM	AGT*72	
		R:		GCGTTTAAGATTCCTTTGCC			
	EL15	F:	CACTGCTTAGAGCGATGC	GTTTCACATCGGTCCGTCG	PET	AAG*93	346-400
		R:		CTCCATAGCAACATGACGGG			
EL21	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	GCAGTATCATCATGCCAGC	HEX	ATC*126	315-561	
	R:		TCAGGGATTGTGTCTTTGCG				

Reactions	Locus	Universal tail used	Primer sequences	F.L	Repeat motif	Allele size range (bp)	
Multiplex3	EL10	F:	CAGGACCAGGCTACCGTG	TCAGCCTAAGTGTGTTGGAAGC	6-FAM	AG*114	
		R:		CTCTGTGCAAAGAAGGTTAAGTGC			
	EL16	F:	CACTGCTTAGAGCGATGC	TGAAGACGTTTCGTTGATTGC	PET	AG*52	182-272
		R:		GCACTTACATCAGTGGATTGC			
	EL22	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	ACATTGAAAACACTGGGGCG	HEX	AAG*129	156-294
		R:		ATGCATTTTCATGTGCACCC			
Multiplex4	EL11	F:	CAGGACCAGGCTACCGTG	TGATGCTCTACATTTGAGCCC	6-FAM	AG*68	
		R:		TCTCCCTAGCGTTACAGGGG			
	EL17	F:	CACTGCTTAGAGCGATGC	AAGTGGGTAGGCCAACGCTACACG	PET	AG*96	217-247
		R:		ACGCGCATACTATAGCGTGGTGG			
	EL23	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	GAGACAGAATGAAAATCGCTGC	HEX	TG*38	297-367
		R:		CGAAGGGACTATGAAACGGG			
Multiplex5	EL12	F:	CAGGACCAGGCTACCGTG	TGGTGCAAATGTAGCAGTCG	6-FAM	AGT*75	
		R:		CGTGGTACATTGCTTACAGCC			
	EL18	F:	CACTGCTTAGAGCGATGC	GCTCATTGGCAGATCAAACG	PET	AG*60	217-399
		R:		CTTGCTCTCTTGTCTATTCCCC			
	EL24	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	CGGTGACCCTACAGTAAACTTGC	HEX	AG*54	300-474
		R:		TCCCTCTTCTCCACGC			
Multiplex6	EL13	F:	CAGGACCAGGCTACCGTG	CCATGCCCAATAATAACGCC	6-FAM	AG*128	
		R:		ATCCTTGGGCCATCTTCC			
	EL19	F:	CACTGCTTAGAGCGATGC	CAAATAAAGACGCCAGCC	PET	AG*40	156-186
		R:		ATGAGGCTTCCCTGAATCCC			
	EL25	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	TAAACCAGGCCAGAATGACG	HEX	TC*72	
		R:		TGGGAGCTTTTAGTCCGAGC			
Singleplex	EL26	F:	CGGAGAGCCGAGAGGTG	TTCATCCAACCTGTGCACATCC	HEX	AAG*147	

the Polymorphic Information Content (PIC) of each locus using the program Cervus 3.0.7 (Kalinowski, *et al.*, 2007), and the genotypic linkage disequilibrium using GenPop (<http://genepop.curtin.edu.au/>). We used the Bonferroni correction method to adjust the significance levels for HWE and linkage disequilibrium tests.

Results

The Illumina MiSeq run generated 27,043,607 paired-end reads with the eight DNA samples (Honduras, Puerto Rico, and Venezuela). We obtained a further filtered list of 308 potentially amplifiable loci (PAL) with the pal_filter from the Galaxy platform and we selected 26 PAL's for screening: 14 di-, 11 tri- and one tetra-nucleotide (Table 3).

After several assays, we obtained 17 successful microsatellite markers: Nine di-, seven tri-, and one tetra nucleotide (Table 4). The allele number per locus (Na) ranged from four to 24 while the observed (Ho) and expected (He) heterozygosities ranged from 0.682 to 1 and 0.609 to 0.9304, respectively.

Two out of the 17 loci deviated from HWE (EL22- present in 16 of 23 samples during microsatellite screening and EL14- present in all samples except one in San Andres Island) after Bonferroni correction for multiple testing ($p < 0.05$). Homozygote excess, related to the presence of null alleles or stochasticity due to the different locality sources for one

Table 4. Characteristics of 17 markers developed for *Echinometra lucunter*

Locus name	Forward and reverse primer	Fluor	R. motif	Locus size range	N	Na	Ne	Ho	He	PIC	pHWE	pHWEbc
EL2	ATGGCTTTTGGGACAGATGG TCCTCAGAAATATGCCCGC	6-FAM -	(AAG) ₁₁₁	394-434	7	7	4.900	0.857	0.796	0.772	0.817	1.000
EL3	CGATGTGAGACTAGAAAATGTACGG CGACAACCTGGTACCTGGACG	6-FAM -	(AAC) ₉₃	390-407	8	6	4.414	1.000	0.773	0.744	0.509	1.000
EL4	GCATGTTACAGATTTGAAGG GCAGATGGTGGAGAAGAGG	6-FAM -	(AAG) ₉₀	241-269	8	6	4.000	1.000	0.750	0.712	0.559	1.000
EL5	CTTCAAAGACCCGATACAACG TGCACCGAATAATGATGAGC	6-FAM -	(AG) ₉₀	296-324	6	10	9.000	1.000	0.889	0.878	0.600	1.000
EL6	TGATCGAAAACGGTGACATCC AGTCAGATCACCGCCATGC	6-FAM -	(AAAC) ₁₀₄	209-253	8	4	2.844	0.875	0.648	0.592	0.204	1.000
EL7	TGGGACAAAGAGAGAGCTTGG AGCGGATGTTGATTTACGGC	6-FAM -	(AG) ₇₂	162-171	8	4	2.560	0.875	0.609	0.530	0.495	1.000
EL14	TCTTCTCGATCCCTCTTTGTCC TGAAGGTGCACTGATGGAGG	PET -	(AG) ₆₈	333-345	22	5	3.625	0.682	0.724	0.681	0.002**	0.034*
EL15	GTTTCACATCGGTCCGTCG CTCCATAGCAACATGACGGG	PET -	(AAG) ₉₃	346-400	20	16	10.256	0.800	0.903	0.895	0.014*	0.238
EL16	TGAAGACGTTCTGTTGATTGC GCACTTACATCAGTGGATTGC	PET -	(AG) ₅₂	182-272	16	19	15.059	0.875	0.934	0.930	0.144	1.000
EL17	AAGTGGGTAGCCAACGCTACACG ACGCGCATACTATAGCGTGGTGG	PET -	(AG) ₉₆	217-247	19	13	8.022	0.789	0.875	0.864	0.590	1.000
EL18	GCTCATTGGCAGATCAAACG CTTGCTCTTGTCTATTCCCC	PET -	(AG) ₆₀	217-399	21	22	11.919	0.810	0.916	0.911	0.024*	0.408
EL19	CAAACATAAAGACGCCAGCC ATGAGGCTTCCCTGAATCCC	PET -	(AG) ₄₀	156-186	11	10	5.261	0.909	0.810	0.792	0.275	1.000
EL20	CGCCATTAATGTCAACACCG AGCATCTGAATCCCCACCC	HEX -	(ATC) ₆₉	249-318	20	16	10.000	0.850	0.900	0.892	0.021*	0.357
EL21	GCAGTATCATCATCGCCAGC TCAGGGATTGTGTCTTTGCG	HEX -	(ATC) ₁₂₆	315-561	22	24	13.444	1.000	0.926	0.921	0.229	1.000
EL22	ACATTGAAAACACTGGGGCG ATGCATTTTCATGTGCACCC	HEX -	(AAG) ₁₂₉	156-294	15	13	9.783	0.733	0.898	0.889	0.001***	0.017*
EL23	GAGACAGAATGAAAATCGCTGC CGAAGGGACTATGAAACGGG	HEX -	(TG) ₃₈	297-367	19	18	11.108	0.842	0.910	0.904	0.017*	0.289
EL24	CGGTGACCCTACAGTAAACTTGC TCCCTCTTCTCCACGC	HEX -	(AG) ₅₄	300-474	10	13	10.000	0.800	0.900	0.892	0.130	1.000

Fluor: Fluorescent dye, R. motif: Motif of repetition, N: Sample size, Na: Allele number, Ne: Allele effective number, Ho: Observed heterozygosity, He: Expected heterozygosity, PIC: Polymorphic information content, pHWE: Hardy-Weingberg Equilibrium, pHWEbc: Hardy-Weingberg Equilibrium with Bonferroni Correction method. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

population, might explain these deviations. Polymorphic information content (PIC) ranging from 0.530 to 0.930 shows normal polymorphism behavior (**Table 4**). We did not detect linkage disequilibrium between any locus pair after the Bonferroni correction, which means that in general, all the loci were independent.

Discussion

Microsatellite development is useful for a variety of genetic analyses of population structure. In this case, these markers will be used for the first time to confirm the influence of marine barriers to genetic flow among populations of *E. lucunter lucunter* throughout the Caribbean Sea.

For many years, based upon the biological characteristics of marine organisms and barriers such as mouths of rivers, marine currents, physicochemical parameters, and others in the Caribbean Sea, several authors have wondered if the organisms of this area are genetically homogeneous or segregated. While few marine barriers have been identified (Carlin, *et al.*, 2003, Baums, *et al.*, 2005, Cowen, *et al.*, 2006, Taylor & Hellberg, 2003, 2006), several biophysical models have been proposed to identify patterns of connectivity and potential barriers to larval dispersal of reef fish (Schultz & Cowen, 1994; Paris & Cowen, 2004; Cowen, *et al.*, 2006). There are few genetic evaluations of other marine groups providing evidence of both connectivity and phylogeographic breaks for the Caribbean (Avise, 1992; Carlin, *et al.*, 2003; Taylor & Hellberg, 2003; Baums, *et al.*, 2005).

According to Fox, *et al.* (2019), ecological and conservation studies often focus upon non-model species for which genetic markers are not available, and *Echinometra* species are an example. The methodology used to isolate and characterize the *E. lucunter* loci followed the method of multi-individual microsatellite identification (MiMi) proposed by Fox, *et al.* (2019) with the combination of affordable Next Generation Sequencing (NGS) and freely available bioinformatics tools. Our positive results support once again the effectiveness and speed of this method.

The application of the microsatellite markers developed herein to additional *E. lucunter* populations will allow understanding how the genetic diversity is distributed in this benthic species throughout the Caribbean Sea considering its biological features and the marine barriers described for the region.

Conclusions

Seventeen (17) new microsatellites were developed and characterized for the sea urchin *Echinometra lucunter lucunter*. The markers fill up the gap of information regarding tools to characterize the genetic structure of this species in the Caribbean Sea. Due to the absence of microsatellites within the species of the genus *Echinometra*, it was necessary to develop and characterize a number of this kind of markers to determine the genetic structure of *Echinometra lucunter lucunter* in the Caribbean Sea. The successful isolation and characterization of these microsatellites will contribute to genetic and marine connectivity studies of *Echinometra lucunter lucunter* and *Echinometra lucunter polypora* through their broad range of distribution in the Atlantic Ocean. Information on population genetics of this species is crucial for the assessment of the ecological situation of their populations and the development of management strategies when necessary.

Acknowledgments

Special thanks are given to Dra. Sarah Griffiths, Manchester Metropolitan University, for her support on microsatellite development and all the work related with the molecular laboratory and the correct use of Bioinformatic Tool Galaxy. Thanks to Rachell E. Antwis for sequencing work at Salford University. Numerous people and institutions helped with sample collection and logistics throughout the Caribbean - Cape Verde (Africa), as well as with permits: Mayra Núñez (*Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre*, Honduras: Permit_Resolution-DE-MP-080-2015), Ricardo Betancur (*Universidad de Puerto Rico, Río Piedras Campus, Departamento de Recursos Naturales y Ambientales*: DRNA 2016-IC-052), Nikolaos Schizas and Mónica Alfaro (*Universidad de Puerto Rico, Mayagüez Campus*), Ana Carolina Peralta (*Universidad Simón Bolívar, Venezuela*), Owen Wangensteen (*Universitetet I Troms, Norway*), Adriana Osorno (INVEMAR, Colombia), Ministry of Environment and Sustainable Development (Colombia- National Authority of Environmental Licenses (ANLA): Resolution number 255, 12 of March of 2014 and Export permit No. 00848). Thanks to Gilberto Orozco at *Universidad Nacional de Colombia* for his help with analysis data. This research was supported by Colciencias, fellowship call 267-2012 (PhD grant)

and research grant No. 116171450647; UNAL internal financial help; the Ecology and Environment Research Centre-EERC at MMU (grant R60010-sampling, laboratory and analysis in Manchester); Corporation Center of Excellence in Marine Sciences - CEMarin (Call # 12 of 2018), and contribution No. 486 of *Instituto de Estudios en Ciencias del Mar*, CECIMAR, *Universidad Nacional de Colombia*.

Author contributions

MBS was the person in charge of the results and their respective analyses, and she wrote and sent the manuscript to the journal. YFC worked with the principal author in the obtention of results and their respective analysis. LMB directly advised the work and supported the sample collection and laboratory processes, and participated in the manuscript writing. GF collaborated directly to laboratory results and actively participated in the edition of the manuscript. TDH collaborated in the laboratory work. NHCC advised the manuscript writing, and RP participated in the editing of the document.

Conflict of interests

We have no conflicts of interest to report.

References

- Avise, J. C.** (1992). Molecular population structure and biogeographic history of a regional fauna a case history with lessons for conservative biology. *Oikos*. **63**: 62-76. Doi: 10.2307/3545516
- Baums, I. B., Miller, M. W., Hellberg, M. E.** (2005). Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Mol Ecol*. **14**: 1377-1390. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02489.x
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T, Lee, S. F, Miller, A. D.** (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments – an effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour*. **1**: 456-463. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x
- Carlin, J. L., Robertson, D. R., Bowen, B. W.** (2003). Ancient divergences and recent connections in two tropical Atlantic reef fishes *Epinephelus adscensionis* and *Rypticus saponaceous* (Percoidei: Serranidae). *Mar Biol*. **143**: 1057-1069. Doi: 10.1007/s00227-003-1151-3
- Cowen, R. K., Paris, C. B., Srinivasan, A.** (2006). Scaling of population connectivity in marine populations. *Sci*. **311**: 522-527. Doi: 10.1126/science.1122039
- Culley, T. M., Stamper, T. I., Stokes, R. L., Brzski, J. R., Hardman, N. A., Klooster, M. R, Merritt, B. J.** (2013). An efficient technique for primer development and application that integrates fluorescent labelling and multiplex PCR. *Appl Plant Sci*. **1** (10): 1-10. Doi: 10.3732/apps.1300027
- Fox, G., Preziosi, R. F., Antwis, R. E., Benavides-Serrato M., Combe, F. J., Harris, W. E., Hartley, I. R., Kitchener, A. C., De Kort, S. R., Nekar, A. I., Rowntree, J. K.** (2019). Multi-individual microsatellite identification: A multiple genome approach to microsatellite design (MiMi). *Mol Ecol Resour*. **19** (6): 1-9. Doi: 10.1111/1755-0998.13065
- Griffiths, S. M., Fox, G., Briggs, P. J., Donaldson, I. J., Hood, S., Richardson, P., Leaver, G. W., N. K. Truelove, Preziosi, R. F.** (2016). A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimised, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data. *Conserv Genet Resour*. **8**: 481-486. Doi: 10.1007/s12686-016-0570-7
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T.C.** (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*. **16**: 1099-1106. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
- McCartney, M. A., Keller, G., Lessios, H. A.** (2000). Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Mol. Ecol*. **9**: 1391-1400. Doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01022.x
- Paris, C. B., Cowen, R. K.** (2004). Direct evidence of a biophysical retention mechanism for coral reef fish larvae. *Limnol*. **49** (6): 1964-1979. Doi: 10.4319/lo.2004.49.6.1964
- Pawson, D. L.** (1978). The echinoderm fauna of Ascension Island, South Atlantic Ocean. *Smithsonian Contrib. Mar. Sci*, **2**: 1-29.
- Qiagen.** DNeasy® Blood & Tissue Handbook [pdf] (2006). Date of entry: January 15, 2015. Available in: http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/DNeasy_Blood_&_Tissue_Handbook.pdf

-
- Qiagen.** Type-it Microsatellite PCR Handbook [pdf] (2009). Date of entry: March 14, 2015. Available in: <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Assay-Technologies/End-Point-PCR-and-RT-PCR-Reagents/Type-it-Microsatellite-PCR-Kit#resources>
- Schultz, E. T. & Cowen, R. K.** (1994). Recruitment of coral-reef fishes to Bermuda – local retention or long-distance transport. *Mar Ecol Prog Ser.* **109**: 15-28. Doi: 10.3354/meps111015
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J.** (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett.* **9**: 615-29. Doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
- Sunnucks, P.** (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol.* **15** (5): 199-203. Doi: 10.1016/S0169-5347(00)01825-5
- Taylor, M. S. & Hellberg, M. E.** (2003). Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Sci.* **299**: 107-109. Doi: 10.1126/science.1079365
- Taylor, M. S. & Hellberg, M. E.** (2006). Comparative phylogeography in a genus of coral reef fishes: biogeographic and genetic concordance in the Caribbean. *Mol Ecol.* **15**: 695-707. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02820.x
- Van Oosterhout, C., Hutchison, W. F., Shipley, P., Wills, D. P. M.** (2004). Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* **4**: 535-538. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Ciencias Naturales

Ensayo

El Instituto de Ciencias Naturales (1936-2019): de la historia natural al conocimiento de la biodiversidad en Colombia

The Colombian *Instituto de Ciencias Naturales* (1936-2019): From the natural history to the knowledge on the biodiversity in Colombia

✉ Germán Amat-García*, ✉ Jaime Aguirre-Ceballos

Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Resumen

Se describen y se relacionan en una línea de tiempo los antecedentes institucionales sobre el origen y los hechos más notables del Instituto de Ciencias Naturales, y se analizan los alcances de sus contribuciones al conocimiento de la historia natural en Colombia durante el siglo XX, así como los logros institucionales más importantes en el transcurso de las dos primeras décadas del siglo XXI en la docencia, la investigación y la divulgación científica en torno a la biodiversidad y la conservación de la naturaleza.

Palabras clave: Biodiversidad; Conservación; Instituto de Ciencias Naturales; Historia de la ciencia; Colombia.

Abstract

We describe the background and main highlights regarding the origins of the *Instituto de Ciencias Naturales*, *Universidad Nacional de Colombia* (Institute of Natural Sciences, National University of Colombia) connecting them along a timeline. We also analyze the Institute's contributions to the knowledge of the natural history of Colombia during the 20th century, as well as its main achievements during the first two decades of the 21st century in the fields of teaching, research, and scientific dissemination of the country's biodiversity and nature conservation.

Keywords: Biodiversity; Conservation; *Instituto de Ciencias Naturales*; History of science; Colombia.

Antecedentes

El desarrollo de las tres primeras empresas científicas más importantes del país, la Expedición Botánica, la Misión Zea y la Comisión Corográfica, así como la creación a principios del siglo XX de instituciones dedicadas al estudio de la historia natural, representan un legado de gran repercusión en la ciencia colombiana (Díaz-Piedrahita, 1997). Este importante acervo histórico confluyó en la creación del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional (bajo la denominación estatutaria de Departamento de botánica) en 1936, institución ejecutora de los primeros estudios taxonómicos e inventarios de flora y fauna del país en el siglo XX (Amat-García, 2006; Amat-García, *et al.*, 2011). La historia natural se entendió, en sus inicios, como la observación y la descripción de la naturaleza y surgió como disciplina en el siglo XVIII (Ordóñez, *et al.*, 2004). Dichas nuevas corrientes del conocimiento promovieron las primeras grandes exploraciones científicas en América. La corte española, en el reinado de Felipe II (1556-1598), comisionó a Francisco Hernández de Toledo para viajar a la Nueva España (actual territorio de México) entre 1574-1577, pero sin duda alguna fue durante la época de Carlos III (1759-1788) que estas exploraciones para el estudio de la naturaleza cobraron mayor

Citación: Amat-García G, Aguirre-Ceballos J. El Instituto de Ciencias Naturales (1936-2019): de la historia natural al conocimiento de la biodiversidad en Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):768-779, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1096>

Editor: Elizabeth Castañeda

***Correspondencia:**
Germán Amat-García;
gdamatg@unal.edu.co

Recibido: 22 de noviembre de 2019

Aceptado: 18 de marzo de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

relevancia con la financiación de las reales expediciones botánicas a los Virreinos del Perú (1777-1788), la Nueva España (1787-1803) y la Nueva Granada (1783-1816), y de la expedición Malaspina (1789-1794).

Estas actividades constituyeron los puntos de partida de los inventarios de los recursos naturales en una época de expansionismo político de las monarquías europeas para satisfacer la necesidad de abastecer los gabinetes de historia natural y de poner a prueba la utilidad económica de numerosos productos naturales (**Farber, 2000**). En ese contexto mundial surgió durante el período colonial el primer programa de investigaciones de historia natural de gran trascendencia en el Nuevo Reino de Granada, la Real Expedición Botánica, la cual se adelantó entre 1783 y 1816 bajo el liderazgo del médico y sacerdote español José Celestino Mutis (**Figura 1a**). El programa de la Expedición incluyó estudios botánicos, zoológicos, geográficos, geológicos y mineralógicos (**Forero, 1977**; **Díaz-Piedrahita, 1997**; **Amaya, 2005**). Como fruto de la obra mutisiana se construiría el Observatorio Astronómico Nacional en 1803, que se reactivaría en la Casa de la Expedición y el Museo de Historia Natural en 1824 (**Pérez-Arbeláez, 1965**; **1968**).

Después de la independencia, cuando el gobierno se “estabilizaba” políticamente, una de las primeras preocupaciones del vicepresidente Francisco de Paula Santander (1792—1840) fue la reestructuración de la educación, la investigación y la cultura en la nueva República. Mediante decreto firmado el 28 de julio de 1822 se conformó una segunda comisión científica, liderada por Francisco Antonio Zea, cuya finalidad era contratar científicos europeos con la tarea expresa de fundar el Museo de Ciencias Naturales, la Escuela de Minas e impartir cátedras de ciencias naturales y química en la Universidad Central. La meta de esa misión científica no era promover una nueva expedición botánica, sino crear un museo al estilo de los gabinetes de historia natural europeos. En 1823 esta comisión científica contrató a cuatro naturalistas franceses y a un peruano con formación académica europea; se trataba del químico Jean Baptiste Boussingault (1801-1887), del médico François Desiré Roulin (1796-1874), de los taxidermistas Jacques Bourdon (1790-1859) y el botánico Joustinne Marie Goudot (1802-1847), provenientes del Museo Historia Natural de París, y del ingeniero de minas Mariano Rivero (1798-1857). En 1823, también por iniciativa del General Santander, se crearon las Escuelas de Botánica, Minas y Química y el Museo de Historia Natural. Las escuelas finalmente no progresaron, pero la Universidad Central, predecesora según algunos autores de la actual Universidad Nacional, y el Museo de Historia Natural alcanzaron un desarrollo incipiente que se vio interrumpido por la gran agitación política de 1828 (**Díaz-Piedrahita & Mejía-de Mesa, 2010**).

Entre 1850 y 1859 se adelantaron las actividades de una tercera comisión científica, la Comisión Corográfica de los Estados Unidos de Colombia, liderada por el geógrafo e ingeniero militar coronel Agustín Codazzi. Sus objetivos estaban orientados a producir los mapas de cada una de las provincias de entonces y describir los aspectos naturales, culturales y sociales de las comunidades humanas y de su medio natural (**Bateman, 1958**). Durante su funcionamiento la Comisión Corográfica llevó a cabo un extenso trabajo en los campos de la geografía física y la cartografía y en aspectos de la geografía humana, pero también hizo importantes contribuciones florísticas, geológicas y arqueológicas. Fueron miembros destacados de la Comisión Manuel Ancizar (1812-1882), responsable de describir las costumbres regionales de la población colombiana, y José Jerónimo Triana (1828-1890) (**Figura 1b**), botánico y médico que tenía las tareas de recolectar, examinar, clasificar, herborizar y dar nombres botánicos a las plantas que se fueran encontrando. Las actividades de la Comisión Corográfica se debilitaron por la falta de un decidido apoyo político y económico, suerte que corría toda empresa científica en la Nueva Granada de aquella época (**Soriano, 1968**). El nacimiento del Colegio Militar durante el primer gobierno del general Tomás Cipriano de Mosquera Figueroa (1845-1849), la fundación de la Sociedad de Naturalistas Neogranadinos en 1859 y la creación de la Universidad Nacional de Colombia en 1867, y el inicio de sus tareas pioneras en la Escuela de Ciencias

Naturales, contribuyeron a la institucionalización de la ciencia en el país al estructurarse una comunidad académica y formadora de escuela en torno a las investigaciones sobre historia natural (**Restrepo, et al., 1993**).

La transición del siglo XIX al XX (1867-1902) se considera la época de oro de la historia natural en el mundo (**Farber, 2000**). Este período se conoce como la era victoriana, lapso en el que el tema de lo viviente tuvo un gran impacto en la sociedad. Se destaca en esta época Charles Darwin (1809-1882), quien publicó el 24 de noviembre de 1859 su libro *Sobre el origen de las especies*, el cual generó un cambio revolucionario en las ciencias naturales al demostrar la evolución de los seres vivos y la relación que había entre ellos. Entre tanto, en el país se asimilaba el pensamiento darwiniano con reserva y controversia. Los naturalistas colombianos “simpatizaban con las ideas darwinistas sin producir mucho ruido” (**Restrepo, 2009**). En este tiempo se impartieron los primeros cursos de botánica, zoología, anatomía, antropología, paleontología, física y química en la Escuela de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, la cual se convirtió en un semillero académico que se forjó desde la fundación de la universidad en 1867 hasta su cierre temporal en 1902. La Escuela de Ciencias Naturales, que funcionaba en forma paralela con la Escuela de Medicina, se integró en 1871 como una dependencia de la Universidad Nacional y su primer director bajo esta condición académico-administrativa fue José Francisco Bayón Fernández (1817-1851), médico botánico y autor del *Ensayo de Jilología*, considerado el primer libro sobre maderas autóctonas del país (**Díaz-Piedrahita, 1999**). José Vicente Uribe, Bernardino Medina, Leoncio Barreto y Daniel Rodríguez, vinculados ante todo al campo de las ciencias médicas, ocuparon las cátedras relacionadas con la zoología y Carlos Cuervo Márquez (1858-1930), con una gran vocación por las ciencias naturales, asumió la cátedra de botánica (**Díaz-Piedrahita, 2000**). Pero fue Santiago Cortés (1854-1924) (**Figura 1c**), ingeniero y científico egresado de la Escuela, quien se constituiría en el impulsor principal del conocimiento sobre historia natural en la Universidad Nacional durante el siglo XIX y del nuevo proyecto botánico de la universidad en los inicios del siglo XX, cuyo principal artífice fue el padre jesuita Enrique Pérez Arbeláez (1886-1972). El mismo Pérez Arbeláez afirmó en sus escritos que Santiago Cortés había despertado su vocación botánica (**Díaz-Piedrahita, 2005**).

Hacia el año 1900, la mayoría de los médicos con orientaciones botánicas publicaron importantes textos de consulta y de enseñanza que fueron asimilados por varias generaciones. Lastimosamente, la escuela fue clausurada en 1902 por problemas políticos, administrativos y económicos, pero, pese a estas circunstancias, marcó una etapa importante en el desarrollo de la historia natural en el país por su contribución al conocimiento y a la enseñanza.



Figura 1. José Celestino Mutis, José Jerónimo Triana, Santiago Cortés

Orígenes del Instituto de Ciencias Naturales

En la Europa de la primera década del siglo XX el conocimiento de la historia natural tuvo un cambio de paradigma en el sentido que le da **Kuhn** (1971), al orientarse hacia las múltiples disciplinas que hoy conocemos en el ámbito de las ciencias de la vida y de la tierra. Con la llegada del siglo XX el país adoptó el modelo de la historia natural de la Europa de los siglos XVIII y XIX. Hacia 1928 regresó al país el padre Enrique Pérez Arbeláez S.J. (1886-1972), después de visitar España, Francia y Alemania, con el propósito de perfeccionarse en ciencias naturales y de acopiar información sobre el estado de las nuevas tendencias en la investigación biológica. A su llegada pudo constatar que el conocimiento sobre los recursos naturales estaba rezagado, con inventarios bióticos inconclusos, y que el país no estaba a la altura de las necesidades y los retos que imponía el siglo XX (**Arango**, 1992). Sus primeras tareas estuvieron encaminadas a la creación del Herbario Nacional Colombiano (COL), propiciada por su amistad de infancia con la familia de la esposa del presidente Miguel Abadía Méndez, quien dictó el decreto de su fundación en 1928, año en que fue nombrado botánico del Ministerio de Industrias por el doctor José Antonio Montalvo. Por esa época, en colaboración con el Dr. César Uribe Piedrahita (1897-1951), el padre Enrique Pérez Arbeláez realizó la primera excursión al Caquetá, donde obtuvieron las plantas con las que se inició el Herbario Nacional (**Arango**, 1992).

El 12 de mayo de 1936, durante su vinculación al Departamento de Agricultura del Ministerio de la Economía y a la Universidad Nacional, el sacerdote jesuita sustentó ante el Consejo Directivo de dicha Universidad la conveniencia de crear un instituto botánico nacional. El 30 de octubre de 1936, mediante el Acuerdo 28, se aprobó en segundo debate la creación del Departamento de Botánica de la Universidad Nacional (**Díaz-Piedrahita**, 1997; **Linares**, 2001). Simultáneamente seguía funcionando el Herbario Nacional Colombiano ya instalado en la nueva sede del campus de la Universidad Nacional de Colombia; allí se organizaron las colecciones del célebre botánico José Jerónimo Triana (1828-1890) (**Parra-Osorio & Díaz-Piedrahita**, 2016).

El 18 de julio de 1938, con motivo del cuarto centenario de Bogotá, se inauguró la nueva sede del Instituto de Botánica, rodeado del jardín Alexander von Humboldt, en la recién creada Ciudad Universitaria, un proyecto urbano de grandes proporciones diseñado por el arquitecto alemán Erich Lange bajo la presidencia de Alfonso López Pumarejo (1880-1959). El 22 de septiembre del mismo año, mediante el Acuerdo 84, se adscribió al Instituto de Botánica el Museo de Ciencias Naturales, que funcionaba en la Facultad de Medicina, y mediante el Acuerdo 5 del 30 de enero de 1939 se cambió el nombre del Departamento de Botánica por el de Instituto de Botánica (**Díaz-Piedrahita**, 1997; **Linares**, 2001). El 14 de noviembre de 1940, mediante el Acuerdo 128, se estableció que “a partir del 1º de diciembre el Instituto de Botánica se llamará Instituto de Ciencias Naturales”.

En 1940, Armando Dugand (1906-1971) sucedió en la dirección del Instituto de Ciencias Naturales al padre Enrique Pérez Arbeláez. En su administración se diversificaron las funciones de la institución y se integró formalmente el componente zoológico con la conformación de las primeras colecciones, entre ellas las de entomología y ornitología. Asimismo, se impartieron los primeros cursos de sistemática botánica del país y se creó la revista *Caldasia*, boletín oficial del Instituto de Ciencias Naturales dedicado a la memoria del sabio naturalista Francisco José de Caldas (1768-1816) y a sus importantes estudios en botánica, zoología, geografía y astronomía.

Dos hechos notables de la época fueron, primero, la programación del primer curso de botánica sistemática en la Universidad Nacional de Colombia, dictado por el Dr. Armando Dugand en 1948, en el cual se prepararon los primeros taxónomos profesionales del país: María Teresa Murillo, Jesús Idrobo, Álvaro Fernández-Pérez y Roberto Jaramillo, y, segundo, la creación en 1959 de la carrera de ciencias naturales bajo la dirección del Dr. Pablo Leyva (1911-1962), con lo que se inició la formación profesional de los primeros botánicos y zoólogos del país.

El colectivo humano que especialmente durante las décadas de los 40, los 50 y los 60 aseguró el alto nivel del Instituto merece un sitio de primer orden en la historia de las ciencias naturales del país. Entre sus integrantes figuran Enrique Pérez Arbeláez (1886-1972), Armando Dugand (1906-1971), Rafael Romero Castañeda (1910-1973), Hernando García Barriga (1913-2005), Roberto Jaramillo Mejía (1919-2006), María Teresa Murillo P. (1929-2017), Álvaro Fernández Pérez (1920-1994), Jesús M. Idrobo (1917-2010), Lorenzo Uribe (1900-1980), Polidoro Pinto (1926-2004), Luis Eduardo Mora-Osejo (1931-2004), Enrique Forero (1942-), Gustavo Lozano C. (1938-2000), Santiago Díaz Piedrahita (1944-2014), Pedro Ruíz (1932-1998), Humberto Alarcón (1926-1978, José Ignacio Borrero(1921-2004), Antonio Olivares (1917-1975), y Jorge Hernández (1935-2001), entre otros (**Forero**, 1976b; **Amat-García**, 2017).

En 1952 se creó la revista Mutisia- Acta Botánica Colombiana, en memoria de José Celestino Mutis (1732-1808) y en ese mismo año, el 4 de noviembre, mediante acuerdo especial de carácter cultural, los gobiernos de Colombia y España suscribieron en Madrid el proyecto editorial Flora de Mutis, publicación conjunta de la obra científica de José Celestino Mutis en el marco de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada.

Institucionalización de la taxonomía colombiana durante el siglo XX

En 1959 el Instituto de Ciencias Naturales consolidó su papel en el conocimiento taxonómico del país a raíz de varios acontecimientos que confluyeron en la década siguiente en la implementación de los programas académicos de botánica y zoología en la primera carrera de ciencias naturales instituida en el país y el crecimiento significativo de las colecciones con la incorporación de cientos de ejemplares.

Un aporte muy significativo del Instituto en el campo de la zoología fue la creación de la revista Lozania - Acta Zoológica Colombiana, destinada a la zoología y dedicada al primero de los zoólogos colombianos, Jorge Tadeo Lozano (1771-1816), Marqués de San Jorge, quien fuera el coordinador de los estudios zoológicos de la Expedición Botánica y editor de Fauna de Cundinamarca. La primera mitad del siglo XX fue relevante para la ciencia del país por la creación de las primeras revistas científicas (1912) y la fundación de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (1936). De forma sinérgica, las colecciones de plantas y animales adquirieron una gran visibilidad nacional y a los primeros ejemplares del COL, fechados en 1929, se sumaron los de los herbarios Gabriel Gutiérrez Villegas en Medellín (1927), el Museo de la Salle en Bogotá (1913), las colecciones fundadas por la comunidad Lasallista, como el Museo de Historia Natural del Instituto de La Salle de Bogotá (1919) y el Museo del Colegio San José de Medellín (1938). En la década de los cincuenta el Instituto de Ciencias Naturales contribuyó a la formación científica en la Universidad Nacional y tuvo un papel fundamental en la creación de las carreras de agronomía y geología y las primeras cátedras de biología general en las carreras biomédicas, agronómicas y veterinarias.

Gracias al Acuerdo 48 de 1963 del Consejo Académico de la Universidad, el Instituto de Ciencias Naturales quedó adscrito a la Rectoría, pero dos años más tarde, como efecto de las políticas de integración académica y de formación de departamentos en la Universidad Nacional de Colombia, se suprimió la carrera de ciencias naturales y en su lugar se creó el nuevo Departamento de biología (Instituto de Ciencias Naturales) con el primer plan curricular de la carrera de biología (**Mora-Osejo**, 1990; **Cubillos**, 2019).

Los años 60 fueron una etapa de intensa actividad académica para el Instituto, una época febril que fue descrita por Víctor Emilio Jara (1971), un historiador de las instituciones científicas, de la siguiente manera:

Cuando el Instituto alcanzó entonces las altas calificaciones académicas, como cabeza de cinco departamentos para cinco carreras universitarias, informaba el rector a la conciliatura, que fue el órgano directivo bajo la vigencia del decreto ley No 136 de 1957: finalidades del instituto: a) realizar investigaciones científicas, como continuación de lo hecho por la Expedición Botánica, b) formación de especialistas en Geología y Geofísica

y c) formación de especialistas en Botánica y Zoología (informe del rector Arturo Ramírez Montúfar. 1962). Entonces el Instituto tenía 16 profesores, 15 funcionarios administrativos y 194 estudiantes, que promediaban apenas 6200 pesos por costo por estudiante/año...”

Entre 1960 y 1980 merecen reconocerse los siguientes eventos por su impacto en los avances del Instituto (Amat-García, *et al.*, 2015; Cubillos, 2019).

El influjo de la academia alemana en el pensamiento científico de los forjadores del Instituto. El padre Enrique Pérez Arbeláez, por ejemplo, tuvo una franca formación alemana. El padre Lorenzo Uribe, director e investigador del Instituto, se doctoró siendo ya sacerdote en la Universidad de Friburgo. El Profesor Luis Eduardo Mora Osejo, director entre 1965 y 1970, realizó sus estudios de doctorado en ciencias, biología-botánica, en la Universidad Johannes Gutenberg de Maguncia. Para las instituciones científicas del país, entre ellas el Instituto de Ciencias Naturales, la academia alemana significó una fusión de la investigación con la academia universitaria, proporcionando un modelo pedagógico de grandes proyecciones (Marquínez, 2017)

La práctica científica ejemplar de algunos investigadores con formación religiosa. Los padres Enrique Pérez Arbeláez, Lorenzo Uribe, Antonio Olivares, Gustavo Huertas, Luis A. Camargo y Carlos Acosta contribuyeron a que el Instituto fuese en aquella época un centro de gran productividad académica abierto a los especialistas y al mundo. Su excelente formación en biología y sus resultados fueron el reflejo de un trabajo organizado, incansable y disciplinado, aspectos que dejaron una huella en las generaciones subsecuentes de biólogos.

La contribución de los científicos extranjeros que prolongaron su permanencia o se radicaron definitivamente en el país. Estos científicos encontraron en el instituto un ambiente ideal para la continuación de sus estudios. Especial mención merecen el botánico José Cuatrecasas Arumí (1903-1996), el etnobotánico Richard Evans Schultes (1915-2001), el botánico Ellsworth Killip (1890-19968), el entomólogo Leopoldo Richter (1896-1984), el herpetólogo Federico Medem (1912-1984), el paleoecólogo Thomas van der Hammen (1924-2010) y los ictiólogos Cecil Miles (1898-1982) y George Dahl (1905-1995).

Los programas sociales y educativos dirigidos a los países latinoamericanos en los años 60. Programas como la Alianza para el progreso y el Plan Atcon, originados en Estados Unidos, promovieron la llamada reforma Patiño, basada en la creación de departamentos en las facultades universitarias como condición para financiar los grandes proyectos académicos, científicos y tecnológicos (Arias de Greiff & Sánchez, 2006).

La creación de la carrera de biología, adscrita al Departamento de biología de la naciente Facultad de Ciencias en 1965. Esta reforma curricular fortaleció una gran alianza entre el Instituto de Ciencias Naturales y el Departamento de biología, lo que permitió establecer nuevas directrices en la formación de los biólogos del país (Mora-Osejo, 1990).

En 1966, con ocasión de la celebración de los 143 años de la fundación de Cundinamarca, se inició la publicación de la serie Catálogo Ilustrado de las Plantas de Cundinamarca. El mismo año se inició la ejecución del proyecto Geología del Cuaternario y Palinología de Colombia en cooperación con la Fundación Neerlandesa para el Fomento de Estudios Tropicales. En este proyecto numerosos investigadores colombianos y holandeses estudiaron las culturas pre-cerámicas y los bosques de la cordillera Oriental colombiana. Por esta misma época el Instituto Roberto Franco (hoy Estación Biológica Roberto Franco, sede Villavicencio) se integró orgánicamente al Instituto de Ciencias Naturales.

En 1970, siendo director el profesor y orquideólogo Álvaro Fernández Pérez (1920-1994), el Instituto estaba conformado por las secciones de botánica, zoología, antropología y geología. La sección de botánica comprendía el Herbario Nacional Colombiano (COL) y la de zoología contaba con las unidades de entomología, ictiología, herpetología, ornitología y mastozología. En la década de los 70 se iniciaron los primeros procesos de sistematización de datos en las colecciones del Herbario Nacional Colombiano (COL) (Forero, 1976a); en 1976 se selló el ejemplar botánico número 150.000 del Herbario (Forero, 1976b) y se convocó la primera reunión de curadores de los herbarios del país que dio origen a la creación de la Asociación Colombiana de Herbarios (ACH).

En 1977, la Universidad Nacional (Instituto de Ciencias Naturales) y la Universidad de Ámsterdam firmaron un convenio para la ejecución del proyecto ECOANDES de estudio de los ecosistemas de montaña, su distribución espacial, su dinámica y su historia. Como producto de este convenio se hicieron importantes expediciones y se publicaron los primeros volúmenes de la serie Estudios en Ecosistemas Tropandinos.

Un hecho de importancia docente en los programas académicos de biología del país fue la implementación en 1975 de las salidas de campo en los cursos regulares de taxonomía vegetal y animal, las cuales comprendían jornadas de campo de 12 a 15 días durante las cuales los estudiantes se formaban en el conocimiento de los distintos grupos de plantas y animales y, en una sinergia entre la docencia y la investigación, inventariaban la flora y la fauna de la región visitada. El desarrollo exitoso de estas actividades académicas se reflejó en la formación de varias cohortes de biólogos con orientación hacia la taxonomía y la sistemática.

En 1978 el Instituto recibió la Orden de Boyacá por sus aportes a la ciencia colombiana y en este mismo año presentó a la Universidad Nacional de Colombia el Programa Flora de Colombia bajo la dirección del botánico Luis Eduardo Mora Osejo, quien ocupaba el cargo de jefe de la sección de botánica. El objetivo del programa era describir en varios volúmenes la riqueza florística del país (**Mora-Osejo**, 1978; 1984); los dos primeros volúmenes se publicaron en 1983.

El Instituto de Ciencias Naturales y su contribución al conocimiento de la biodiversidad y su conservación en el país (1980-2019)

Hacia finales del siglo XX los conocimientos sobre la historia natural en el mundo permearon las ciencias de la vida a través de múltiples disciplinas, algunas con cierta tradición, como la sistemática, la biología evolutiva y la biogeografía, en las cuales prevalecía el pensamiento darwiniano. Otras disciplinas como la biología molecular, la biología de la conservación, la biología experimental, la genómica y la modelación computacional vinieron a contribuir a esta “nueva historia natural” (**Tewksbury, et al.**, 2014).

En el escenario actual de redes de conocimiento y ciencias de la complejidad, el Instituto de Ciencias Naturales continúa siendo una institución generadora de conocimiento sobre la biota y la conservación de la biodiversidad del país. Siete factores estimularon un progreso institucional significativo en los últimos 30 años (**Amat-García**, 2006; **Amat-García, et al.**, 2015).

El reconocimiento de Colombia como uno de los diez países megadiversos del planeta según la UNESCO-PNUMA (1991), lo que permitió que los países con esta condición revisaran el estado de sus programas de inventario biológico.

El manifiesto de la comunidad científica mundial preocupada por la aceleración de los procesos de extinción de especies y la destrucción de sus hábitats naturales (**Wilson**, 1988), el cual influyó en la orientación de la investigación ecológica en los casos de extinción plantas y animales y el desarrollo urgente de planes de conservación en países con gran diversidad y vulnerabilidad como Colombia.

La participación de Colombia en el Convenio de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica (CDB) de 1992, el cual constituyó el primer acuerdo mundial que abordaba todos los aspectos de la diversidad biológica, incluidas las especies. Mediante la Ley 164 de 1994 el gobierno nacional ratificó su voluntad de conocer, conservar y usar de manera sostenible las especies.

La formulación de una política nacional en biodiversidad (1997) aprobada por el Consejo Nacional Ambiental con el propósito de reducir los procesos y actividades que ocasionan el deterioro de la biodiversidad (**Instituto Alexander von Humboldt**, 1997).

La nueva reforma académica de la Universidad Nacional (1990-1997) bajo el liderazgo de los rectores Antanas Mockus y Guillermo Páramo, con la cual se reorientaron los programas académicos que acusaban falta de coherencia, enciclopedismo, desactualización y descontextualización en el ámbito internacional (**Cubillos, et al.**, 2019).

Creación de la maestría en sistemática en las áreas de botánica y zoología gracias al Acuerdo 24 del 11 de febrero de 1981 expedido por el Consejo Superior Universitario. Este acontecimiento fortaleció el perfeccionamiento académico de los futuros biólogos elevando el nivel de los profesores de sistemática vegetal y animal de todo el país que, hasta entonces, eran personas con título principalmente de biólogo, ingeniero agrónomo o ingeniero forestal, pero que no habían tenido la oportunidad de recibir educación a nivel de posgrado (**Linares, 2001**). También elevó la capacidad investigativa en los programas flora y fauna de Colombia, aunque este último solo se institucionalizó formalmente hasta 1995 con la publicación de un primer volumen.

El Instituto de Ciencias Naturales se convierte en organismo consultor del naciente Ministerio de Ambiente creado por la Ley 99 de 1993 mediante la cual "...se crea el Ministerio del Medio Ambiente, se reordena el sector público encargado de la gestión del medio ambiente y los recursos naturales renovables y se reorganiza el Sistema Nacional Ambiental (SINA)". La Universidad Nacional se constituyó como miembro de las juntas directivas del Instituto de Estudios Ambientales (IDEAM), del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andreis (INVEMAR), del Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI). En este sentido el artículo 16 de la Ley 99 reza: "El Ministerio del Medio Ambiente contará con el apoyo científico y técnico de los centros de investigación ambientales y de las Universidades públicas y privadas y en especial del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional y de la Universidad de la Amazonia".

En 1998, el Instituto de Ciencias Naturales es designado como autoridad científica de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), capítulo Colombia. En 1999 lideró conjuntamente con el Instituto Alexander von Humboldt la Agenda de Investigación Sistemática para el siglo XXI, un importante documento programático para el diagnóstico de la sistemática en Colombia y para proponer estrategias de investigación y conservación biológica (**Asociación Colombiana de Herbarios, et al., 1999**). En estos años el Instituto convocó a toda la comunidad científica nacional en el campo de la biología a realizar los primeros congresos nacionales de botánica y zoología.

En cuanto a las colecciones del Instituto de Ciencias Naturales, éstas crecieron considerablemente en las décadas de los 90 y del 2000. Es así como al final de este período ya se contaba con aproximadamente 500.000 ejemplares en el COL, 800.000 en las colecciones zoológicas y más de 100.000 vestigios en las colecciones arqueológicas, crecimiento que permite seguir catalogándolas como las más documentadas del país y como instrumentos estratégicos para el desarrollo misional de la universidad y fundamentado de la investigación, la docencia y la extensión (**Linares, 2001**).

Desde 1992 el Instituto de Ciencias Naturales ya se ocupaba de elaborar las primeras listas de especies colombianas en riesgo de extinción, entre ellas las tortugas (*Testudinata*) (**Castaño-Mora, 1992**). En 1996, por iniciativa del Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial y el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt se planteó la necesidad de preparar y publicar la serie de Libros Rojos de especies amenazadas de Colombia; para tal efecto, se convocó a varias entidades, entre ellas al Instituto de Ciencias Naturales, para emprender un plan nacional para generar todo el conocimiento posible sobre cuáles y cuántas especies de plantas y animales estaban amenazadas de extinción y los factores responsables de su condición según la metodología propuesta por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

En 1999 se dio inicio formal a la serie de Libros Rojo de especies amenazadas de Colombia y al año siguiente se conformó un comité interinstitucional con la participación de nueve profesores del Instituto de Ciencias Naturales para establecer los mecanismos de participación de los especialistas en los diferentes grupos biológicos. El Comité coordinador de categorización de especies silvestres amenazadas de Colombia se conformó reglamentariamente mediante la Resolución 12318 del 11 de noviembre de 2003 del Ministerio

de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial. Se aspira a que con esta lista de especies la sociedad colombiana, especialmente las autoridades ambientales, conozca y proteja el patrimonio biológico del país. En resumen, se han relacionado 112 especies de aves, 43 de mamíferos, 35 de reptiles, 55 de anfibios, 38 de peces marinos, 43 de peces de agua dulce, unas 80 especies de invertebrados (terrestres y marinos) y aproximadamente 500 especies de plantas. Hasta la fecha se han publicado 18 volúmenes de la serie, con participación activa de 11 profesores del instituto.

Como una de las iniciativas en la tarea misional de la Universidad Nacional, el Instituto creó en el 2000 el programa de doctorado en ciencias-biología, con las líneas de investigación en taxonomía y sistemática, biodiversidad y conservación y paleoecología y paleoecología, el cual ha sido distinguido por Colciencias durante tres años consecutivos, 1998, 1999 y 2000, como centro investigación de excelencia en la categoría A y el mejor equipo nacional de investigación en taxonomía y sistemática (Amat-García, *et al.*, 2015).

A principios del año 2000 el Instituto de Ciencias Naturales quedó adscrito a la Facultad de Ciencias con una planta de 34 docentes, un director, un coordinador de docencia, un coordinador de investigación y un coordinador de extensión. Al programa de taxonomía y sistemática se adicionaron los de biodiversidad y conservación, manejo y conservación de vida silvestre y palinología y paleoecología. Estos programas estratégicos se relacionaban transversalmente con los catorce grupos de investigación estructurados según los lineamientos estipulados a nivel nacional por el Fondo de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación Francisco José de Caldas (Colciencias). En segundo lugar, los programas del Instituto tuvieron un impacto significativo en la docencia, ya que con la reestructuración del plan de estudios de la carrera de biología las responsabilidades docentes del área curricular se comparten equitativamente con el Departamento de biología. Durante el período 2000-2005 un promedio anual de 60 estudiantes de la carrera de biología realizaba sus trabajos y tesis de grado bajo la orientación de docentes del Instituto.

Estudio y divulgación del patrimonio natural de Colombia

En 1983, con los antecedentes de la creación de la revista *Caldasia* en 1940 (41 números publicados), se propuso la creación de la serie *Flora de Colombia* con el objetivo de dar a conocer al país su riqueza florística, en cuyo marco se publicaron los dos primeros números (Mora-Osejo, 1984). En la actualidad se han publicado 31 volúmenes, casi todos con versiones digitales en línea. En el mismo año apareció una tercera serie editorial llamada José Jerónimo Triana, en homenaje al botánico colombiano más importante cuyos duplicados de colecciones botánicas constituyeron la base para iniciar el Herbario Nacional Colombiano (COL). En esta serie editorial se dan a conocer múltiples temáticas de la biología, especialmente de ecología, sistemática y conservación biológica, y hoy cuenta con 34 números publicados. Una cuarta serie editorial se creó en 1995, luego de la institucionalización del Programa Fauna de Colombia, que se dio a la tarea de divulgar la información sobre la fauna del país a través de la publicación de la serie *Monografías de Fauna de Colombia*, de la cual hoy se han publicado seis números.

Como una continuación a los programas de investigación biológica regionales del Profesor Thomas van der Hammen, desarrollados entre 1970 y 1990, se creó en 1995 una quinta serie editorial, conocida como *Colombia Diversidad Biótica*, bajo la dirección de J. O. Rangel-Ch., en cuyos 20 números publicados se han dado a conocer aspectos faunísticos, florísticos, de vegetación y ecosistémicos de las regiones naturales de Colombia.

Las Guías de Campo del Instituto de Ciencias Naturales iniciaron su edición en marzo de 2007. En la sexta serie se han publicado inventarios locales y regionales de especies de fauna y flora con información biológica básica sobre su taxonomía, ecología y distribución geográfica; se han editado en esta serie 25 números. Estas guías de campo, complementadas con las Miniguías del Instituto de Ciencias Naturales (38 números publicados), han permitido divulgar el conocimiento biológico en importantes sectores de la sociedad como las autoridades ambientales locales y regionales, los docentes de secundaria y los estudiosos de la flora y la fauna colombianas.

En los últimos diez años el Instituto de Ciencias Naturales ha generado un conjunto de conocimientos específicos requeridos por el gobierno nacional para trazar lineamientos de gestión en políticas ambientales, principalmente sobre biodiversidad, conservación, ecosistemas y cambio climático. Las modalidades de esta participación están inscritas, bajo el modelo de extensión universitaria, como diagnósticos, consultorías, proyectos o certificaciones de determinación taxonómica.

El actual personal docente de planta del Instituto de Ciencias Naturales está conformado por 32 profesores inscritos en 11 grupos de investigación categorizados por Colciencias. Como indicadores de productividad académica del grupo, en el período 2014-2018 se destaca la dirección de 92 trabajos de grado (pregrado), 54 tesis de maestría y 11 tesis doctorales; los integrantes del grupo ejecutaron 106 proyectos de investigación; publicaron 201 artículos científicos en 106 revistas internacionales indexadas "y en 95 capítulos de libro"; asimismo editaron 15 libros (**Rangel & Gantiva, 2019**).

Conclusiones

El Instituto de Ciencias Naturales merece ser considerado como uno de los artífices en la génesis del conocimiento sobre la historia natural y la biodiversidad del país y en la formación de científicos en el campo de la biología durante el siglo XX por las siguientes razones.

Posee nexos históricos, científicos y patrimoniales con cuatro importantes empresas científicas del siglo XIX: la Expedición Botánica (1793-1816), la Misión Zea (1822-1826), la Comisión Corográfica (1850-1859) y la Escuela de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (1867-1902).

2) Ha contado históricamente con el abrigo institucional de la Universidad Nacional de Colombia desde su fundación (1867). Se constituyó en una de las primeras instituciones en iniciar los planes de inventario de la flora y fauna colombianas.

3) Implementó en el país los primeros planes curriculares en las carreras profesionales en el campo de la biología y otras áreas afines. Dos hitos en el desarrollo de las ciencias naturales en Colombia en el siglo XX son la creación de la carrera de ciencias naturales en 1959 y la creación del programa de posgrado (maestría) en sistemática en 1981, ambos con la intención de formar biólogos especializados en taxonomía y biodiversidad.

4) Ha creado importantes medios de divulgación científica especializada, como la revista *Caldasia*, que desde 1940 dan a conocer los estudios sobre la flora, la fauna, conservación y los ecosistemas colombianos de todos los investigadores nacionales y extranjeros.

Agradecimientos

Agradecemos muy sinceramente al Dr. Enrique Forero, a la Dra. Elizabeth Castañeda y a los evaluadores anónimos que revisaron críticamente la versión inicial del manuscrito, lo que mejoró su calidad de manera significativa. Esta nota histórica está dedicada a todas las generaciones de investigadores y docentes del Instituto de Ciencias Naturales, que desde 1936, han transmitido con dedicación y entusiasmo el compromiso de ser investigadores, formadores de biólogos y multiplicadores de la importancia de la biodiversidad colombiana.

Material suplementario

Hemos incluido en este estudio, a manera de cierre, algunos elementos que forman parte del patrimonio del Instituto en sus orígenes, aspectos de su primera sede con testimonios gráficos de su acontecer científico en aquella época (**Figura 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2812>); la convergencia de acontecimientos, personajes y logros con la progresión histórica en líneas de tiempo (**Figuras 2S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2813> **3S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2814> y **4S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2815>); la imagen institucional expresada en portadas editoriales (**Figura 5S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2816>) y el actual equipo docente de planta (parcial) (**Figura 6S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2817>).

Figura 1S. Estampas del Instituto de Ciencias Naturales. **a)** Primera sede, Ciudad Universitaria (1938). **b)** Segunda sede, Ciudad Universitaria (1952). Los tres primeros directores, de izquierda a derecha: Lorenzo Uribe (1952-1958), Enrique Pérez Arbeláez (1936-1940) y Armando Dugand (1940-1952). **c)** Actividades en el Herbario Nacional Colombiano (1940). **d)** Actividades en la colección de entomología (1940) provenientes de importantes expediciones realizadas en la década de los 50. A diferencia de las colecciones botánica, ornitológica y entomológica, que fueron las primeras en desarrollarse, las colecciones de peces, mamíferos, anfibios y reptiles se iniciaron un lustro después de la fundación del Instituto (Amat-García, 2017). Ver la figura 1S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2812>

Figura 2S. Línea de tiempo (1936-1974) con acontecimientos y personajes de gran significado en el desarrollo del Instituto de Ciencias Naturales. Los recuadros corresponden a directores de la institución (Amat, *et al.*, 2011). Ver la figura 2S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2813>

Figura 3S. Línea de tiempo (1977-2010) con acontecimientos y personajes de gran significado en el desarrollo del Instituto de Ciencias Naturales. Los recuadros corresponden a directores de la institución (Amat, *et al.*, 2011). Ver la figura 3S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2814>

Figura 4S. Línea de tiempo (2010-2019) con hechos notables en el desarrollo del Instituto de Ciencias Naturales. Ver la figura 4S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2815>

Figura 5S. Contribución del Instituto de Ciencias Naturales a la conservación y manejo de la fauna y la flora colombianas. **a)** Portada de uno de los volúmenes de los Libros Rojos, dedicado a los cangrejos en peligro en Colombia (2015). **b)** Portada de la Guía para la identificación de especies de aves sometidas al tráfico ilegal en Colombia (2012). **c)** Plan de manejo y conservación de las palmas de Colombia. **d)** Plan de manejo y conservación de las orquídeas de Colombia. Ver la figura 5S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2816>

Figura 6S. Planta parcial de profesores (2019) del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Archivo ICN). 1) Andrés Cuervo. 2) Carlos Sarmiento. 3) Edgar Linares. 4) Germán Peña. 5) Alexis Jaramillo. 6) José Carmelo Murillo. 7) Martha Calderón. 8) Jaime Uribe. 9) Diego Giraldo. 10) Orlando Rangel. 11) Luis Carlos Jiménez. 12) Germán Amat. 13) John Lynch. 14) Julio Betancur. 15) Olga Montenegro. 16) Clara Inés Orozco. 17) Fernando Fernández. 18) Agustín Rudas. 19) Jaime Aguirre. 20) Gonzalo Andrade. 21) Iván Mojica. Ver la figura 6S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1096/2817>

Referencias

- Amat-García, G., Aguirre-Ceballos, J., J. Uribe. (2011). Retratos para un aniversario: evocando la historia, Instituto de Ciencias Naturales 75 años. Universidad Nacional de Colombia. 40 pp.
- Amat-García, G. (2017). Contribución de la Universidad Nacional a la Zoología en Colombia. En: Restrepo, Zea; Sánchez, C. H.: G. Silva. Naturaleza en Observación. Vol 1. Colección del Sesquicentenario. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 200-225.
- Amaya, J. A. (2005). Mutis, apóstol de Linneo: historia de la botánica en el virreinato de Nueva Granada (1760-1783). Instituto Colombiano de Antropología e Historia. Vol. 2. 1063 p.
- Arango, T. (1992). Enrique Pérez Arbeláez, su vida y su obra. Fondo FEN-Colombia. Bogotá. 110 p.
- Arias-de Greiff, J. & Sánchez, C. H. (2006). Antecedentes de la Facultad de Ciencias. En: Cubillos, G. (editor). Facultad de Ciencias: fundación y consolidación de comunidades científicas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 15-58.
- Asociación Colombiana de Herbarios, Instituto Alexander von Humboldt, Ministerio del Medio Ambiente, Departamento Nacional de Planeación. (1999). Biodiversidad Siglo XXI: Propuesta técnica para la formulación de un Plan de Acción Nacional en Biodiversidad. 254 p.
- Bateman, A. (1951). Las figuras de la Comisión Corográfica. Boletín de la Sociedad Geográfica (Academia de Ciencias Geográficas). 9 (2): 413-417.
- Cubillos, G., editor. (2006) Facultad de Ciencias: fundación y consolidación de comunidades científicas. Universidad Nacional. Bogotá. 412 pp.

- Cubillos, G., Amat, G., Betancourt, J., Greiffenstein, J., Portilla, G., Rodríguez, L., Sánchez, C.** (2019). Facultad de Ciencias. Educación, investigación y proyección social. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 264 pp.
- Díaz-Piedrahita, S.** (1997). La Botánica en Colombia, hechos notables en su desarrollo. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Enrique Pérez-Arbeláez. No 6. Santafé de Bogotá. 125 pp.
- Díaz-Piedrahita, S.** (1999). La Escuela de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (1867-1902). *Rev. Acad. Col. Cienc. Exac. Fis. y Nat.* **23** (suplemento especial): 513-525.
- Díaz-Piedrahita, S.** (2000). Carlos Cuervo Márquez, el botánico. *Rev. Acad. Col. Cienc. Exac. Fis. y Nat.* **24** (91): 247-254.
- Díaz-Piedrahita, S.** (2005). Una escuela y cuatro naturalistas del siglo XIX. Academia Colombiana de Historia. Biblioteca de Historia Natural. Volumen CLXIV. Bogotá. 326 pp.
- Díaz-Piedrahita, S. & Mejía-de Mesa, M.** (2010). Una etapa en el desarrollo de la Química en Colombia. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Luis Duque Gómez, No 2. Edición conjunta con el Consejo Profesional de Química. Bogotá. 326 pp.
- Farber, P.** (2000). Finding order in Nature. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 136 pp.
- Forero, E. & Pereira, F.** (1976a). EDR-IR in the National Herbarium of Colombia (COL). *Taxon.* **25** (1): 85-94.
- Forero, E.** (1976b). El Herbario Nacional Colombiano (COL). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Instituto de Ciencias Naturales. Museo de Historia Natural. Gobernación de Cundinamarca. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 24 pp.
- Forero, E.** (1977). Historia de la Botánica en Colombia. En: Enciclopedia de Colombia, Vol. IV: 347-360. Ed. Nueva Granada. Bogotá, D.C.
- Jara, V.** 1981. La Expedición Botánica de Mutis y la cultura hispánica. Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. Bogotá. pág. 105.
- Kuhn, T.** (1971). La estructura de las revoluciones científicas. Fondo de Cultura Económica. México. 178 pp.
- Linares, E.** (2001). Hitos históricos del Instituto de Ciencias Naturales. Inédito.
- Marquínez-Casas, X.** (2017). La naturaleza como laboratorio: influencia alemana en las ciencias biológicas. En: Restrepo, Zea; Sánchez, C. H.; G. Silva. *Naturaleza en Observación*. Vol 1. Colección del Sesquicentenario. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 22-54.
- Mora-Osejo, L. E.** (1978). Programa para la publicación de la obra, en varios volúmenes, Flora de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Mora-Osejo, L. E.** (1984). Flora de Colombia. Haloragáceas. Vol. 3. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Mora-Osejo, L. E.** (1990). Apuntamientos para la historia del departamento de Biología y el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Acad. Col. Cienc. Exac. Fis. y Nat.* **17** (67): 637-644.
- Ordoñez, J., Navarro, V., Sánchez Ron, J. M.** (2004). Historia de la ciencia. Espasa Calpe S.A. España. 564 pp.
- Parra-Osorio, C. & Díaz-Piedrahita, S.** (2016). Herbarios y Jardines botánicos: testimonios de nuestra biodiversidad. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Biblioteca José Jerónimo Triana, 32. 106 p.
- Pérez-Arbeláez, E.** (1965). José Celestino Mutis y la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada. *Ciencia Interamericana.* **6** (6):1-4.
- Rangel-Ch., J. O. & Gantiva, C.** (2019). La participación en la formación académica y en la generación de conocimiento de los profesores del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). Publicación inédita. 23 pgs.
- Restrepo, F., O., Arboleda, L. C., Bejarano, J.** (1993). Historia Social de la Ciencia en Colombia. Tomo III. Historia Natural y Ciencias Agropecuarias. Colciencias. 459 pp.
- Restrepo, F., O.** (2009). El darwinismo en Colombia: visiones de la naturaleza y la sociedad. *Acta biol. Colomb.* **14S**: 23-40.
- Soriano Ll., A.** (1968). Itinerario de la Comisión Corográfica y otros escritos. Universidad Nacional de Colombia. Imprenta Nacional. Bogotá. 185 pp.
- Tewksbury, J., Anderson, J., Bakker, J., T. Billo.** 2014. Natural History's Place in Science and Society. *BioScience.* **64** (4): 300-310.
- UNESCO-Pnuma.** (1991). Una Ética Ambiental Universal. En: *Contacto.* **XVI** (2): 231.
- Wilson, E. O.,** Editor. (1988). Biodiversity. National Academy Press. Washington, D. C. 521 pp.

Artículo original

Propagación de *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis* y *Espeletia killipii* en condiciones de invernadero

Propagation of *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis*, and *Espeletia killipii* in greenhouse conditions

✉ Carolina Mancipe-Murillo

Línea de investigación en Especies y Propagación, Subdirección Científica, Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Bogotá, D.C., Colombia

Resumen

Colombia cuenta con ecosistemas estratégicos, entre ellos los páramos ubicados por encima de los 3.000 ms.n.m. Estos ecosistemas se encuentran en riesgo debido a las actividades humanas. Con el fin de contribuir a la conservación de los frailejones, plantas características de los páramos, se generaron protocolos de propagación de *Espeletiopsis corymbosa* (páramo de Guacheneque), *Espeletia summapacis* y *Espeletia killipii* (páramo de Sumapaz) y *Espeletia barclayana* (páramo El Tablazo). Se hizo la descripción morfológica en diez semillas, la prueba de tetrazolio en cuatro réplicas de 50 semillas con corte en la testa y adición de tetrazolio al 1 % a 40 °C durante 24 horas, y la prueba de germinación en 30 semillas por réplica en condiciones de invernadero con la aplicación de cuatro tratamientos pregerminativos (1. control; 2. inmersión en ácido giberélico; 3. estratificación fría, y 4. estratificación fría e inmersión en ácido giberélico y un sustrato diferente en *E. barclayana*). Se evaluó el crecimiento y la supervivencia en 30 plántulas. Las especies presentaron semillas con características morfológicas similares. El porcentaje de semillas vacías fue de 39 a 65 % y la germinación inferior al 48 %. La viabilidad con tetrazolio fue mayor a la encontrada con la prueba de germinación en todas las especies, lo que indicaría dormancia fisiológica, aunque con los tratamientos evaluados no fue posible corroborar esto. En cuatro meses de evaluación el crecimiento promedio de las especies fue de 0,65 cm, con una supervivencia superior al 67 %, lo que respalda la propagación en condiciones de invernadero.

Palabras clave: Conservación; Frailejón; Germinación; Páramo; Propagación; Viabilidad de semillas.

Abstract

Colombia has strategic ecosystems, among them the páramos, which are located above 3,500 m.a.s.l. Due to human activities, these ecosystems are at risk. To contribute to the conservation of frailejones, one of their characteristic plants, I worked on the generation of propagation protocols of *Espeletiopsis corymbosa* (Guacheneque páramo), *Espeletia summapacis* and *Espeletia killipii* (Sumapaz páramo), and *Espeletia barclayana* (El Tablazo páramo). The morphological description was done in ten seeds, the tetrazolium test in four replicates of 50 seeds with cuts in the seminal cover adding 1% tetrazolium at 40 °C for 24 hours, and the germination test in 30 seeds per replication in greenhouse conditions using four pre-germinative treatments (none, immersion in gibberellins, cold stratification for one month, cold stratification plus gibberellins, and in *E. barclayana* sowing in a different substrate). The growth and survival were evaluated in 30 seedlings. The species seeds had similar characteristics. Empty seeds were found in 39 to 65% of cases and germination was less than 48%. The viability with tetrazolium was greater than with the germination test in all species, which may indicate physiological dormancy. However, this was not corroborated with the treatments under evaluation. During the four months of evaluation, average species growth was 0.65 cm and survival was over 67%, which favors the propagation in greenhouse conditions.

Keywords: Conservation; Frailejón; Germination; Páramo; Propagation; Viability of seeds.

Citación: Mancipe-Murillo C.
Propagación de *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis* y *Espeletia killipii* en condiciones de invernadero. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):780-793, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1105>

Editor: Elizabeth Castañeda

Correspondencia:
Carolina Mancipe-Murillo;
carolinamancipem@gmail.com

Recibido: 28 de noviembre de 2019

Aceptado: 1 de junio de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Introducción

Colombia es una de las cinco naciones megadiversas del mundo. En su superficie continental de 114,17 millones de hectáreas, es decir, el 0,77 % del área terrestre del mundo, alberga aproximadamente el 10 % de las especies vegetales y animales conocidas (Valencia, *et al.*, 2010), y ecosistemas estratégicos, entre ellos, los páramos. Los ecosistemas estratégicos son “aquellas áreas dentro del territorio que, gracias a su composición biológica, características físicas, estructurales y procesos ecológicos, proveen bienes y servicios ambientales imprescindibles e insustituibles para el desarrollo sostenible y armónico de la sociedad”. El ecosistema de páramo se encuentra en el límite superior de los bosques altoandinos, con una altitud que, según la ubicación geográfica, puede estar por encima de los 3.000 m s.n.m. (Pedraza-Peñalosa, *et al.*, 2004; Chaparro & Chaparro, 2012).

Los ecosistemas de páramo se consideran únicos. En todo el continente solo Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Costa Rica cuentan con páramos tropicales ubicados casi todos en la cordillera de los Andes, salvo los de la Sierra Nevada de Santa Marta y los de Costa Rica. Además de la vegetación que los caracteriza, poseen condiciones climáticas, de suelos y de altitud que los diferencian y hacen de ellos conjuntos de condiciones ambientales singulares (Hofstede, *et al.*, 2003; Morales, *et al.*, 2007; Buytaert, *et al.*, 2006).

Se estima que el área cubierta por los páramos fluctúa entre 35.000 y 77.000 km² (Buytaert, *et al.*, 2006); su flora, única y característica, es el resultado de complejos procesos de evolución e incluye 3.399 especies de plantas vasculares descritas, de las cuales la gran mayoría es endémica, lo que convierte a los páramos en uno de los puntos calientes de biodiversidad (*mini-hotspots*) (Buytaert, *et al.*, 2006; Londoño, *et al.*, 2014). Las especies están adaptadas a las condiciones climáticas de baja presión atmosférica, intensa radiación y efectos de secado del viento (Buytaert, *et al.*, 2006).

En muchos de estos lugares hay una mayor probabilidad de extinción de especies, lo que se atribuye a causas como el cambio climático, el aumento en la demanda de recursos naturales, la ampliación de la frontera agrícola (Reed, *et al.*, 2011), la contaminación industrial, la deforestación, la pérdida de la diversidad genética, la erosión del suelo (Mohan, 2011) y, en ocasiones, el reducido número de individuos de una población o de las poblaciones de una especie y su distribución restringida (González-Benito & Martín, 2011). De ahí que la estrategia mundial para la conservación de plantas firmada por más de 180 países en el 2002 plantee frenar esta pérdida mediante la comprensión, la conservación de la diversidad vegetal y la promoción del uso sostenible con técnicas de conservación en campo y en laboratorio (*ex situ*) (Heywood & Dulloo, 2005). Esto último es importante en el caso de las especies con dificultades de reproducción, cuyas semillas son recalcitrantes o se pueden reproducir de forma vegetativa (Reed, *et al.*, 2011; Mohan, 2011). Los frailejones son especies predominantes en los páramos que presentan un marcado endemismo relacionado, probablemente, con el hecho de que sus semillas, a diferencia de otras asteráceas, no tienen los paraguas que les permiten ser esparcidas por el viento, por lo que su distribución es más restringida (Morales, *et al.*, 2007). Además, a pesar de su importancia, sus poblaciones se están viendo afectadas principalmente por actividades humanas. En este contexto, y con el fin de contribuir a su conservación, se hicieron ensayos para generar protocolos de propagación de *Espeletia barclayana*, *Espeletia summapacis*, *Espeletia killipii* y *Espeletiopsis corymbosa* bajo condiciones de invernadero, sobre todo teniendo en cuenta que esta última especie se encuentra amenazada de extinción (Avila, *et al.*, 2020).

Materiales y métodos

Recolección del material vegetal

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en tres páramos de Colombia. En el 2017 se recolectaron frutos de *E. corymbosa* en el páramo de Guacheneque (municipio de Villapinzón, Cundinamarca; N5°12.552', O73°34.063', 3.281 m s.n.m, voucher de herbario CISH 353); en el 2018 se recolectaron semillas de *E. summapacis* y *E. killipii*

en el páramo de Sumapaz (Bogotá, D.C.; N4°16.214', O74°12.1603', 3866 m s.n.m.; CIBS 817 y SLC 209), y en el 2019 se recolectó *E. barclayana* en el páramo El Tablazo (Subachoque, Cundinamarca; N5°00 28.2, O74° 12 17.4; 3582 m s.n.m.; CIBS 343). Se verificó que las semillas tuvieran madurez fisiológica a partir del color y la dureza de la testa. Se recolectó material de por lo menos 20 individuos por especie con condiciones fitosanitarias adecuadas. La taxonomía de cada especie se verificó y los especímenes se ingresaron al Herbario del Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis” (JBB). Las semillas se transportaron el mismo día de su recolección al Laboratorio de Conservación de Semillas del JBB y se limpiaron separándolas de las sinflorescencias. Se verificó la presencia de embrión en 100 semillas por especie mediante inspección con un estereoscopio Motic® SMZ-168 (Hong Kong, China). Los ensayos de germinación se hicieron en el año de recolección de las semillas con material vegetal fresco.

Descripción morfológica de las semillas

La descripción interna y la externa se hizo en 10 semillas y embriones de cada especie. Para las medidas se tuvieron en cuenta el largo, el ancho y las características de la testa, el endospermo y el embrión. Las medidas se tomaron con ayuda del programa Motic® Images Plus 3.0 (China). La descripción morfológica se hizo con base en Martin (1946) y Niembro (1988).

Prueba de tetrazolio

La prueba de tetrazolio se hizo en cuatro réplicas de 50 semillas, excepto en *E. barclayana*, en la que cada réplica fue de 25 semillas. A las semillas se les rompió la testa con una cuchilla para la imbibición durante 24 horas; seguidamente, se sumergieron en condiciones de oscuridad en una solución de 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolio al 1 % durante 24 horas a 40 °C en un horno de secado Binder ED53-UL (Tuttlingen, Alemania) (Mancipe-Murillo, *et al.*, 2018). Una vez completado el tiempo, las semillas se enjuagaron con agua y se evaluaron en un estereoscopio Motic® SMZ-171 (Hong Kong). Las semillas se consideraron viables cuando la zona radicular y los cotiledones presentaron color rosa; se tuvo en cuenta la tinción en la radícula y los cotiledones, pues si el embrión presenta una tinción no homogénea puede significar menor vigor, aunque no ausencia de viabilidad (Da Silva, *et al.*, 2012), en tanto que el color rosa claro no homogéneo en la radícula o la ausencia de coloración de los embriones indica que no es viable.

Prueba de germinación

Las pruebas de germinación se hicieron con cuatro réplicas de 30 semillas en cada tratamiento aplicado. Se hizo una prueba piloto en *E. corymbosa* aplicando tratamientos pregerminativos: control; aplicación de giberelinas GA₃ con una concentración de 200, 300 y 400 ppm; adición de giberelinas siguiendo protocolos de otros investigadores para la propagación *in vitro* con estas hormonas (Bohórquez-Quintero, *et al.*, 2016; Araque-Barrera, *et al.*, 2016) mediante la imbibición de las semillas en las giberelinas durante 24 horas para su posterior siembra en un sustrato compuesto por tierra, turba y cascarilla en proporción de 60:20:20. Dado que el tratamiento de inmersión en giberelinas a 400 ppm fue el mejor tratamiento en esta especie, se aplicó también en *E. summapacis*, *E. killipii* y *E. barclayana*, es decir que en estas se aplicaron los tratamientos de control, 400 ppm de GA₃, estratificación fría por un mes y estratificación fría por un mes seguida de 400 ppm de GA₃. La estratificación se hizo durante un mes en un cuarto frío a 4°C y en cajas de Petri con doble papel de filtro, el cual se mantuvo húmedo; una vez cumplido el tiempo, las semillas se sembraron bajo condiciones de invernadero en sustrato. En el caso de *E. barclayana* se incluyó un tratamiento adicional en el que se cambió el sustrato por virutas de coco (chip de coco) y turba en proporción de 70:30; en este tratamiento las semillas se sembraron sin aplicar tratamientos pregerminativos. Las bandejas se mantuvieron en condiciones de invernadero con un fotoperiodo de 12 horas, temperatura media de 17 °C, máxima de 26 ° y mínima de 13 °C durante el día y de 11 °C y 19 °C durante la noche, y

una humedad relativa promedio de 74 % con una máxima de 88 % y una mínima de 45,9 % en el día y de 89 % y 61 % en la noche, estos valores que se tomaron con un registrador de datos EBCHQ 94150 (China).

Las semillas se sembraron a una profundidad de 0,5 centímetros aproximadamente y se consideraron germinadas en el momento en que emergieron los cotiledones a través del sustrato (Villamil & García, 1998). La germinación se evaluó cada tercer día hasta que hubiera cesado por tres semanas consecutivas a partir de la germinación de la mayor parte de las semillas.

El porcentaje de germinación (PG) se calculó con base en el número de semillas con embrión y el tiempo medio de germinación (TMG) mediante la siguiente ecuación (Tompsett & Pritchard, 1998, Bewley, *et al.*, 2006, Ranal & Santana, 2006):

$$PG = (N/N_s) * 100 \quad TMG = \frac{\sum_{i=1}^k ni ti}{\sum_{i=1}^k ni},$$

donde N es el número de semillas germinadas y N_s el número total de semillas con embrión; ni es el número de semillas germinadas en la medida i ésima; ti es el tiempo en días en la medida i ésima y k es el tiempo total de germinación en días.

Para el cálculo se tuvo en cuenta el resultado de las pruebas de corte en cada especie, de manera que al número total de semillas por réplica se le restó el número de semillas vacías y con el resultado se calculó el porcentaje de germinación.

Comparación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación

El resultado del mejor tratamiento de la prueba de germinación se comparó con la prueba de tetrazolio en cada especie para determinar el número de semillas viables sin germinar.

Crecimiento y supervivencia

Con el fin de describir el comportamiento de las semillas después de su germinación, se registró el crecimiento semanal de las primeras 30 plántulas obtenidas por especie sin tener en cuenta el tratamiento aplicado; dado que los tratamientos se aplicaron para favorecer la germinación, se registró la altura, el número de hojas y la permanencia de los cotiledones durante cuatro meses. Las medidas se tomaron con un calibrador digital. La supervivencia se evaluó en otras 30 plántulas por especie una vez por mes durante cuatro meses.

Análisis estadístico

En cada conjunto de datos se evaluó el supuesto de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos que se comportaron de forma normal se analizaron con un ANOVA modelo I, balanceado y simple, para evaluar diferencias entre: 1) la morfometría de las semillas, y 2) la viabilidad con la prueba de tetrazolio entre las especies evaluadas. Para los datos no paramétrico se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, con el fin de evaluar si existían diferencias entre: 1) el porcentaje de germinación según el tratamiento pregerminativo utilizado en cada especie evaluada; 2) el tiempo medio de germinación entre las especies, y 3) el porcentaje de germinación y el de semillas viables según la prueba de tetrazolio para cada especie. En todos los análisis se utilizó un nivel de confianza del 95 % con el programa estadístico StatGraphics® Centurion XVI versión 16.1.11.

Resultados

Descripción morfológica de las semillas

Las semillas de las cuatro especies presentaban características similares. A nivel externo son de forma ovoide a piramidal, con una cubierta seminal lustrosa de consistencia papirácea, delgada y blanda, de color negro. En cuanto al tamaño, *E. summapacis* presentó las semillas más grandes y *E. barclayana* las más pequeñas. Las semillas presentaron diferencias en el largo ($F_{3,36}=71,01$; $p<0,05$) y en el ancho ($F_{3,36}=25,79$; $p<0,05$). A nivel interno, las semillas no tienen endospermo visible, los embriones se encuentran en la parte central, son de forma ovoide a piramidal, lisos, de color blanco y con cotiledones gruesos

y carnosos separados entre sí. En *E. summapacis* el embrión era el más grande y en *E. killipii*, el más pequeño (**Figura 1**). Se registraron diferencias significativas en el largo ($F_{3,36}=135,7$; $p<0,05$) y en el ancho ($F_{3,36}=26,22$; $p<0,05$) de los embriones (**Tabla 1**).

Prueba de tetrazolio

Se presentó tinción en todas las especies evaluadas. En *E. corymbosa* la tinción fue del 71 %, en *E. summapacis* de 76 %, en *E. killipii* de 88 % y en *E. barclayana* de 52 %. Se registraron diferencias significativas en la viabilidad de las semillas de las diferentes especies ($F_{3,12}=8,9$; $p<0,05$) (**Figura 1 y Figura 2**).

Prueba de germinación

Hubo un alto porcentaje de semillas vacías, con un porcentaje de embriones de 42,5 % en *E. corymbosa*, 34,9 % en *E. summapacis*, 37,3 % en *E. killipii* y 61 % en *E. barclayana*. *E. corymbosa* presentó la germinación más alta (48 %) con el tratamiento de 400 ppm de GA_3 , sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($K=5,53$; $p=0,13$). En el caso de *E. summapacis* y *E. killipii* hubo mayor germinación con el tratamiento de control, cuyos valores fueron 12,5 y 36,4 %, respectivamente; en estas especies tampoco se presentaron diferencias significativas en la germinación con los diferentes tratamientos ($K=0,05$; $p=0,99$ y $K=2,32$; $p=0,50$). *E. barclayana* registró la mayor germinación al sembrarse en sustrato de virutas de coco y turba (39 %), con diferencias significativas entre los tratamientos, siendo la siembra en este sustrato el tratamiento diferente ($K=13,03$; $p<0,05$) (**Figura 3**).

Por otra parte, el tiempo medio de germinación fue similar en tres de las especies y no hubo diferencias significativas en el tiempo medio de germinación (TMG) de cada especie: 33 días en *E. corymbosa* ($K=0,90$; $p=0,82$), 30 días en *E. killipii* ($K=1,80$; $p=0,61$) y 32 días en *E. barclayana* ($K=5,59$; $p=0,23$). En *E. summapacis* el TMG fue de nueve días ($K=0,08$; $p=0,99$).

Comparación entre la prueba de tetrazolio y la prueba de germinación

En la comparación se tuvo en cuenta el tratamiento que arrojó los mejores resultados en la prueba de germinación. En todas las especies se presentó una mayor viabilidad con la prueba de tetrazolio, con diferencias significativas en las pruebas ($p<0,05$) excepto en *E. corymbosa*, la cual no las registró ($K=3,0$; $p=0,08$) (**Figura 4**).

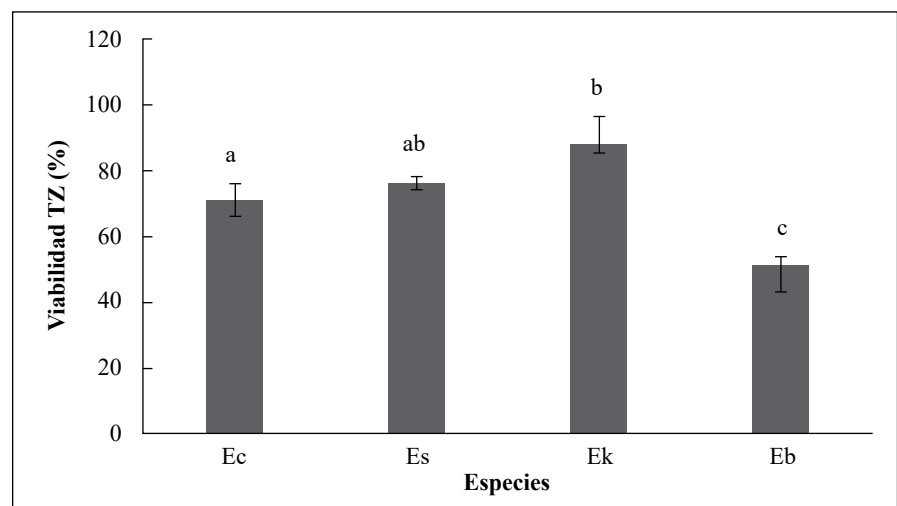


Figura 1. Viabilidad evaluada con la prueba de tetrazolio en cuatro especies de frailejones: *E. corymbosa* (Ec), *E. summapacis* (Es), *E. killipii* (Ek), y *E. barclayana* (Eb). Las letras diferentes indican que se presentaron diferencias significativas entre las pruebas (Kruskal-Wallis; $p<0,05$). Las verticales indican el error estándar.

Tabla 1. Medidas de la morfología de las semillas de *E. corymbosa*, *E. summapacis*, *E. killipii*, y *E. barclayana*. Las letras diferentes indican que se presentaron diferencias significativas entre las especies en cada medida (Kruskall-Wallis; $p < 0,05$). SE: error estándar, (n=10)

Especies	Semilla		Embrión	
	Largo (cm ±SE)	Ancho (cm ±SE)	Largo (cm ±SE)	Ancho (cm ±SE)
<i>Espeletiopsis corymbosa</i>	2,39±0,10 a	1,17±0,04 a	1,31±0,07 a	0,78±0,05 a
<i>Espeletia summapacis</i>	3,95 ±0,13 b	1,40±0,05 b	2,75±0,09 b	1,03±0,05 b
<i>Espeletia killipii</i>	3,20±0,11 c	1,31±0,05 bc	1,13±0,04 c	0,50±0,02 b
<i>Espeletia barclayana</i>	2,06±0,04 d	0,85±0,04 c	2,07±0,04 d	0,82±0,04 c

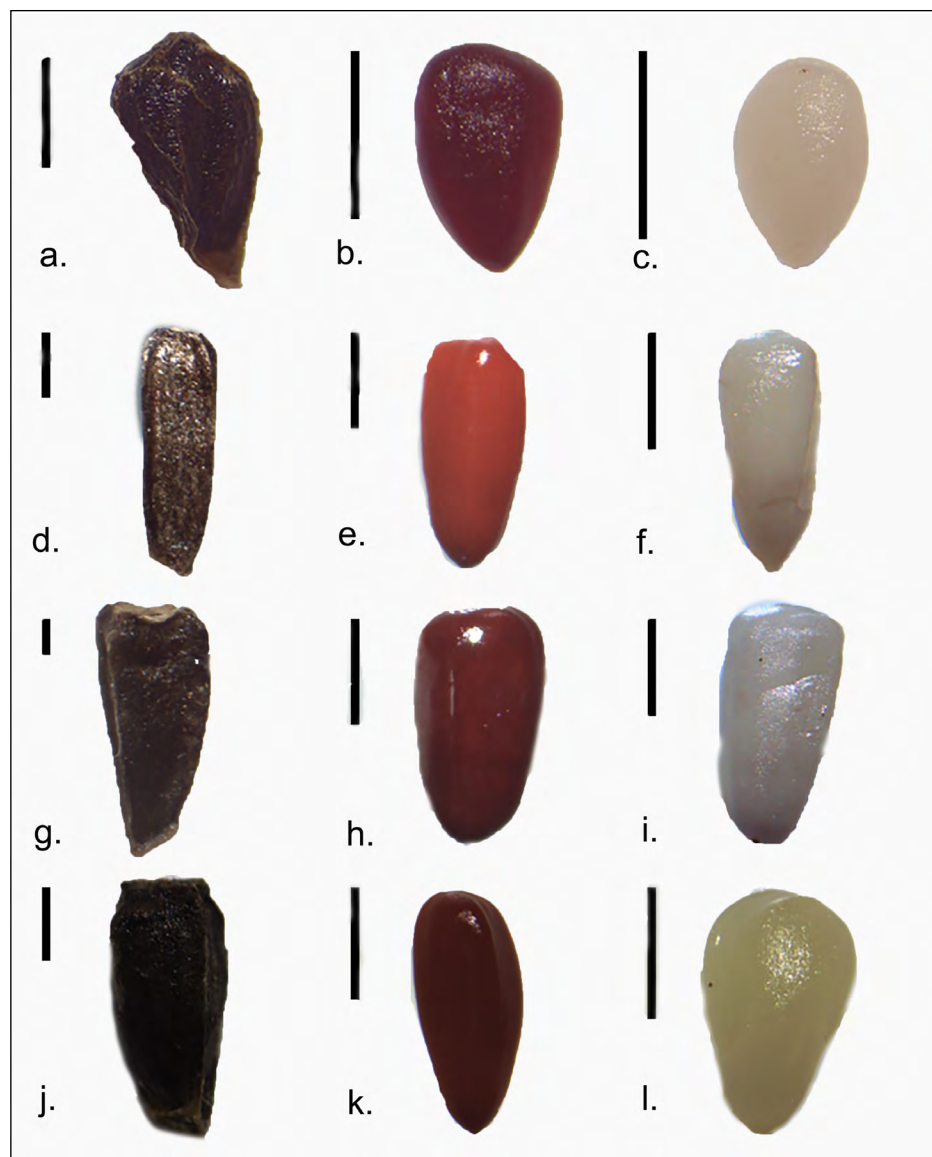


Figura 2. Prueba de viabilidad con tetrazolio. Para cada especie se presenta la semilla, el embrión viable y el embrión no viable. **a, b, c.** *E. corymbosa*; **d, e, f.** *E. summapacis*; **g, h, i.** *E. killipii*; **j, k, l.** *E. barclayana*. Escala=1mm

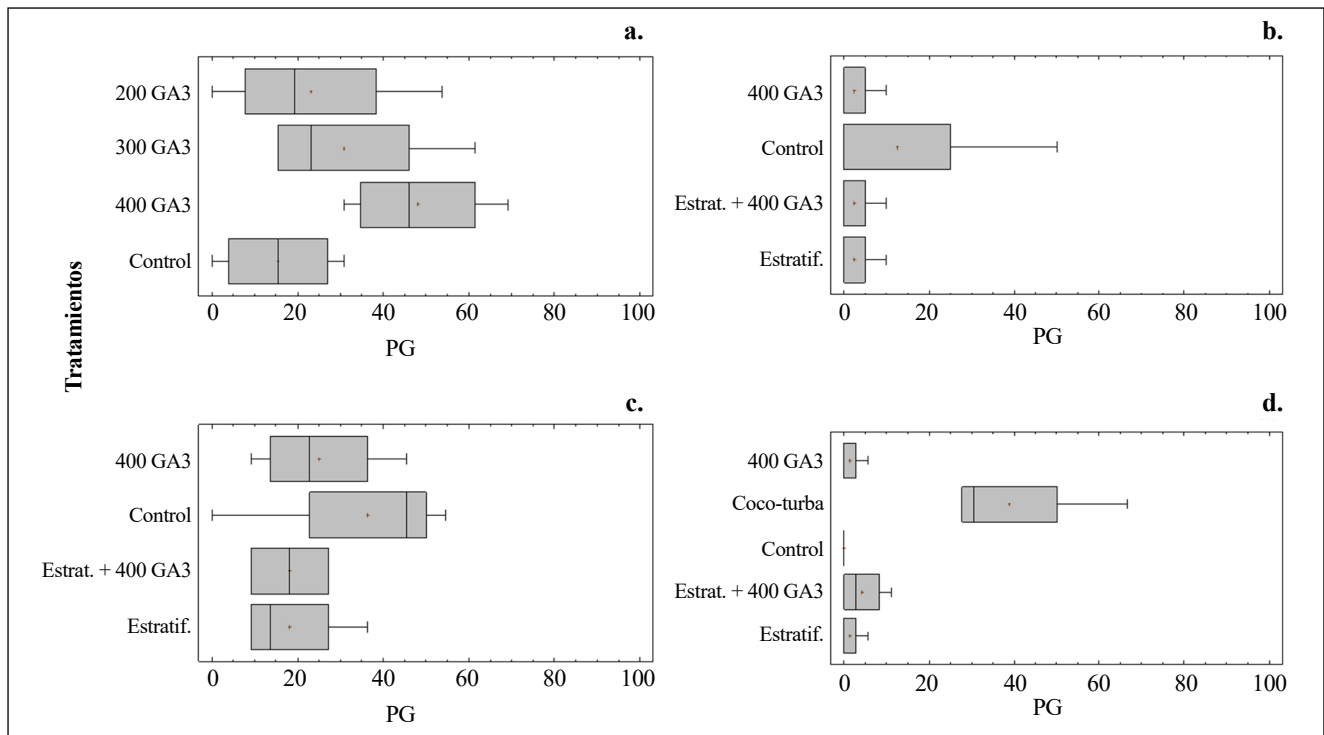


Figura 3. Porcentaje de germinación (PG) de **a.** *E. corymbosa*, **b.** *E. summapacis*, **c.** *E. killipii*, y **d.** *E. barclayana*, sembradas en sustrato bajo condiciones de invernadero. Las especies se sembraron en sustrato compuesto por tierra, turba y cascarilla en proporción de 60:20:20. En *E. barclayana* se incluyó la siembra en un sustrato compuesto por viruta de coco y turba en proporción de 70:30. Las letras diferentes indican que se presentaron diferencias significativas entre las pruebas (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). GA₃: ácido giberélico, Estrat.: estratificación fría por un mes

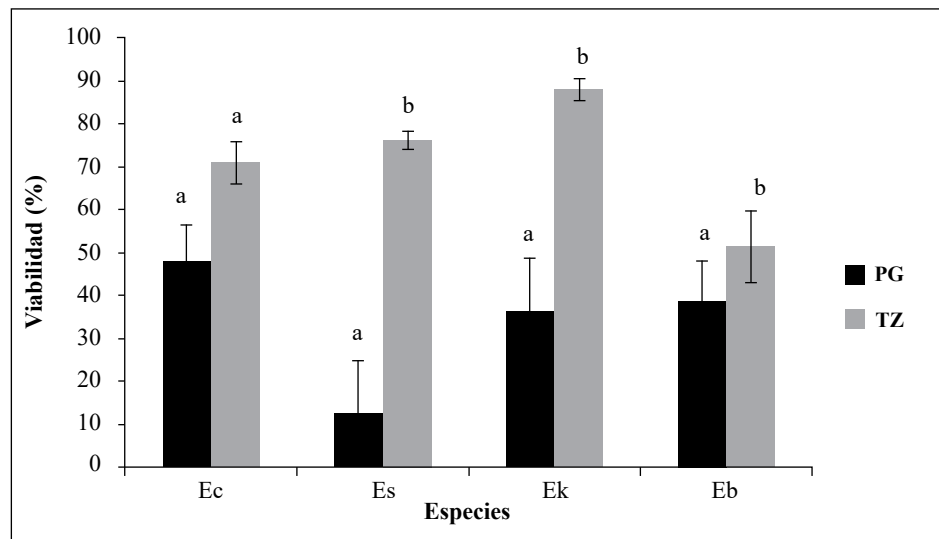


Figura 4. Comparación de la viabilidad evaluada con la prueba de germinación (PG) y con la prueba de tetrazolio (TZ). Ec: *Espeletopsis corymbosa*, tratamiento de germinación en 400 ppm GA₃; Es: *Espeletia sumapacis*, tratamiento de germinación de control; Ek: *Espeletia killipii*, tratamiento de germinación de control; Eb: *Espeletia barclayana*, tratamiento de germinación en sustrato de viruta de coco y turba en proporción de 70:30. Las verticales indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre la prueba de germinación y la de tetrazolio (Kruskal-Wallis; $p \leq 0,05$).

Crecimiento

En general, las especies presentaron un crecimiento lento. En *E. corymbosa* fue de 0,25 cm a los cuatro meses, en *E. summapacis* de 0,82 cm, en *E. killipii* de 0,88 cm y en *E. barclayana* de 0,66 cm (Figura 5), con cuatro hojas verdaderas y sin que los cotiledones permanecieran en ninguna de las especies. En la figura 6 se muestran una plántula de cada especie 30 días después de la siembra.

Supervivencia

Las especies presentaron una alta supervivencia cuatro meses después de la germinación: en *E. corymbosa* del 70 %, en *E. summapacis* del 67 %, en *E. killipii* del 88 % y en *E. barclayana* del 90 % (Figura 6).

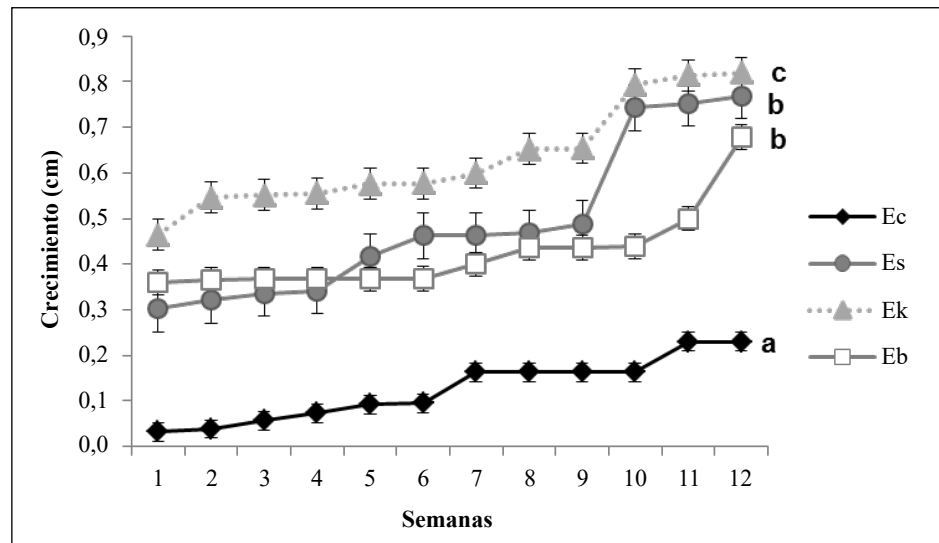


Figura 5. Curva de crecimiento de *E. corymbosa* (Ec), *E. summapacis* (Es), *E. killipii* (Ek), y *E. barclayana* (Eb), sembradas en sustrato bajo condiciones de invernadero. Las especies se sembraron en sustrato compuesto por tierra, turba y cascarilla en proporción de 60:20:20. En la especie *E. barclayana* se incluyó la siembra en un sustrato compuesto por viruta de coco y turba en proporción de 70:30. Las verticales indican el error estándar.



Figura 6. Plántulas de *Espeletia* sembradas bajo condiciones de invernadero. **a.** *E. corymbosa*, **b.** *E. summapacis*, **c.** *E. killipii* y **d.** *E. barclayana* 30 días después de la siembra

Discusión

Las características morfológicas de las especies en estudio concuerdan con la morfología de *Espeletia uribei* descrita por **Gallego & Bonilla** (2016), pues se observaron semillas pequeñas (2,06-3,85 x 0,85-1,40 mm), sin endospermo visible, con testas delgadas y quebradizas y embrión con cotiledones carnosos. La morfología de las semillas está relacionada con la forma de dispersión, la colonización y el establecimiento. Según **Velasco** (2018), algunas especies de *Espeletia* son pioneras después de disturbios. El tamaño y el peso de las semillas pueden estar relacionados con la tolerancia a la desecación, ya que las semillas menos pesadas toleran la deshidratación sin perder la viabilidad, siendo esta característica importante si se quieren almacenar en bancos de semillas (**Gold, et al.**, 2004; **Correa, et al.**, 2013; **Engels & Visser**, 2003; **Santos, et al.**, 2015; **Romero-Saritama & Pérez-Ruiz**, 2016). La morfología de las especies estudiadas puede ser indicio de que las semillas tienen un comportamiento ortodoxo frente a la desecación, sin embargo, esto debe corroborarse en ensayos de germinación con diferentes contenidos de humedad (**Hong & Ellis**, 1996).

En cuanto a la evaluación de la viabilidad con tetrazolio, es necesario acondicionar las semillas para garantizar el contacto de los embriones con el reactivo (**Milošević, et al.**, 2010), sin embargo, en las semillas de *Espeletia* basta con hacerles una pequeña ruptura, ya que la testa es quebradiza (**Mancipe-Murillo, et al.**, 2018). En el presente estudio, la especie de menor viabilidad fue *E. barclayana* (51,6 %) y la de mayor viabilidad, *E. killipii* (88 %). Estos valores se encuentran dentro del rango de tinción encontrado por **Mancipe-Murillo, et al.**, (2018) en cuatro especies de *Espeletia* bajo las mismas condiciones de prueba. Entre los aportes hechos por otros autores cabe mencionar que **Velasco** (2018) hizo la prueba en embriones de *Espeletia curialensis* Cuatrec., utilizando tetrazolio al 0,075 % a 22 °C teniendo una tinción del 100, 65 y 87 % en semillas de plantas provenientes de tres alturas diferentes. Asimismo, **Bohórquez-Quintero, et al.** (2016) hicieron la prueba de viabilidad en embriones de *Espeletia paipana* S. y obtuvieron una viabilidad promedio de 29 %.

Por otro lado, el porcentaje de embriones en las especies en estudio fue inferior al 61 %, pero mayor que el obtenido por **Velasco** (2018) en semillas de *E. curialensis* var. *exigua* recolectadas en Tame, Arauca, en jurisdicción del Parque Nacional Natural El Cocuy, que en agosto y septiembre se encontraban vacías, en tanto que las recolectadas en noviembre presentaron un 5 % de embriones. En este sentido, se sabe que el porcentaje de embriones puede estar relacionado con la época de recolección y que en el caso de una floración temprana pueden corresponder a óvulos no fertilizados, en tanto que en la floración tardía podrían reflejar un estado de absorción temprana, lo que a su vez se relacionaría con la limitación de recursos y los daños por las heladas. Por ejemplo, los factores previos al evento reproductivo pueden generar una reducción de la energía asimilada en las hojas que finalmente se refleja en el fruto y las semillas; asimismo, pueden influir las lluvias y la polinización (que en el caso de las especies de *Espeletia* ocurre por la acción de los insectos), las cuales inciden en la producción y la calidad de las semillas (**Vargas**, 2016; **Velasco**, 2018). Esto es importante y debe tenerse en cuenta en los ensayos de germinación de especies del mismo género que presentan un alto porcentaje de semillas vacías para evitar errores en la evaluación de los reportes de germinación.

En el presente estudio se observó que al emplear giberelina (GA₃), el valor más bajo de germinación se presentó en *E. barclayana* (0 %), en tanto que el valor más alto se obtuvo en *E. corymbosa* (48,1 %). Sin embargo, este tratamiento no fue el más efectivo para las demás especies evaluadas. En *E. summapacis* y *E. killipii* la mejor germinación ocurrió cuando no se aplicaron tratamientos pregerminativos y en *E. barclayana* el cambio de sustrato la favoreció (39 %). Estos valores fueron mayores que los reportados por **Mancipe-Murillo, et al.** (2018), quienes obtuvieron una germinación del 23 % en *E. barclayana* y del 24 % en *E. killipii* sembradas en condiciones de laboratorio (cajas de Petri con papel filtro, 20 °C de día y 10 °C de noche, fotoperiodo y termoperiodo de doce

horas). Las germinaciones alcanzadas son buenas comparadas con las obtenidas por otros investigadores (**Guariguata & Azocar**, 1988; **Mendoza & Martínez**, 2011; **Bohórquez-Quintero, et al.**, 2016; **Araque-Barrera, et al.**, 2016; **Velasco**, 2018).

Según **Velasco** (2018), la germinación en laboratorio de especies de alta montaña es baja, lo que se relaciona con las condiciones ambientales en estas zonas: se han observado porcentajes de germinación en especies endémicas de *Espeletia* en la cordillera Oriental que oscilan entre 10 y 20 % y, además, la corta duración de la estación favorable para la germinación en campo hace que las semillas no germinen de manera inmediata.

Es importante considerar que las semillas que germinan de forma inmediata y sincrónica no requieren formar un banco de semillas en el suelo, en tanto que las semillas que requieren tratamientos pregerminativos serían capaces de crear un mecanismo de latencia o permanecer en el suelo hasta que se presenten las condiciones adecuadas para su germinación y establecimiento (**Cavieres**, 1999; **Figuroa & Cárdenas**, 2015; **Velasco**, 2018; **Romero-Saritama & Pérez-Ruiz**, 2016; **Mancipe-Murillo, et al.**, 2018).

Hay muy pocos estudios sobre la germinación de las especies de *Espeletia*. **Mendoza & Martínez** (2011) sembraron *Espeletia conglomerata* A.C. Sm. al voleo y registraron la germinación de la primera semilla a los 40 días. **Velasco** (2018) hizo ensayos de germinación de *E. curialensis* var. *exigua* Rodr-Cabeza y S. Díaz recolectada en el Parque Nacional Natural El Cocuy, flanco oriental de la cordillera Oriental, en tres épocas diferentes y no hubo germinación. **Guariguata & Azocar** (1988) estudiaron la dinámica del banco de semillas y la ecología de la germinación de *Espeletia timotensis* en el páramo de las cruces en Mérida, Venezuela; el estudio arrojó una germinación (en laboratorio) de 80 % con luz y 67 % en la oscuridad, mayor que la registrada en campo, con un porcentaje de germinación del 17 % y una mortalidad del 30 %.

También se han hecho estudios de la propagación de los frailejones *in vitro*. **Bohórquez-Quintero, et al.** (2016) trabajaron en la propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza: sembraron 1.160 embriones, de los cuales solo germinaron 90 (8 %), valor inferior al obtenido en el presente estudio, lo que evidenció la baja capacidad germinativa *in vitro*.

Por otro lado, **Rache & Pacheco** (2009) trabajaron en la generación de un protocolo de micropropagación de *Espeletiopsis muiska* (Cuatrec.) Cuatrec. en medio de cultivo Murashige y Skoog y obtuvieron una germinación del 91 % de los embriones sin agregar reguladores de crecimiento, en tanto que **Araque-Barrera, et al.** (2016) hicieron ensayos para generar un protocolo de micropropagación de *Espeletiopsis rabanalensis* en condiciones *in vitro* y obtuvieron una baja germinación de embriones (8,9 %) en medio Murashige y Skoog (MS/4) y adición de 1 mg/L de giberelinas (GA_3).

En las pruebas de germinación es importante determinar el número de semillas que, a pesar de ser viables, no germinan. Una forma de hacerlo es mediante la comparación de la viabilidad obtenida con la prueba de germinación y con la de tetrazolio. La de la prueba de germinación puede ser menor que la del tetrazolio debido a que las semillas con latencia no germinan, pero se consideran las semillas o embriones vivos independientemente de si tienen o no latencia. En caso de que la viabilidad con tetrazolio sea menor que la de la prueba de germinación, es necesario hacer ajustes en la de tetrazolio (**Mancipe-Murillo, et al.**, 2018).

Las semillas de las especies en estudio presentaron una viabilidad mayor con la prueba en tetrazolio (**Figura 4**), lo que indicaría que las semillas presentan algún tipo de latencia, posiblemente fisiológica, que es de las más frecuentes y ha sido reportada en el orden (**Baskin & Baskin**, 2004, 2014); sin embargo, con los tratamientos aplicados en las pruebas de germinación no fue posible evidenciar esto. Solo en la especie *E. corymbosa* se evidenció una mayor germinación al adicionar 400 ppm de GA_3 . En pruebas realizadas por **Mancipe-Murillo, et al.** (2018) también se registró una mayor viabilidad con la prueba de tetrazolio en algunas especies de *Espeletia*. Es necesario hacer más pruebas de germinación variando las condiciones de siembra de las semillas y evaluando, por ejemplo, la temperatura, ya que las condiciones de siembra utilizadas pudieron no haber sido las adecuadas para las especies (**Godefroid, et al.**, 2010). En los páramos se presenta una alta radicación, que

es constante por la ubicación en la línea del ecuador, y la temperatura es variable, pues depende del gradiente altitudinal y de la humedad del aire, y está determinada por el clima local con variaciones de temperatura de 20 °C en el curso del día y bajas temperaturas en la noche (Buytaert, *et al.*, 2006).

Las especies evaluadas presentaron un lento crecimiento en su fase de plántulas, con una altura máxima de 0,88 cm en cuatro meses. Por su parte, **Mendoza & Martínez** (2011) reportaron un crecimiento de 3 a 5 cm en *Espeletia conglomerata* un año después del trasplante de las plántulas a bolsas con un sustrato de arena, tierra y capote de frailejón en una proporción de 50:25:25. Es importante considerar que el crecimiento de las plantas puede variar según su estado fenológico; según **Fagua & Gonzáles** (2006), en *Espeletia grandiflora* el crecimiento disminuye con la edad del individuo, ya que en las plantas jóvenes los nutrientes son usados para el crecimiento vegetativo y en las adultas para la formación de estructuras reproductivas, lo que se ve influenciado, a su vez, por las condiciones medioambientales. Por ejemplo, **Venegas** (2011) encontró que la elevación influyó en la producción de hojas en *E. grandiflora*, siendo menor la producción a mayor altitud, aunque otros autores señalan que la biomasa aumenta porque hay menos relaciones de competencia y depredación.

En el presente estudio se registró una elevada supervivencia de las plántulas: entre el 67 y el 90 %. **Rache & Pacheco** (2009) sembraron plántulas provenientes de ensayos de germinación *in vitro* en un sustrato compuesto por tierra de capote y obtuvieron una supervivencia del 60 %. **Mendoza & Martínez** (2011) hicieron estudios de germinación en sustrato de *E. conglomerata* y obtuvieron una supervivencia del 84 % al trasplantar las plántulas a bolsa después de su germinación. La supervivencia de las plantas depende en gran medida de la calidad del sustrato empleado, su porosidad y textura, que determinan la retención de agua y el intercambio de gases del sistema radical, así como de la adición de nutrientes y la frecuencia de riego (**Rodríguez**, 2010; **Gutiérrez-Castorena, et al.**, 2011; **Valenzuela, et al.**, 2014; **Morales-Maldonado & Casanova-Lugo**, 2015; **Tintinaco**, 2019). Asimismo, es importante tener en cuenta el estado fitosanitario de las especies, pues según **García-Castañeda, et al.** (2015), en el frailejón *Espeletia grandiflora* Bonpl. se evidenció que en las etapas iniciales del desarrollo de las plántulas los fitopatógenos afectaron su supervivencia en vivero.

El determinar con precisión las condiciones específicas para la germinación, crecimiento y desarrollo de los frailejones es un proceso bastante complejo en el que intervienen numerosas variables que seguramente guardan una estrecha relación con las condiciones naturales muy particulares de los ecosistemas paramunos en los que subsisten estas especies (**Mendoza & Martínez**, 2011).

Los ecosistemas de páramo son únicos de la alta montaña y se consideran islas biogeográficas desde Venezuela hasta el norte de Perú. Se localizan solo en Ecuador, Perú, Venezuela, Costa Rica y Colombia, país donde se encuentra el 50 % de los páramos del mundo. Estos ecosistemas presentan una singularidad biológica y son muy importantes por los servicios ecosistémicos que prestan, entre ellos, la provisión continua de agua y el almacenamiento de carbono atmosférico (**Morales, et al.**, 2007; **González-Benito & Martín**, 2011).

El presente estudio constituye un aporte al conocimiento de la germinación, crecimiento y supervivencia en sustrato de *E. corymbosa*, *E. summapacis*, *E. killipii* y *E. barclayana*, especies características de los ecosistemas de páramo que están siendo afectadas por las diferentes actividades humanas hasta el extremo de que *E. killipii* y *E. corymbosa* se encuentran amenazadas (**Avila, et al.**, 2020). En consecuencia, la información aquí presentada es un referente para la propagación y conservación de estas especies, aunque es necesario continuar investigando para encontrar las mejores condiciones para su pro-pagación. La siembra de *E. barclayana* en un sustrato compuesto por viruta de coco y turba en proporción de 70:30 arrojó los mejores resultados de germinación, por lo cual se recomienda continuar probando este sustrato combinado con otros tratamientos en la propagación de frailejones.

Conclusiones

Las semillas de *E. corymbosa*, *E. summapacis*, *E. killipii* y *E. barclayana* tienen una morfología similar: son pequeñas, sin endospermo visible, testas delgadas quebradizas y embrión con cotiledones carnosos. Presentan altos porcentajes de semillas vacías, de 39 a 65 %, valores que deben tenerse en cuenta en las pruebas de germinación y de tetrazolio.

La viabilidad obtenida en la prueba germinación fue menor que en la de tetrazolio, lo que indicaría que las semillas presentan algún tipo de dormancia, probablemente fisiológica, aunque esto no se pudo evidenciar con las pruebas realizadas en el presente estudio, por lo que es necesario variar las condiciones de germinación, entre ellas, la temperatura, pues la prueba de viabilidad con tetrazolio indica que las semillas tienen un mayor potencial de germinación.

El crecimiento *E. corymbosa*, *E. summapacis*, *E. killipii* y *E. barclayana* es lento, pero la supervivencia es alta y llega a ser hasta del 90 %, por lo que si se recolectan semillas de calidad en el momento adecuado se puede tener una buena producción de plántulas de estas especies en vivero.

Agradecimientos

A la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, por el apoyo financiero; al investigador Carlos Iván Suárez Ballesteros, por la identificación taxonómica de las especies y la consecución de las fuentes semilleras; a Manuela Calderón, por compartir sus conocimientos en el desarrollo de la presente investigación y a Ana Milena Torres, por su ayuda en las labores operativas.

Conflicto de intereses

La autora declara no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Araque-Barrera, E., Bohórquez-Quintero, M., Pacheco-Maldonado, J.** (2016). Micropropagation of *Espeletopsis rabanalensis* S. Díaz y Rodr.-Cabeza. *Biotecnol Apl.* **33** (1): 1211-1217.
- Avila, F., Funk, V.A, Diazgranados, M.** (2020). *Espeletia summapacis* Cuatrec. En: Bernal R, Gradstein SR, Celis M, editores. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Versión en línea. Fecha de consulta: 31 de agosto, 2020. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Espeletia%20summapacis/>
- Baskin, C. & Baskin, J.** (2014). Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Segunda edición. San Diego, CA, USA: Academic/Elsevier. p. 666.
- Baskin, J.M. & Baskin C.C.** (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* **14** (1):1–16. Doi: 10.1079/SSR2003150
- Bewley, J., Black, M., Halmer, P.** (2006). The encyclopedia of seeds: Science, technology and uses. Londres: CABI. p. 828.
- Bohórquez-Quintero, M.A., Araque-Barrera, E.J., Pacheco-Maldonado, J.C.** (2016). Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas.* **38** (104): 23-36.
- Buytaert, W., Céleri, R., Bert De Bièvre, Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., Hofstede, R.** (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews.* **79** (1-2): 53-72. Doi:10.1016/j.earscirev.2006.06.002
- Cavieres, L.A.** (1999). Bancos de semillas persistentes: modelos de germinación retardada de semillas y su aplicación en ambientes alpinos. *Revista Chilena de Historia Natural.* **72**: 457-466.
- Chaparro, J.A. & Chaparro, N.Y.** (2012). Beneficios del ecosistema páramo, organizaciones y políticas de conservación. Aproximaciones al páramo El consuelo del municipio de Cerinza, Boyacá. *Desarrollo, Economía y Sociedad.* **1** (1): 57-76.
- Correa, E., Álvarez, S., Espitia, M; Cardona, C.** (2013). Modelos de secado y tolerancia a la desecación de semillas de *Tectona grandis* L.f y *Gmelina arborea* Roxb. *Revista de ciencias agrícolas.* **30** (2): 20-33.

- Da Silva, C.B., Barbosa, R.M., Vieira, R.D.** (2012). Evaluating sunn hemp (*Crotalaria juncea*) seed viability using the tetrazolium test. *Seed Technol.* **34** (2): 263–272. Doi: 10.13140/RG.2.1.2422.8883
- Engels, J.M. & Visser, L.** (Eds). (2003). Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales de biodiversidad para bancos de germoplasma no. 6. Biodiversity International, Roma, Italia. p. 193.
- Fagua, J. & González, V.** (2007). Growth rates, reproductive phenology, and pollination ecology of *Espeletia grandiflora* (Asteraceae), a giant Andean caulescent rosette. *Plant Biol.* **9**: 127-135.
- Figueroa, K. & Cárdenas, J.E.** (2015). Aspectos de la propagación sexual de *Espeletia grandiflora* en un sector intervenido del páramo de Chisacá (P.N.N Sumapaz, Colombia). Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Naturales e ingeniería. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Gallego, A. & Bonilla, M.** (2016). Caracterización de microsítios para el establecimiento de plántulas de *Espeletia uribei* (Asteraceae). *Acta Biológica Colombiana.* **21** (2): 387-98.
- García-Castañeda, A.R., Díaz-Alvarado, A.I., Castañeda-Garzón, S.L.** (2015). Diagnóstico preliminar de microorganismos fitopatógenos asociados a plántulas de *Espeletia grandiflora* Humb. y Bonpl. propagadas para su conservación *ex situ*. *Fitopatología Colombiana.* **39** (1): 4.
- Godefroid, S., Van de Vyver, A., Vanderborcht, T.** (2010). Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks. *Biodivers Conserv.* **19**: 1365-1383.
- Gold, K., León-Lobos, P., Way, M.** (2004). Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para la conservación a largo plazo y restauración ecológica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile. Boletín INIA N° 110, 62 p.
- González-Benito, M.E. & Martín, C.** (2011). *In Vitro* preservation of Spanish biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* **47** (1): 46-54. Doi: 10.1007/s11627-010-9333-4
- Guariguata, M.** (1988). Seed Bank Dynamics and Germination Ecology in *Espeletia timotensis* (Compositae), an Andean Giant Rosette. *Biotropica.* **20** (1): 54-59.
- Gutiérrez-Castorena, M., Hernández, J., Ortiz-Solorio, C., Sánchez, R., Hernández, M.** (2011). Relación porosidad-retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto sobre variables respuesta en plántulas de lechuga. *Revista Chapingo, serie horticultura.* **17** (3): 183-196.
- Heywood, V. & Dulloo, M.** (2005). *In situ* conservation of wild plant species: A critical global review of good practices. In *Economic Botany.* **61** (2). IPGRI Technical Bulletin 11. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2007\)61\[205:iscowp\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2007)61[205:iscowp]2.0.co;2)
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** (1996). A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No. 1. (J.M.M. Engels and J. Toll, vol. eds.) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p. 62.
- Hofstede, R., Segarra, P. Mena, P.** (Eds). (2003). Los páramos del mundo. Proyecto atlas mundial de los páramos. Global Peatland Initiative/NC-IUCN/Ecociencia. Quito.
- Londoño, C., Cleef, A. & Madriñán, S.** (2014). Angiosperm flora and biogeography of the páramo region of Colombia, Northern Andes. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants.* **209** (2): 81-87. Doi:10.1016/j.flora.2013.11.006
- Mancipe-Murillo, C., Calderón-Hernández, M., Pérez-Martínez, L.V.** (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Caldasia.* **40** (2): 366-382. <https://dx.doi.org/10.1544/6/caldasia.v40n2.68251>
- Martín, A. C.** (1946). The Comparative Internal Morphology of Seeds. *American Midland Naturalist.* **36** (3): 513. Doi: 10.2307/2421457
- Mendoza, A. & Martínez, J.** (2011). Propagación, adaptación y crecimiento del frailejón “*Espeletia conglomerata*” en vivero. Universidad Pontificia Bolivariana. Trabajo de especialización en conservación y preservación de recursos naturales. Bucaramanga, Santander.
- Milošević M., Vujaković, M., Karagić, Đ.** (2010). Vigour tests as indicators of seed viability. *Genetika.* **2** (1): 103-118.
- Mohan, J.** (2011). Prospects of *in vitro* conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* **23** (2): 110-19. Doi:10.9755/ejfa.v23i2.6344
- Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C.E., Pedraza, C.A., Rodríguez, N., Franco, C.A., Betancourth, J.C., Olaya, E., Posada, E., Cárdenas, L.** (2007). Atlas de Páramos de Colombia. Bogotá, D. C., Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 208 p.

- Morales-Maldonado, E. & Casanova-Lugo, F.** (2015). Mezclas de sustratos orgánicos e inorgánicos, tamaño de partícula y proporción. *Agronomía Mesoamericana*. **26** (2): 365-372.
- Niembro, A.** (1988). Semillas de árboles y arbustos: ontogenia y estructura (Primera ed), México D.F: Editorial Limusa. p. 285.
- Pedraza-Peñalosa, P., Betancur, J., Franco-Rosselli, P.** (2004). Chisacá, un recorrido por los páramos andinos. Bogotá: Segunda ed. Instituto de Ciencias Naturales e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. p. 340.
- Rache, L. & Pacheco, J.** (2009). Micropropagación de *Espeletiopsis muiska* (Cuatrecasas), frailejón del parque natural La Ranchería-Boyacá, Colombia. *Agron Colomb*. **27** (3): 349-358. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13278>
- Ranal, M. & Santana, D.** (2006). How and why to measure the germination process. *Rev bras Bot*. **29** (1): 1-11. Doi: 10.1590/S0100-84042006000100002
- Reed, B.M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., Pence, V.C.** (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. **47** (1): 1-4. Doi: 10.1007/s11627-010-9337-0
- Rodríguez, R.** (2010). Manual de prácticas de viveros forestales. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. p. 51.
- Romero-Saritamá, J.M & Pérez-Ruiz, C.** (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación *ex situ* de especies leñosas en los bosques secos tumbesinos. *Ecosistemas*. **25** (2): 59-65. Doi: 10.7818/ECOS.2016.25-2.07
- Santos, L., Lima, M.C., Torres, A.M., Velásquez, H., Debouck, D.C.** (2015). Manual de procedimientos del banco de germoplasma: conservación de semillas. Recepción de semillas. 2da edición. CIAT, Programa de recursos genéticos, conservemos una semilla de soluciones. Palmira. p. 26.
- Tintinaco, N.** (2019). Evaluación de cuatro sustratos de tipo tradicional en la reproducción del frailejón (*Espeletia hartwegiana*) en vivero, para el repoblamiento en el páramo de Barbillas, Pintacará-Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Tesis de Maestría. Universidad del Cauca.
- Tompsett, P.B. & Pritchard, H.W.** (1998). The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seed. *Ann Bot*. **82** (2): 249-261.
- Valencia, R.A., Lobo, R.M., Ligarreto, G.A.** (2010). Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma. *Cienc. Tecnol. Agropecu*. **11** (1): 85-94. Doi: 10.21930/rcta.vol11_num1_art:198
- Valenzuela, O., Gallardo, C., Carponi, M., Aranguren, M., Tabares, H., Barrera, M.** (2014). Manejo de las propiedades físicas en sustratos regionales para el cultivo de plantas en contenedores. *Ciencia Docencia y Tecnología*. **4** (4): 1-19.
- Vargas, O.** (2016). Distribución altitudinal, papel en los ecosistemas y amenazas de las poblaciones del género *Espeletia* (Asteraceae) en Colombia. Tesis de pregrado. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Velasco, V.M.** (2018). Biología reproductiva de una población *Espeletia curialensis* var. *Exigua* Rodr.-Cabeza y S. Díaz (cordillera Oriental, Colombia). Tesis de maestría. Manejo, uso y conservación del bosque. Universidad Distrital de Colombia.
- Venegas, S.** (2011). Evaluación de tasas de crecimiento de *Espeletia grandiflora* Humb. y Bonpl. en tres elevaciones en el Parque Nacional Natural Chingaza. Pontificia Universidad Javeriana. p. 27.
- Villamil, J. & García, F.** (1998). Germinación de Semillas. Minist Agric Pesca y Aliment Secr Gen Estructuras. **2090**: 1-20.

Artículo original

Evaluación de residuos de cáscaras de papa como sustrato para la producción de amilasas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* A16

Evaluation of potato peel wastes to produce amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* A16

✉ Etna Milena Sánchez-Castelblanco*, ✉ Juan Pablo Heredia-Martín

Centro de Gestión Industrial, SENA, Grupo de Investigación “Neurona”, Bogotá, Colombia

Resumen

Los residuos agroindustriales de bajo costo, fácil acceso y contenido considerable de almidón pueden aprovecharse como sustratos para la producción de amilasas. En el presente estudio se evaluó la producción de amilasas con la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* (aislamiento A16) en medios de cultivo ajustados a diferentes pH y preparados a partir de cáscaras de papa con 1,30 % de partes por volumen (p/v) de almidón. Los medios fueron incubados durante 36 horas a 37 °C y se tomaron muestras cada 12 horas para cuantificar mediante espectrofotometría el almidón residual revelándolo con solución de Lugol para obtener extractos enzimáticos crudos en los que se determinó la actividad amilolítica. La actividad de las amilasas producidas en sustratos preparados con cáscaras de papa se compararon con las actividades amilolíticas producidas en caldo de almidón al 1 %, sustrato que sirvió de control positivo. La mayor actividad de las amilasas producidas en medios con cáscaras de papa fue de 44,2 U/mL a las 36 horas de fermentación a un pH de 5,0, en tanto que la actividad enzimática en caldo de almidón al 1 % fue de 64,8 U/mL.

Palabras claves: Actividad enzimática; Actividad amilolítica; *Bacillus amyloliquefaciens*; Almidón; Residuos agroindustriales; Cáscaras de papa.

Abstract

Agroindustrial wastes can be suitable as substrates for amylases production given their low cost, availability, and significant concentration of starch. In the present study, we evaluated the production of amylases from the *Bacillus amyloliquefaciens* A16 strain in culture media adjusted to different pH and prepared from potato peels with 1.30 % w/v of starch. The media were incubated for 36 hours at 37°C and samples were taken every 12 h to quantify by spectrophotometry the residual starch using Lugol's solution for revelation to obtain crude enzyme extracts whose amylolytic activity was determined. The amylase activity produced in substrates prepared from potato peels were compared with that produced in 1 % starch broth used as a positive control. The highest amylase activity in potato peels media was 44.2 U /mL after 36 h of fermentation at 5.0 pH while the enzyme activity in 1% starch broth was 64.8 U/mL.

Keywords: Enzyme activity; Amylolytic activity; *Bacillus amyloliquefaciens*; Starch; Agroindustrial wastes; Potato peels.

Introducción

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas principalmente por enlaces glicosídicos α -1,4. Sus formas más simples son un polímero de menor peso molecular denominado amilosa y un polímero ramificado denominado amilopectina (Magallanes-Cruz, *et al.*, 2017). Es el mayor polímero de reserva energética de las plantas, en cuyas raíces, semillas y frutos se almacena en forma de gránulos. Este polisacárido se encuentra en cereales como el arroz, el trigo y el maíz y en tubérculos como la papa, la yuca y la patata dulce (Bertoft, 2017).

Citación: Sánchez-Castelblanco EM, Heredia-Martín JP. Evaluación de residuos de cáscaras de papa como sustrato para la producción de amilasas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* A16. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):794-804, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1122>

Editor: Sonia Moreno

***Correspondencia:**

Etna Milena Sánchez-Castelblanco;
etnamilena@misena.edu.co

Recibido: 9 de diciembre de 2019

Aceptado: 17 de febrero de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Industrialmente el almidón es degradado hasta glucosa por hidrólisis química o enzimática para obtener principalmente jarabes que producen etanol mediante procesos de fermentación microbiana (Quintero, *et al.*, 2010).

Las amilasas son las principales enzimas extracelulares que hidrolizan el almidón al degradarlo en unidades de sacáridos de menor peso molecular (Robyt, 1984). Además de ser utilizadas para obtener jarabes, las amilasas tienen una amplia aplicación en las áreas farmacéutica, cosmética y alimenticia, en la remoción o degradación de contaminantes de la industria textil y del papel y en la producción de detergentes enzimáticos, representando comercialmente el 25 % del mercado mundial de enzimas (Nigam & Singh, 1995; Turner, *et al.*, 2007; Yildirim-Akatin, 2019).

Las amilasas tienen diversos orígenes, sin embargo, las más utilizadas son las de origen microbiano, las cuales se producen a partir de bacterias y hongos de los géneros *Bacillus* sp. y *Aspergillus* sp., respectivamente. Las especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. macerans*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens*) se han reportado como aquellas con los mejores rendimientos en la producción de amilasas usando medios de cultivo de fermentación líquida o sumergida, que son los más utilizados en la producción industrial de enzimas amilolíticas (El Enhasy, 2007).

En Colombia existen regiones en las que la producción de papa (*Solanum tuberosum* L) es la principal fuente de ingresos por la diversidad de variedades que pueden cultivarse (Lizarazo, *et al.*, 2015) y, aunque los residuos de los cultivos tanto después de la cosecha como en el procesamiento, se han utilizado principalmente para la alimentación animal, recientemente han comenzado a aprovecharse en la producción de glicerol y de ácido láctico (Peñaranda, *et al.*, 2017). Sin embargo, se estima que alrededor de un cuarto de los residuos de papa generados durante su procesamiento industrial son descartados (Romo, *et al.*, 2019). Además, los residuos agroindustriales con un contenido considerable de almidón se usan como una fuente de carbono de bajo costo para la biosíntesis de amilasas (Abd-Elhalem, *et al.*, 2015), por lo que las cáscaras de papa podrían ser una materia prima importante para su obtención, lo cual contribuiría, asimismo, a la mitigación del impacto ambiental de este tipo de desechos y disminuiría los costos de producción por ser una alternativa viable y de bajo costo para la producción de estas enzimas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de amilasas a partir de residuos de cáscaras de papa en fermentación sumergida con pH de 5,0, 7,0 y 8,0 usando una cepa de *B. amyloliquefaciens* (A16) previamente aislada de suelos de humedales de Bogotá. Este es el primer estudio reportado sobre la obtención de amilasas con estas condiciones. Se estimó su producción en los extractos enzimáticos mediante ensayos cuantitativos que permitieron determinar la concentración residual de almidón y la actividad enzimática (U/mL) determinada como la cantidad de enzima que produce un μmol de azúcar reductor por minuto y por mililitro (Haq, *et al.*, 2003; Karnwal & Nigam, 2013; Abd-Elhalem, *et al.*, 2015).

Materiales y métodos

Tratamiento previo de los residuos de cáscaras de papa

Los residuos de cáscaras de papa (*S. tuberosum* L) provenían de restaurantes ubicados en la zona industrial de la localidad de Puente Aranda en Bogotá y se recolectaron directamente de los centros de acopio de estos negocios sin seleccionarlos según la variedad específica de tubérculo.

Los residuos se lavaron con agua potable para eliminar otros residuos adheridos, se les adicionaron 10 mL de éter etílico para extraer las grasas y, posteriormente, se eliminaron los azúcares reductores con 10 mL de etanol al 80 %. Los residuos se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm², se deshidrataron en una cámara de calor (Binder – Fed 115) a 70 °C hasta obtener un peso seco constante y, por último, se conservaron a -80 °C para preservarlos hasta su utilización.

Caracterización de los residuos de papa

Los residuos deshidratados y congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se pasaron directamente a la cámara de calor a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora, con el fin de eliminar el agua resultante del proceso de descongelación, y para caracterizarlos; cada ensayo se hizo por triplicado. Para determinar la humedad se llevaron 2 g de residuos sin tratamiento previo a la cámara de calor a $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el punto de peso seco constante, posteriormente se cuantificó el contenido de agua mediante gravimetría y una vez determinada su humedad, los residuos se calcinaron en una mufla (Thermolyne™) a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el punto de peso constante para determinar el contenido de cenizas (Masson, 1994).

La cuantificación del almidón de las cáscaras de papa, previamente tratadas para eliminar la glucosa residual, se hizo de manera indirecta titulando la glucosa producida luego de la hidrólisis ácida del almidón presente en 1,0 g de residuos de papa y en 1,0 g de almidón hidrosoluble (Merck), en tanto que el contenido de almidón de los residuos se calculó comparando los títulos de Fehling obtenidos. En la titulación se empleó reactivo de Fehling previamente estandarizado con solución de glucosa (Fisher) al 0,5 % p/v (Gerena-Baron, 2013).

La concentración de calcio y magnesio se determinó en 5,0 g de residuos previamente tratados y calcinados a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una mufla Thermolyne™ hasta el punto de peso constante; se tomaron 0,5 g del producto de la calcinación y se trataron con solución de ácido nítrico (Merck) al 65 %. La cantidad de calcio y magnesio en la solución preparada se determinó en un equipo de absorción atómica (Shimadzu – AA7000). Para la determinación del calcio se utilizó una curva de calibración entre 0,01 y 0,04 mg Ca/L preparada a partir de una solución de calcio estándar (Merck), y como blanco se utilizó una solución de 0,25 % de cloruro de potasio (Merck), 0,65 % de ácido nítrico (Merck) y 0,05 % de lantano (Sigma). Para cuantificar el magnesio se preparó una curva entre 0,1 y 0,4 mg Mg/L a partir de una solución de magnesio estándar (Merck), empleando como blanco una solución de 0,65 % de ácido nítrico y 0,04 % de cloruro de estroncio (Merck) (Masson, 1994; Londoño-Posso, 2013).

Para determinar el nitrógeno total se llevaron 10 g de cáscaras previamente tratadas y maceradas a un digestor Kjeldahl (FOSS Kjeltac™ 8200). Finalizada la digestión, la muestra se sometió a retrotitulación con una solución de 0,05 M de ácido clorhídrico (Merck) (Masson, 1994).

Los fosfatos se determinaron por el método colorimétrico de amarillo de molibdo-vanadato en un espectrofotómetro (Shimadzu UV – 1800) a partir de 1,0 g de residuos calcinados utilizando una curva de calibración entre 2,4 y 12 mg $(\text{PO}_4)^3/\text{L}$ a partir de dihidrogenofosfato de potasio (Fisher) y como blanco, una solución de 0,5 % de molibdato de vanadio (Merck), 0,00125 % de vanadato de amonio (Merck) y 2,5 % de ácido nítrico (Merck) (Masson, 1994).

Preparación de medios de cultivo

Se añadieron 23,5 g de cáscaras de papa deshidratadas y maceradas en un matraz de Erlenmeyers de 250 mL y se esterizaron a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 psi durante 20 minutos. Posteriormente se mezclaron con 0,23 g/L de solución de cloruro de calcio (Merck) esterilizada con filtro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ para un volumen final de 150 mL y una concentración de almidón de 0,15 % p/v. El pH del medio se ajustó a 5, 7 y 8 con una solución de 0,1 M de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio esterilizada por filtración.

Se prepararon cuatro medios de control con caldo de almidón al 1 % p/v (0,25 g de extracto de levadura, Scharlau), 0,25 g de peptona, 0,1 g de sulfato de magnesio, 0,01 g de cloruro de calcio, 0,01 g de fosfato de potasio monobásico y 0,01 g de fosfato de potasio dibásico. Un medio se ajustó a un pH de 5,0, dos a 7,0 y uno a 8,0.

Producción de amilasas

Se reactivó una cepa de *B. amyloliquefaciens* (A16) previamente aislada de suelos de humedales de Bogotá y conservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Buitrago, et al., 2014) en 100 mL de caldo

nutritivo (Oxoid™) a 37 °C durante 24 horas. Una vez reactivada la cepa, se tomaron 10 mL, se transfirieron en 90 mL de caldo de almidón al 1,0 % p/v y se incubaron por 24 horas a 37 °C y 120 rpm. A partir de este cultivo se inocularon 15 mL de 6×10^8 células/mL en el medio de cultivo preparado con residuos de papa y se incubaron durante 36 horas a 37 °C y 120 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick™ Innova® 40). Como control negativo se incubó bajo las mismas condiciones una réplica de medio de cáscaras de papa estéril (sin inocular) con cada pH evaluado. Para la producción de amilasas, se hizo una réplica de cada control positivo en caldo de almidón al 1,0 % p/v y pH de 5,0, 7,0 y 8,0 debidamente inoculados y como control negativo se incubó un caldo de almidón al 1 % p/v y pH de 7,0 sin inocular.

Obtención de extractos enzimáticos crudos

A las 0 y 12 horas de cultivo se tomaron 4 g de muestra para facilitar el muestreo, ya que la viscosidad del medio no permitió la toma de muestras líquidas, en tanto que a las 24 y 36 horas se tomaron 4 mL. Las muestras se centrifugaron a 4.500 rpm durante 20 minutos a 7 °C en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R. Los sobrenadantes o extractos enzimáticos crudos se preservaron a -20 °C de uno a cinco días para determinar la actividad amilolítica.

Cuantificación de la concentración de almidón durante la fermentación

A las 0, 12, 24 y 36 horas de cultivo se tomó aproximadamente 1 g o 1 mL de cada muestra y se adicionaron 5 mL de solución ácida de cloruro de calcio. Esta mezcla se llevó a la autoclave (Sanyo) por 10 minutos a 120 °C y 15 psi; posteriormente se agregó 1 mL de solución de acetato de zinc a partir de ácido acético (21,9 g de acetato de zinc Merck, 3 mL de ácido acético Merck en 100 mL de agua destilada) más 1 mL de solución de ferrocianuro de potasio al 10,5 % p/v que se llevó a un volumen final de 25 mL con solución ácida de cloruro de calcio y se centrifugó a 4.500 rpm durante 20 minutos en una centrifuga (Hettich – Rotofix 32A) (Englyst, *et al.*, 2006). La cuantificación del almidón se determinó por espectrofotometría (Ortiz, *et al.*, 2015). Para la curva de calibración se prepararon soluciones de almidón soluble de grado analítico (Merck) a diferentes concentraciones (0,02, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08 y 0,1 g/L), se revelaron con solución de Lugol y su absorbancia se leyó a 650 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800. Un mL de los sobrenadantes obtenidos de la extracción del almidón se reveló con solución de Lugol y su absorbancia se leyó a 650 nm.

Cuantificación de la actividad enzimática amilolítica

A 1 mL de los extractos enzimáticos crudos se le adicionó 1 mL de almidón al 1 % con tampón fosfato y pH de 6,5. Simultáneamente, se preparó un blanco enzimático usando 1 mL de caldo de almidón y tampón con pH de 6,5 más 1 mL de agua destilada. Los extractos y los blancos enzimáticos se llevaron a un baño serológico (Barnstead Lab-Line) a 60 °C durante una hora para llevar a cabo la reacción enzimática. Las reacciones se detuvieron con baño de hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 4.500 rpm durante 20 minutos a 7 °C. Se tomaron alícuotas de 1 mL de los sobrenadantes para determinar la concentración de glucosa con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Olanbiwoninu & Fasiku, 2015). La absorbancia se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800. La actividad enzimática amilolítica producida se determinó en unidades enzimáticas (U/mL), es decir, la cantidad de enzima que produce un μmol de glucosa por minuto y por mililitro (Abd-Elhalem, *et al.*, 2015; Bryjak, 2003).

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas en la actividad amilolítica de los extractos enzimáticos obtenidos de los medios con cáscaras de papa a pH de 5,0, 7,0 y 8,0 y caldo de almidón, se utilizó un ANOVA de un factor con un nivel de significación α de 0,01.

Resultados y discusión

Caracterización de los residuos de papa

Los resultados de la caracterización de las de cáscaras de papa (**Tabla 1**) evidenciaron un contenido de almidón de 1,30 % p/p. A partir de este porcentaje se definió la cantidad de residuos necesaria en los medios de cultivo para tener una concentración final de almidón de 0,15 % p/v. Se seleccionó esta concentración porque se evidenció que la viscosidad aumentaba a medida que aumentaban las concentraciones de almidón en los medios de cultivo preparados con cáscaras de papa, lo que dificultaría la disponibilidad de nutrientes y el control de variables durante la fermentación sumergida. Por tal razón, las concentraciones finales de almidón en los medios preparados con cáscaras de papa difirieron de las de los medios preparados con almidón soluble.

Según algunos estudios consultados, el contenido de almidón de cáscara de papa fluctúa entre 7,80 % p/p (**Sepelev & Galoburda, 2015**) y 16,83 % p/p (**Liang & McDonald, 2014**). En un estudio con residuos de papa de variedades colombianas se evidenció que, dependiendo de la variedad, las concentraciones de almidón en base seca estuvieron entre 3,38 y 8,79 % p/p, por lo que se concluyó que el contenido y la calidad de almidón dependen tanto de la variedad del tubérculo como de las condiciones del cultivo (**Lizarazo, et al., 2015**). Dado que el objetivo de este estudio era aprovechar residuos agroindustriales para la obtención de enzimas independientemente de su contenido de almidón, la formulación del medio para la producción de amilasas se hizo a partir de las cáscaras de papa recolectadas en restaurantes y después caracterizadas.

Formulación de los medios de cultivo

Los análisis fisicoquímicos de los residuos permitieron definir las cantidades de nitrógeno, fosfatos, calcio y magnesio requeridos para suplementar los medios de cultivo a partir de 23,5 g de cáscaras de papa. Los porcentajes de nutrientes requeridos se muestran en la **tabla 2** comparados con un medio base preparado con almidón soluble.

Los requerimientos mínimos de nutrientes se calcularon a partir de un medio de referencia denominado caldo de almidón preparado a partir de almidón soluble a una concentración del 1,0 % p/v (**Pedroza & Matiz, 2007**). Las cantidades de magnesio,

Tabla 1. Resultados obtenidos en la caracterización de la muestra (se reportan en base seca)

Análisis	Resultado
Almidón	1,30 % p/p
Humedad	79,66 % p/p
Cenizas	5,96 % p/p
Magnesio	0,195 % p/p
Nitrógeno	1,39 % p/p
Calcio	0,20 mg/kg
Fosfatos	0,30 % p/p

Tabla 2. Concentración de nutrientes en 150 mL de medios preparados con cáscaras de papa

Nutriente	Caldo almidón % p/v	Cáscaras de papa % p/v
Magnesio	0,010	0,031
Nitrógeno	0,063	0,218
Calcio	0,003	<< 0,003
Fosfatos	0,015	0,047

nitrógeno y fosfatos en el medio fueron aportadas directamente por las cáscaras de papa, sin embargo, la cantidad de calcio en los residuos fue alrededor de 1.000 veces menor de la necesaria, razón por la cual se adicionó una solución de cloruro de calcio dihidratado a una concentración de 225 mg/L, lo que representó una concentración final de calcio de 0,006 % p/v en los medios de cultivo.

Consumo de almidón

El contenido de almidón se cuantificó en cada uno de los medios de cultivo para establecer su consumo durante el tiempo de fermentación. Las concentraciones de almidón en los medios preparados a partir de residuos de cáscaras de papa a pH de 5,0, 7,0 y 8,0 se redujeron hasta un 53 % al cabo de 36 horas de fermentación (Figura 1), en tanto que hubo una reducción de hasta el 98 % en los medios preparados con almidón soluble tan solo en las primeras 12 horas del análisis (Figura 2). En todos los controles negativos, en los cuales no se inoculó la cepa, las concentraciones promedio de almidón fueron constantes en el tiempo (Figura 3), lo cual indica que, aunque *B. amyloliquefaciens* A16 fue capaz de utilizar el almidón disponible en las cáscaras de papa, el proceso fue más eficiente hidrolizándolo en el caldo de almidón al 1,0 % p/v.

Utilizando un consorcio microbiano para la degradación del almidón en cáscaras de papa, Liang & McDonald (2014) obtuvieron una concentración final de almidón de 2,07 % en base seca, lo que equivalió tan solo al 12,3 % en la reducción de la concentración del sustrato e indica que el consumo de almidón fue más eficiente con la cepa *B. amyloliquefaciens* (A16) usada en este estudio.

Se evidenció un mayor consumo del sustrato en los medios preparados a partir de almidón soluble comparados con los medios de cáscaras de papa (Figuras 1-3), lo que podría deberse a la disponibilidad del almidón en los medios, ya que en el caldo de almidón hidrosoluble al 1 % p/v el sustrato está homogéneamente distribuido en el medio, en tanto que en los medios preparados con cáscaras de papa la mayor concentración de almidón se encuentra dentro de estas, una matriz compleja que, además de tener almidón, contiene otros polímeros como pectina, celulosa y hemicelulosa (Lizarazo, et al., 2015). Además, con el paso del tiempo la producción de azúcares simples en el medio afecta la producción de la enzima ralentizando la degradación del almidón (El-Fallal, et al., 2012). La concentración de almidón residual podría ser un indicativo de cuándo finalizar el proceso

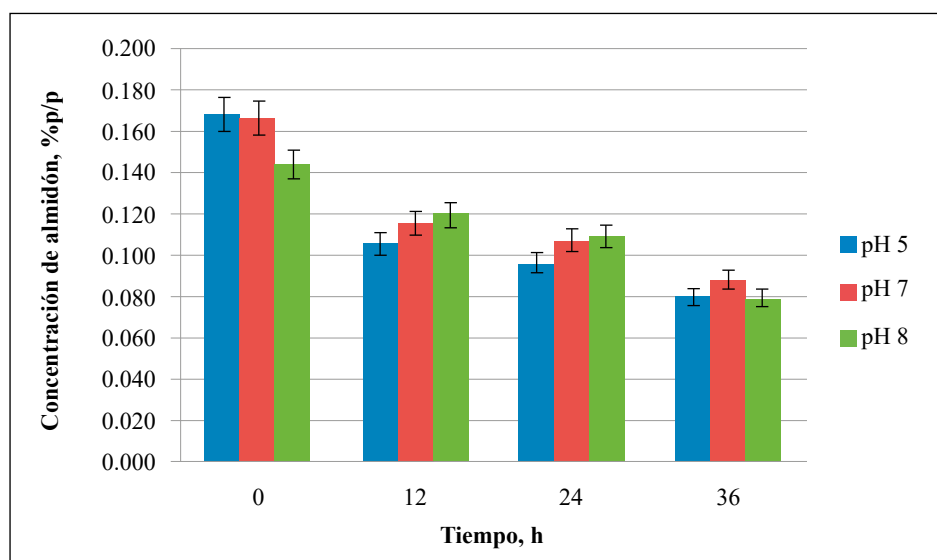


Figura 1. Consumo de almidón en los medios de cultivo con cáscaras de papa a pH de 5,0, 7,0 y 8,0. La concentración de almidón se evaluó a las 0, 12, 24 y 36 h de fermentación.

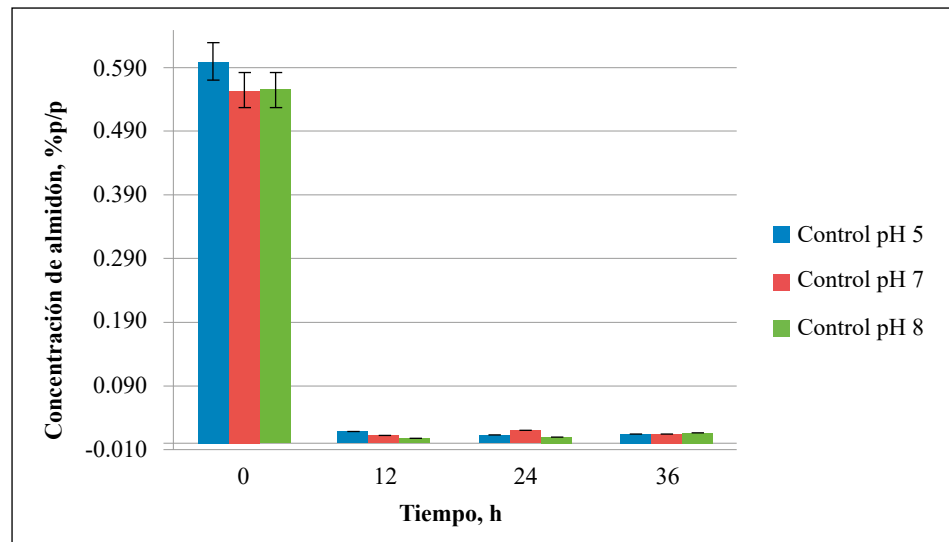


Figura 2. Consumo de almidón en los medios de cultivo de caldo de almidón al 1 % p/v a pH de 5,0, 7,0 y 8,0. La concentración de almidón se evaluó a las 0, 12, 24 y 36 h de fermentación.

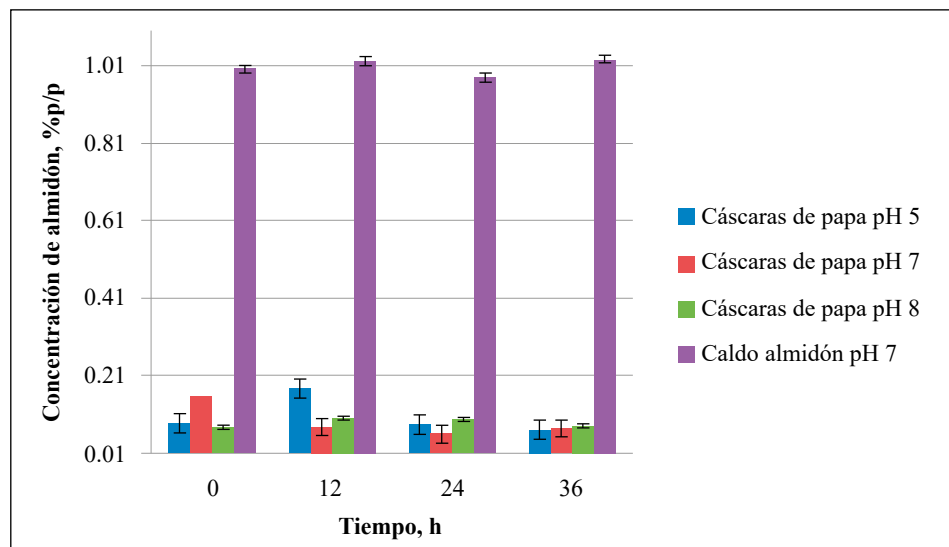


Figura 3. Concentración de almidón para los medios y el control negativo. Estos medios no se inocularon. La concentración de almidón se evaluó a las 0, 12, 24 y 36 h de fermentación.

de fermentación, ya que se ha encontrado que a concentraciones $\leq 0,1$ % de almidón en el medio este permanece constante (Smerilli, *et al.*, 2015), lo que sugiere que la producción de amilasas disminuye debido a la reducción de la concentración del sustrato. Esto también se evidenció en el presente estudio, pues las concentraciones de almidón de los medios evaluados permanecieron entre $0,08 \pm 0,005$ y $0,09 \pm 0,021$ % p/v durante las últimas 12 horas de análisis (Figura 1).

Producción de amilasas

Las amilasas producidas por *B. amyloliquefaciens* (A16) a partir de cáscaras de papa con 0,16 % de almidón a las 36 horas de fermentación presentaron mayor actividad amilolítica cuando el pH del medio de cultivo se ajustó a 5,0. Según los resultados del ANOVA de un factor con un nivel de significación de 0,01, no se registraron diferencias significativas

entre la actividad amilolítica de los extractos enzimáticos obtenidos en los medios con cáscaras de papa a diferentes pH y el caldo de almidón ($p=0,054$) en cada período de tiempo evaluado. Según los resultados de esta prueba, las amilasas producidas en el sustrato con cáscaras de papa presentaron actividades enzimáticas comparables a las de las enzimas obtenidas en el caldo de almidón empleado como control positivo. Ello indica que el almidón disponible en los residuos de cáscaras de papa es una alternativa de bajo costo para la obtención de amilasas, pues evita el uso de almidón comercial, reduciendo así los costos de producción y el impacto ambiental.

La actividad amilolítica se evaluó a las 0, 12, 24 y 36 horas de fermentación y se evidenció que con *B. amyloliquefaciens* a un pH de 5,0 se obtuvo el mayor consumo de almidón (**Figura 1**) y la mayor actividad amilolítica (**Figura 4**), lo que coincide con un estudio de **Quintero, et al.** (2010) en el que los pH óptimos para la producción de amilasas a partir de microorganismos de este mismo género fluctuaron entre 5,0 y 7,0.

La actividad enzimática de las amilasas obtenidas a pH de 5,0, 7,0 y 8,0 (**Figura 4**) fue superior a las reportadas (1,00 U/mL a 2,50 U/mL) para las enzimas producidas por *Pseudomonas stutzeri* después de 30 horas de cultivo en medios con el mismo rango de pH y con una concentración de almidón entre 0,2 % p/v a 1,0 % p/v (**Dutta, et al.**, 2016). Asimismo, los resultados de las actividades amilolíticas del presente estudio fueron superiores a las obtenidas por **Jadhav, et al.** (2013) a partir de *Bacillus* sp. en un medio preparado con extracto de cáscaras de papa al 50 % de p/v luego de 48 horas de fermentación, que resultó en 0,8 U/mL y 0,7 U/mL de amilasas usando un medio con cáscaras de papa y suplemento de peptona. **Olanbiwoninu & Fasiku** (2015) obtuvieron 5,4 U/mL de amilasas a partir de *B. pumilus* y de 3,9 U/mL utilizando *B. subtilis* en medios con batata fermentados a 55 °C. Por otro lado, en fermentaciones en estado sólido (SSF) de este mismo residuo, se han evidenciado menores actividades amilolíticas, con un máximo de 3,05 U/mL a un pH de 7,0 (**Obi, et al.**, 2019). Sin embargo, **Abd-Elhalem, et al.** (2015) fermentaron con *B. amyloliquefaciens* durante 30 horas y obtuvieron nivel de amilasas de 155,2 U/mL a partir de residuos de papa con 2,0 % de almidón, concentración mayor a la evaluada en este estudio.

Las amilasas producidas en caldo de almidón al 1,0 % de p/v y pH de 5,0, 7,0 y 8,0 (controles positivos) tuvieron el mismo comportamiento que los medios con cáscaras de papa en los que la mayor actividad amilolítica se obtuvo a un pH 5,0 (**Figura 5**). Las

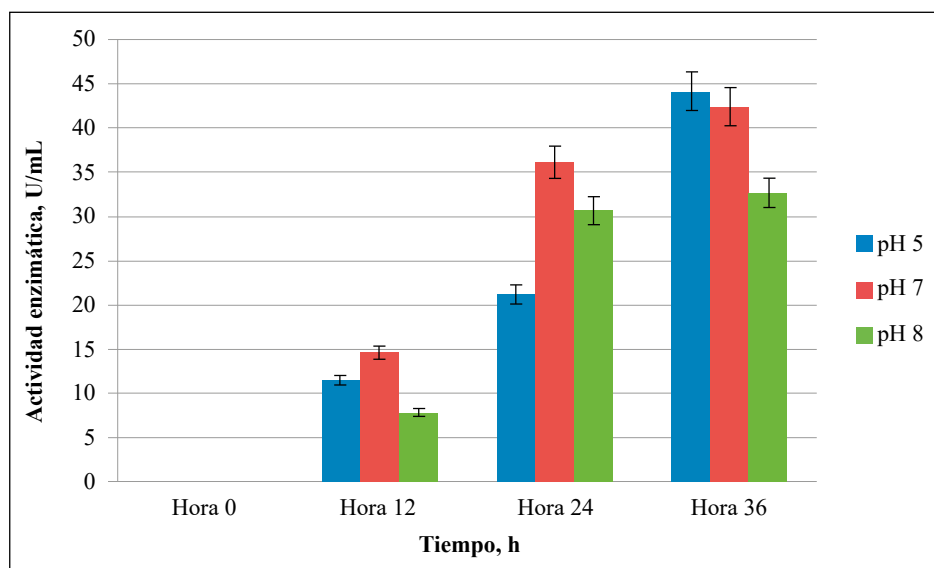


Figura 4. Actividad enzimática de las amilasas producidas en medios con cáscaras de papa a pH de 5,0, 7,0 y 8,0

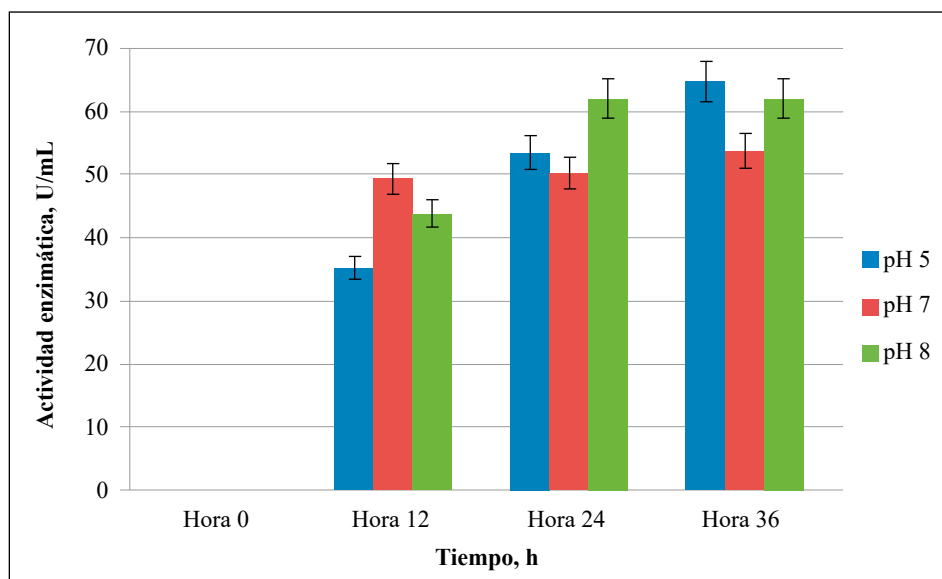


Figura 5. Actividad enzimática en el tiempo de los medios de control a pH de 5,0, 7,0 y 8,0

amilasas obtenidas en el medio de control a un pH de 5,0 presentaron una actividad comparable a las de las enzimas extraídas en una fermentación a un pH de 7,0 utilizando una cepa de *B. amyloliquefaciens* y empleando como control un medio preparado con almidón soluble al 1,0 % p/v, con lo que se registraron 78,2 U/mL luego de 36 horas de incubación (Abd-Elhalem, *et al.*, 2015).

Las actividades amilolíticas obtenidas después de las 24 horas de fermentación a partir de *B. amyloliquefaciens* A16 en caldo de almidón al 1,0 % p/v fueron superiores (Figura 5) a las de las amilasas producidas a partir de *Aspergillus niger* (≈ 50 U/mL) en un medio preparado con salvado de trigo hidrolizado a 0,6 % p/v de almidón a 28 °C durante cuatro días, resultados reportados en un estudio piloto en el cual se evaluaba el potencial comercial de estas amilasas (Khalid-Bin-Ferdaus, *et al.*, 2018). Estos datos sugieren que las amilasas del aislamiento A16 tienen potencial para emplearse en procesos industriales, con la ventaja de que se producen a partir de sustratos sin tratamiento previo y con bajas concentraciones de almidón. Además, *B. amyloliquefaciens* A16 es de fácil cultivo y rápido crecimiento, lo que reduce los tiempos de fermentación.

Los medios con cáscaras de papa se formularon en una concentración de almidón de 0,16 % p/v porque, debido a la gelificación del almidón, por encima de esta concentración el medio se hacía más viscoso y en este estudio se había propuesto hacer las fermentaciones en estado líquido. Los medios de control (caldo de almidón a 1 % p/v) presentaron mayor actividad amilolítica (Figura 5) en comparación con los medios preparados con cáscaras de papa (Figura 4), lo que se debe a la mayor disponibilidad de sustrato en los medios de control, pues la adición de almidón soluble en medios líquidos normalmente mejora la producción de amilasas (El-Fallal, *et al.*, 2012).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad de la producción de amilasas en medios líquidos con cáscaras de papa utilizando una cepa de *B. amyloliquefaciens* con diferentes pH. Los resultados del estudio demostraron que con estos residuos agroindustriales se produjeron amilasas con actividades que fluctuaron entre $32,6 \pm 0,61$ y $44,2 \pm 0,21$ U/mL después de 36 horas de fermentación y que la mayor producción de enzimas se obtuvo cuando el sustrato se ajustó a un pH de 5,0. Estas actividades son comparables a las obtenidas en otros estudios y a las producidas en caldo de almidón al 1,0 % p/v, lo que demuestra que el aislamiento de *B. amyloliquefaciens* A16 es una cepa promisoriosa para la producción de amilasas a partir de residuos de papa.

Conclusiones

Los residuos de cáscaras de papa pueden ser aprovechados como sustratos para la producción de amilasas en fermentación sumergida a partir de la cepa *B. amyloliquefaciens* A16 aislada de suelos de humedales de Bogotá. Estos residuos son una fuente de almidón de fácil acceso que, tratados para la formulación de medios de cultivo con concentraciones de almidón del 0,15 % p/v, permiten la obtención de amilasas con actividades enzimáticas similares a las producidas en medios de cultivo preparados con almidón hidrosoluble al 1,0 % p/v y a las obtenidas en otros estudios. Se comprobó que tanto el sustrato como la cepa bacteriana evaluados en este estudio podrían ser una alternativa para la producción de amilasas a nivel industrial.

Agradecimientos

A los directivos, aprendices, técnicos de laboratorio e instructores de SENNOVA y del Centro de Gestión Industrial (CGI) del SENA, donde se llevó a cabo este estudio.

Contribución de los autores

EMSC: realizó el diseño experimental del proyecto y desarrolló ensayos preliminares. Así mismo, revisó, comprobó y documentó los protocolos; JPHM, estableció y realizó los ensayos de caracterización fisicoquímica. consolidó los resultados. EMSC y JPHM realizaron la escritura, revisión y ajustes del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Abd-Elhalem, B., El-Sawy, M., Gamal, R., Abou-Taleb, K.** (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*. **60** (2): 193-202.
- Bertoft, E.** (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy*. **7** (56): 1-29.
- Bryjak, J.** (2003). Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilization on acrylic carriers. *Biochemical Engineering Journal*. **16**: 347-355.
- Buitrago, S., Sánchez, E., Guerrero, H.** (2014). Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. *Revista SENNOVA*. **1** (1): 148-155.
- Dutta, P., Deb, A., Majumdar, S.** (2016). Optimization of the Medium for the Production of Extracellular Amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 Isolated from Municipal Solid Waste. *International journal of microbiology*, 2016, 4950743. <https://doi.org/10.1155/2016/4950743>
- El Enhasy, H.** (2007). Bioprocess development for the production of alpha amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and fed-batch cultures. *Research Journal of Microbiology*. **2** (7): 560-568.
- El-Fallal, A., Abou, M., El-Sayed, A., Omar, N.** (2012). Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. En C. Chang, *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (p. 459-488). IntechOpen.
- Englyst, K., Hudson, J., Englyst, N.** (2006). Starch Analysis in Food. En M. Meyers, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (p. 4246-4262). John Wiley & Sons Ltd. Accedido entre agosto y septiembre de 2019. doi:10.1002/9780470027318.a1029
- Gerena Baron, F.** (2013). Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* L var valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad diacol capiro (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos. Repositorio Institucional UNAD. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2019. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/1528>
- Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J., Qadeer, M.A.** (2003). Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Journal Bioresource Technology*. **87**: 57-61.
- Jadhav, S., Kataria, P., Bhise, K., Chougule, S.** (2013). Amylase Production from Potato and Banana Peel Waste. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **2** (11): 410-414.

- Karnwal, A. & Nigam, V.** (2013). Production of amylase enzyme by isolated microorganisms and its application. *International Journal of Pharmacy & Bio-Sciences*. **3**: 354-360.
- Khalid-Bin-Ferdous, K., Hossain M, F., Mansur, S., Sajib, S., Miah, M., Faisal, M., Reza, M.** (2018). Commercial production of alpha amylase enzyme for potential use in the textile industries in Bangladesh. *International Journal of Biosciences*. **13** (4): 149-157.
- Liang, S. & McDonald, A.** (2014). Chemical and Thermal Characterization of Potato Peel Waste and Its Fermentation Residue as Potential Resources for Biofuel and Bioproducts Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **62**: 8421-8429.
- Lizarazo, S., Hurtado, G., Rodríguez, L.** (2015). Physicochemical and morphological characterization of potato starch (*Solanum tuberosum* L.) as raw material for the purpose of obtaining bioethanol. *Agronomía Colombiana*. **33** (2): 244-252.
- Londoño-Posso, D.** (2013). Validación del método de determinación de calcio y magnesio por espectroscopia de absorción atómica de llama para el laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. Repositorio UTP. Fecha de consulta: 15 agosto de 2019. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3406>
- Magallanes-Cruz, P., Flores-Silva, P., Bello-Pérez, L.** (2017). Starch Structure Influences Its Digestibility: A Review. *Journal of Food Science*. **82** (9): 2016-2023.
- Masson, L.** (1994). Análisis proximal de calcio y fosforo en harinas de pescado. Fecha de consulta: agosto y septiembre de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/3/ab482s/AB482S02.htm>
- Nigam, P. & Singh, D.** (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microbial Technology*. **17** (9): 770-778.
- Obi, N., Okezie, O., Ezugwu, A.** (2019). Amylase Production by Solid State Fermentation of Agro-industrial Wastes Using *Bacillus* species. *European Journal of Nutrition & Food Safety*. **4**: 408-414.
- Olanbiwoninu, A. & Fasiku, S.** (2015). Production of bacterial amylases and cellulases using sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) peels. *African Journal of Biochemistry Research*. **9** (9): 104-109.
- Ortiz, I., Álvarez, V., Cervantes, G., Valenzuela, L., Potisek, M., Chávez, J.** (2015). Concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculos de *Caladium bicolor* en diferentes etapas fenológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. **6** (3): 483-494.
- Pedroza, A. & Matiz, A.** (2007). Aislamiento y selección de microorganismos productores de amilasas y celulasas . En A. Pedroza, A. Matiz, B. Quevedo, & A. Aguirre, Manual de introducción a la biotecnología (p. 118). Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Peñaranda, L., Montenegro, S., Giraldo, P.** (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. **8** (2): 141-150.
- Quintero, M., Montoya, O., Gutiérrez, P.** (2010). Purificación y caracterización de una amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BM1. *Dyna*. **77** (162): 31-38.
- Robyt, J.** (1984). Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. En R. Whistler, J. Bemiller, & E. Paschall, *Starch: Chemistry and Technology* (p. 87-123). London: Academic Press.
- Romo, J., Torres, M., Orozco, F.** (2019). Economical substrates for biotechnological production of lactic acid 83 - Biotechnological valorization of agro industrial and household wastes for lactic acid production. *Revista Colombiana de Biotecnología*. **21** (1): 83 - 97.
- Sepelev, I. & Galoburda, R.** (2015). Industrial potato peel waste application in food production: a review. *Research for rural development*. **1**: 130-136.
- Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S., Fuchs, W.** (2015). Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **90**: 648-657.
- Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E.** (2007). Potential and utilization of the thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. **6** (9): 1-23.
- Yildirim-Akatin, M.** (2019). An Overview of Amylase Production by Solid State Fermentation (SSF) since 2010. *Journal of Technical Sciences*. **9** (1): 1-7.

Original article

Pyrolysis system to obtain carbonaceous material from rice husk used as a precursor

Sistema de pirólisis para obtener material carbonoso a partir de la cascarilla de arroz como precursor

✉ Javier R. Castro-Ladino*, ✉ Ana B. Vacca-Casanova, ✉ Carlos A. Cuy-Hoyos

Escuela de Ingeniería, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia

Abstract

We present the development and validation of a pyrolysis system with a controlled nitrogen atmosphere for the production of carbonaceous materials from biomass elements. Our objective was to use rice husk as a precursor to produce carbonaceous material and explore its application in different technological fields. In Colombia, over 800.000 tons of rice are produced every six months by the leading producing regions such as the Orinoquia region and the provinces of Tolima and Huila, among others. This system provides the opportunity to use agro-industrial waste such as rice husk, an environmental contaminator, and convert it into a useful and value-added material for the development of science and technology in emerging technological fields. Analyses performed using electron scanning microscopy (SEM) have shown that the synthesized material is a porous carbonaceous substance composed of irregular fibers with a hollow internal structure between 5 and 30 μm in size. The Raman spectra show a vibrational response of graphene oxide (GO) multilayer type. These results suggest the GO derived from rice husk can be a candidate for the development of applications in technological areas such as flexible electronic devices and systems, sensors, batteries, supercapacitors for energy storage, and bioremediation systems, among other technological applications.

Keywords: Carbonaceous materials; Rice husk; Pyrolysis; Graphene oxide.

Resumen

Se presenta el desarrollo y la validación de un sistema de pirólisis con atmósfera controlada de nitrógeno para la producción de material carbonoso a partir de elementos de la biomasa. El objetivo fue producir material carbonoso a partir de la cascarilla de arroz y explorar su uso en diferentes campos tecnológicos. En Colombia se producen más de 800 mil toneladas de arroz cada semestre principalmente en regiones líderes en la producción como la Orinoquia y los departamentos de Tolima y Huila. Este sistema brinda la oportunidad de utilizar residuos agroindustriales como la cascarilla de arroz que, además, afecta negativamente el medio ambiente, y convertirlo en un material útil con valor agregado para el desarrollo de la ciencia y la tecnología en campos tecnológicos emergentes. En análisis realizados mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) se ha evidenciado que el material sintetizado es un material carbonoso y poroso compuesto por fibras irregulares con estructuras internas huecas de entre 5 y 30 μm . Los espectros Raman muestran una respuesta vibracional del tipo grafeno oxidado multicapa. Estos resultados sugieren que el grafeno oxidado derivado de la cascarilla de arroz puede ser un candidato para el desarrollo de aplicaciones tecnológicas en áreas como los dispositivos y sistemas de electrónica flexible, los sensores, las baterías, los supercapacitores para almacenamiento de energía y los sistemas de biorremediación, entre otras aplicaciones tecnológicas.

Palabras clave: Material carbonoso; Cascarilla de arroz; Pirólisis; Grafeno oxidado.

Citation: Castro-Ladino JR, Vacca-Casanova AB, Cuy-Hoyos CA. Pyrolysis system to obtain carbonaceous material from rice husk used as a precursor. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):805-813, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1109>

Editor: Luis Fernando Echeverri

***Corresponding autor:**

Javier R. Castro-Ladino;
jrcastrol@unillanos.edu.co

Received: December 2, 2019

Accepted: March 8, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Introduction

Our objective was to use rice husk (RH) as a precursor to produce carbonaceous material and explore its application in different technological fields: The manufacturing of sensors and electronic devices, the optimization of photovoltaic panels to capture solar energy, as an alternative energy source, as porous biochar, and in other fields. As a first step, we developed a pyrolysis system for the thermal decomposition of biomass in a controlled nitrogen atmosphere.

Rice husk is a by-product of the threshing process for obtaining white rice and it represents approximately 23% of the initial weight of paddy rice (Della, *et al.*, 2002). It is generated when the husk of the rice grain is removed, a process that is usually carried out with rubber rollers. Studies have found that approximately one ton of RH results from every five tons of processed paddy rice (Lozano, 2020). On the other hand, when calcinated, RH ash represents between 13 and 29% of the initial weight and it is composed mainly of high-purity silicon (87-97%) (Abril & Abril, 2010) and small amounts of inorganic salts.

Until a few years ago, this waste was burned in open spaces producing air pollution with the subsequent negative impact on the environment and especially in human health. The laws and norms regulating environmental issues in Colombia, as well as the regulations issued in compliance with the Kyoto Protocol for the reduction of CO₂ emissions, prohibit the burning of this type of material in open spaces. However, the compliance with established protocols and procedures has been difficult as the husk must be burned under special conditions, there are effects on the profit margin, and the appropriate technology is lacking (Quiceno & Mosquera, 2010).

According to Quiceno & Mosquera (2010), since the 1980s, several studies have aimed at adding value to this by-product considered as waste. RH has been used as an additive for the manufacturing of cement and rubber, in the extrusion of polymers with natural fibers, in the fabrication of insulating materials, and as fuel to dry paddy rice. In Colombia, however, so far there are no reports on carbonaceous material and silica produced from this important and abundant organic precursor. Other leading rice-producing countries, such as India and China, are taking advantage of the extraordinary properties of this material and its potential applications in science and technology (Prasad & Pandey, 2012). In this context, it is worth highlighting the obtention of silicon from rice husk for the preparation of solar panels (Abril & Abril, 2010) and nanoparticles by pyrolysis (Wang, *et al.*, 2011), with potential application in areas such as biomedicine, biosensors, and solar cells.

Pyrolysis is the chemical decomposition of organic matter and other materials, except metals and glass, by heating them at high temperature in the absence of oxygen (controlled atmosphere). The chemical industry uses this process to produce activated carbon, methanol, and other wood chemicals, as well as for the transformation of medium-weight hydrocarbons into lighter products such as gasoline. These specialized uses of pyrolysis are known by different names, such as dry distillation, destructive distillation, or cracking. Pyrolysis is also used in the generation of nanoparticles (Rockstraw, *et al.*, 2005).

To validate the system, we charred rice husk samples varying the temperature and time of carbonization. We analyzed the synthesized material through scanning electron microscopy (SEM) techniques to determine its structure by means of micrographs and its elementary composition by means of X-ray scattering spectroscopy (EDS). Besides, we performed a Raman spectroscopy analysis to identify the characteristics of the synthesized material associated with the vibrational modes.

Here, we briefly describe the conditions to develop the pyrolysis system: The setting and monitoring of the temperature in the muffle and the outlet duct for pyrolytic gases, as well as of the relative humidity and the air quality in a laboratory environment, all of which are presented in detail in the supplementary material. Finally, we present and discuss the results obtained.

Materials and methods

This section describes the methods and techniques used for the acquisition and conditioning of the signals corresponding to the temperature in both the muffle and the pyroligneous gases pipe. Likewise, it characterizes the relative humidity, air quality, and temperature in the laboratory environment, along with the proportional-integral-derivative (PID) control and the virtual interface.

We developed a pyrolysis system similar to that devised by **Prías-Barragan, et al.** (2011) at the *Instituto Interdisciplinario de las Ciencias, Universidad del Quindío*, consisting of a muffle as a heating source, a reactor, a nitrogen supply network, a trap to condense the gases produced during the process and avoid environmental pollution, and a pump for vacuum generation. The temperature is the main parameter in pyrolysis processes; in this case, we developed an automatic PID temperature controller to monitor the temperature required for carbonizing the precursor material as a virtual instrumentation software application that tracks air quality, relative humidity, and temperature in the laboratory environment. **Figure 1** shows a basic scheme of the developed pyrolysis system and **figure 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818>, the control and monitoring P&D system diagram.

Temperature in the muffle, the gas outlet duct, and the laboratory environment

We monitored the temperature in the muffle, in the gas outlet duct, and in the laboratory environment. We used a type K thermocouple to measure the temperature in the reactor muffle and the gas outlet duct and a PT100 resistance temperature detector (RTD) to check it in the laboratory environment. The temperature in the muffle was the carbonization temperature of the material. This is one of the most important parameters of the process together with the carbonization time and it was conditioned and entered into the virtual instrumentation interface (VI) through the NI-9211 thermocouple input module (National Instrument, NI). The conditioning circuit and the PT100 sensor, as well as the temperature measurement system, are described in detail in the supplementary material. (**Figure 6S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818>)

Relative humidity monitoring

We monitored the relative humidity in the laboratory environment using an HS1101 capacitive sensor and then sent the signal to the VI using the NI-9201 analog voltage module. The signal conditioning circuit is shown in the supplementary material (**Figures**

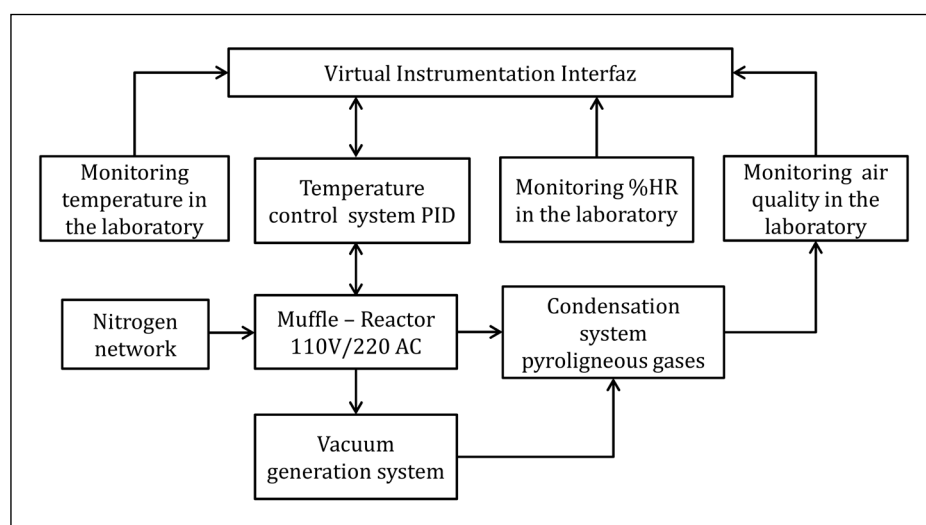


Figure 1. Block diagram of the pyrolysis system

2S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818>, 3S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818> and table 1S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818>).

Air quality in the laboratory

We monitored air quality in the laboratory environment to control the emission of pyrolygneous gases produced during the carbonization process of rice husk. We used the MQ135 resistive type electrochemical sensor (Olimex, 2017) located in the gas outlet duct; this sensor is sensitive to different gases such as NH₃, NOx, and CO₂. In the supplementary material we describe in detail the conditioning and calibration of the sensor, figures 4S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818> and 5S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1109/2818>.

Temperature control system

Temperature and carbonization times are the main parameters determining the characteristics of the carbonaceous material to be obtained. For controlling the temperature of the process, we developed a PID temperature control system to establish the number of heating ramps and their respective timing, and to raise the temperature inside the muffle to the point selected for the process. This also enabled us to establish the time this temperature level had to be kept to satisfy the carbonization time.

Virtual instrumentation interface

The virtual instrumentation interface monitored and recorded the variables involved in the carbonization process: The temperature in the muffle (process temperature: T_p) and the pyrolygneous gases exit pipe (T_{od}), the flow of nitrogen (N_f) entering the system, the relative humidity (%RH), the temperature (T_L), and the air quality (Q_a) in the laboratory environment. Figure 2 shows the flow chart of the VI developed to implement the virtual instrumentation interface.

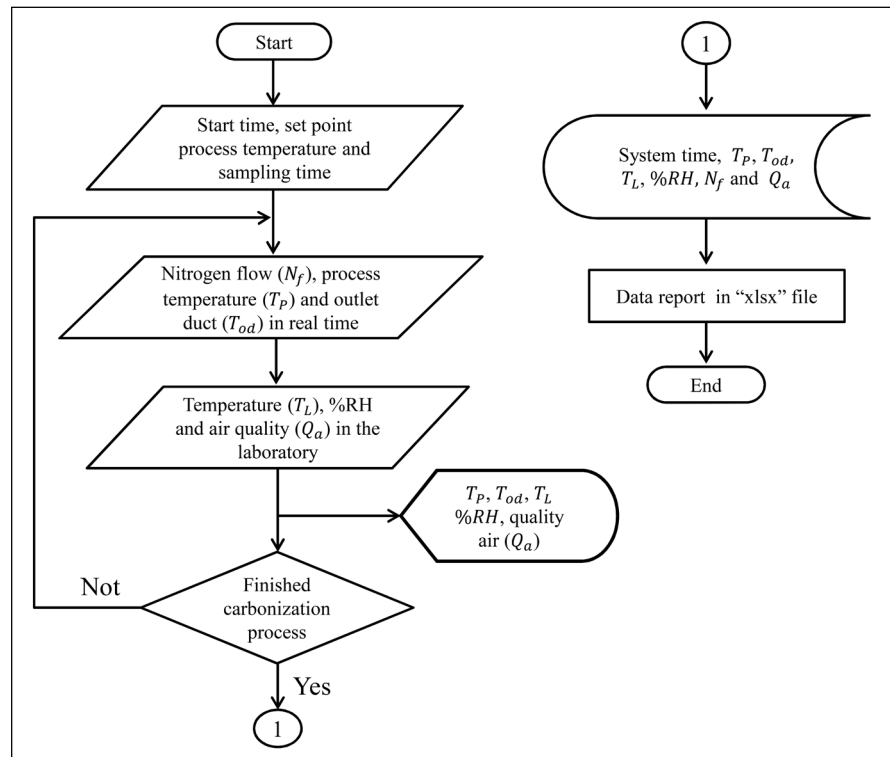


Figure 2. Flow diagram of interface VI

Validation of the pyrolysis system

To validate the pyrolysis system, we carried out the rice husk carbonization processes at different temperature levels varying the carbonization time (hours). We analyzed the samples of synthesized material using SEM techniques to determine their structure and topography, EDS to identify their elementary composition, and Raman spectroscopy to determine the characteristics associated with the vibrational modes and crystalline structure.

Results

We developed a pyrolysis system with a nitrogen-controlled atmosphere to obtain carbonaceous material from biomass precursors. The temperature of the process varied in a range of up to approximately 1000°C. We controlled the temperature by means of an automatic PID system monitored by a virtual instrument (VI) and we monitored air quality in the gas outlet pipe of the system and the relative humidity and temperature in the laboratory. **Figure 3** shows the performance of the system in four carbonization processes in terms of the processing temperature (temperature in the muffle). We adjusted the system to guarantee adequate control of the variables involved in the process.

We synthesized several samples of carbonaceous material from the rice husk during the validation of the pyrolysis system. These samples were analyzed using SEM, EDS, and Raman spectroscopy. No grinding process was performed on the samples after the pyrolysis process, i.e., the charred rice-husk flakes were removed. Our results showed that the thermal decomposition method using a pyrolysis system is a low-cost alternative to obtain graphene oxide from the rice husk (GO-RH) precursor.

Figure 4a shows an RH sample and **figure 4b** the magnified SEM micrograph of a sample processed at 700°C and carbonized during three hours (S700-3) where the tubular morphology typical of rice husk composed of internal fibers and a highly irregular surface, visible at 500 magnifications, is observed in **figure 4c**. This morphology is typical of coals obtained from rice husks as described by **Ahiduzzaman & Sadrull-Islam** (2016). As shown in **figure 4d**, these fibers are composed of internal hollow structures between 5 and 30 μm in size. This feature is typical of rice husk carbonization from 450°C on (**Ahmad-Husni, et al.**, 2014).

On the other hand, we verified the obtention of carbon and silicon by pyrolysis of the rice husk. The energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS) analyses showed that there the carbon present in the sample decreased as the carbonization time increased. The opposite occurred with the silicon content in the samples as shown in **table 1**.

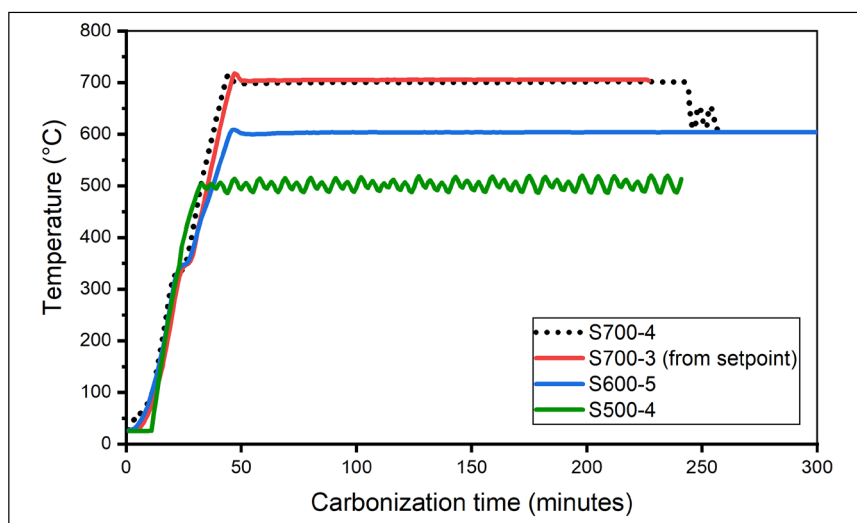


Figure 3. Performance of the pyrolysis system in four carbonization processes

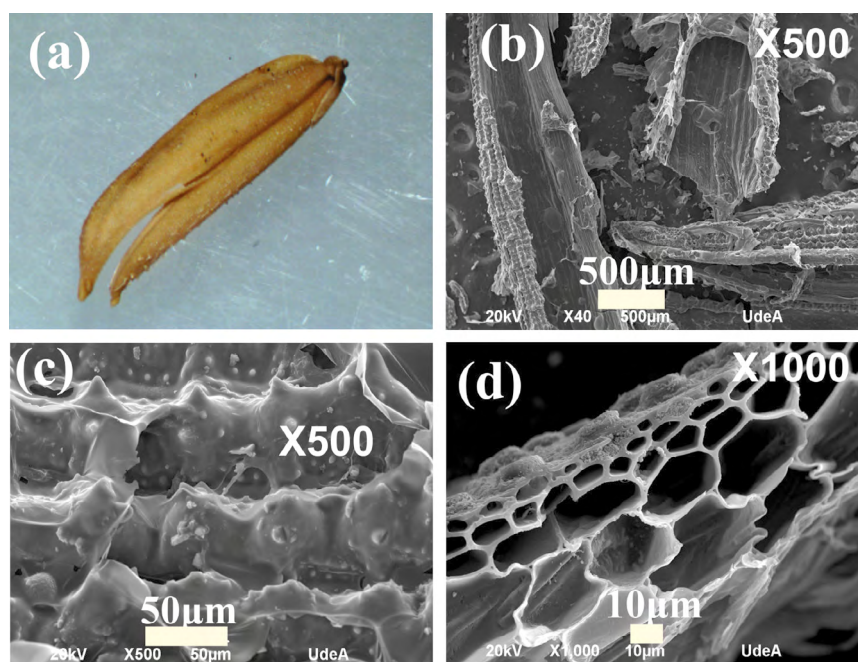


Figure 4. a. Sample rice husk. SEM micrograph of b. S700-3 at 40 x; c. S700-3 at 500 x, and d. S700-3 at 1000 x (CIDEMAT-UDEA)

Table 1. Atomic composition of samples

Atomic %	S700-3	S700-4	S700-6
Si	1.22	9.36	12.92
O	8.81	22.81	20.75
C	88.27	66.77	66.03

Raman spectroscopy is a well-established and suitable characterization tool to determine the quality of graphene and graphene oxide (GO) (Eigler & Dimiev, 2017). The Raman spectra of the carbonaceous material samples (Figures 5a and 5b) corresponded to a typical Raman GO spectrum characterized by the G band ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$) (Johra, *et al.*, 2014) showing the degree of charge transfer and the sensitivity to external electromagnetic perturbations (Souza, *et al.*, 2019) while the D band ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$) indicated the amorphous carbon species (Johra, *et al.*, 2014), as well as the formation of a graphitized structure (Priás, *et al.*, 2016). The ratio between the band intensities (I_D/I_G) increased as the pyrolysis temperature increases, which represents the transformation of a disordered structure into an ordered one (Rybarczyk, *et al.*, 2019). Figure 5c shows how the spectrum of sample S700-6 was deconvoluted in four peaks and the wide 2D and D+G bands around the 2800 cm^{-1} suggesting the presence of many graphene layers with edges, defects, and sp^2 regions (Priás, *et al.*, 2016, Johra, *et al.*, 2014; Bharathidasan, *et al.*, 2018).

Discussion

The pyrolysis system developed allowed for the generation of new materials using agro-industrial waste. In this particular case, we used rice husk, which can negatively affect the environment, to generate a carbonaceous material useful in science and technology research. The system included the monitoring of variables in the laboratory environment: Temperature, relative humidity, and air quality, important parameters for sample processing.

In the semi-quantitative analysis of the carbonaceous material obtained, the EDS analysis with an electronic scanning microscope showed that there were two main elements, carbon and silicon (**Table 1**). However, there is a high level of uncertainty given that we performed the analysis on the material as it came out of the carbonization process, i.e., without prior grinding. This analysis also showed a decrease in the carbon present in the samples as carbonization time increased.

The Raman spectra in the GO-RH samples (**Figure 5**) showed a multilayer oxidized graphene-type vibrational response with overtones strongly influenced by carbonization time and temperature, which could be attributed to the increase in the desorption of multifunctional oxides and organic compounds.

The slight modification of the G band can be attributed to voltage and temperature modifications (**Figures 5a and 5b**) associated with the degree of charge transfer and the sensitivity to external electromagnetic disturbances (**Souza, et al., 2019**). Additionally, band D can be associated with defects such as vacancies, grain boundaries, and amorphous carbon species (**Johra, et al., 2014**).

The two characteristic bands obtained confirmed the presence of conjugated bonds and carbon-carbon double bonds typical of oxidized graphene showing that in the 500 to 700 °C temperature range, the graphene oxide-type structure is very stable and structurally conformable. These results suggest that the GO derived from rice husk (GO-RH) is a potential candidate for the development of electronic devices and sensors.

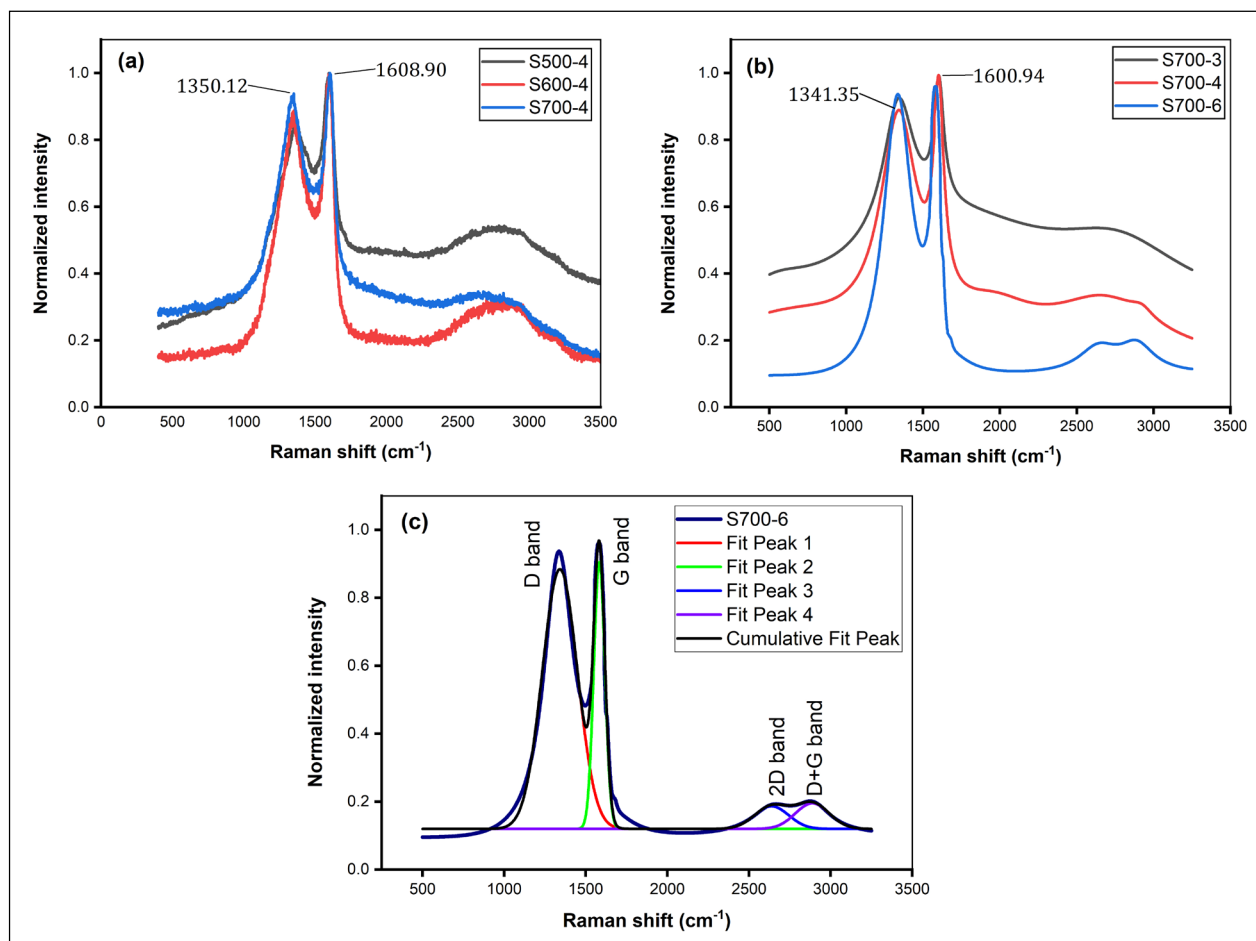


Figure 5. Raman spectrum of samples. **a.** Carbonization time: four hours varying the temperature level. **b.** Carbonization temperature: 700°C varying the carbonization time, and **c.** Deconvoluted spectrum of sample S700-6

Supplementary document

Figure 1S. P&D diagram pyrolysis system. See the figure 1S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Figure 2S. HS1101 sensor conditioning circuit. See the figure 2S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Table 1S. Hs1101 sensor response. See the table 1S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Figure 3S. Frequency response of the *HS1101*. See the figure 3S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Figure 4S. Schematic diagram of the circuit MQ135 sensor. See the figure 4S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Figure 5S. MQ-135 sensor calibration. See the figure 5S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Figure 6S. PT-100 sensor conditioning circuit. See the figure 6S in <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/1109/2818>

Author contributions

All authors participated in the development, testing, and validating of the system, as well as in the preparation and revision of the manuscript.

Conflict of interests

The authors state that they had no conflicts of interest regarding the development of the research nor the publication of the results in this article.

References

- Abril, D. & Abril, A.** (2010). Silicio a partir de cáscara de arroz para la confección de paneles fotovoltaicos. UCMAule Revista Académica. **38**: 11-30.
- Ahiduzzaman Md, A.K.M. & Sadrull-Islam, A.K.M.** (2016). Preparation of 40 porous bio-char and activated carbon from rice husk by leaching ash and chemical activation. Springer Plus. **5**: 1248-1261.
- Ahmad-Husni, M.H., Clasoston, N., Amran, M.S.** (2014). Effects of pyrolysis temperature on the physicochemical properties of 45 empty fruit bunch and rice husk biochars. Waste Management Research. **4** (32): 331-339.
- Bharathidasan, P., Idris, M. B., Kim, D., Sivakkumar, S., Devaraj, S.** (2018). Enhanced capacitance properties of nitrogen doped reduced graphene oxide obtained by simultaneous reduction and nitrogen doping. FlatChem. **11**: 24-31. Doi: 10.1016/j.flatc.2018.10.001
- Della, V., Kühn, I., & Hotza, D.** (2002). Rice husk as an alternate source for active silica production. Materials Letters. **57**: 818-821.
- Eigler, S. & Dimiev, A.M.** (2017). Characterization Techniques. In Graphene Oxide fundamentals and applications (1^a ed., pp.100-103). Ayrat M. Dimiev and Siegfried Eigler (Editors). West Sussex. Wiley.
- Johra, F. T., Lee, J., Jung, W.** (2014). Facile and safe graphene preparation on solution-based platform. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. **20** (5): 2883-2887. Doi: 10.1016/j.jiec.2013.11.022
- Lozano, C.** (2020). Alternativa de usos de la cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) en Colombia para el mejoramiento del sector productivo y la industria, tesis de pregrado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Yopal - Casanare, p 32. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Olimex.** Technical Data MQ-135 Gas Sensor. (2017). Accessed on: August, 2017. Available at: <https://www.olimex.com/Products/Components/Sensors/SNSMQ135/resources/SNS-MQ135.pdf>
- Prasad, R. & Pandey, M.** (2012). Rice husk ash as a renewable source for the production of value-added silica gel and its applications: An overview. Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis. **7** (1): 1-25.
- Prías Barragán, J., Rojas González, C., Echeverry Montoya, N., Fonthal, G., & Ariza Calderón, H.** (2011). Identificación de las variables óptimas para la obtención de carbón activado a partir del precursor guadua *Angustifolia kunt.* Revista Academia Colombiana de Ciencias. **25** (135): 157-166.

- Prías-Barragán, J. J., Gross, K., Ariza-Calderón, H., Prieto, P.** (2015). Synthesis and vibrational response of graphite oxide platelets from bamboo for electronic applications. *physica status solidi (a)*. **213** (1): 85-90. Doi: 10.1002/pssa.201532433
- Quiceno, D. & Mosquera, M.** (2010). Alternativas tecnológicas para el uso de la cascarilla de arroz como combustible. Trabajo de grado, Universidad Autónoma de Occidente.
- Rockstraw, D.A., Pignali K.C., Deng, S.** (2005). Silver nanoparticles from ultrasonic spray pyrolysis of aqueous silver nitrate. *Aerosol Science and Technology*. **39** (10): 1010-1014.
- Rybarczyk, M. K., Li, Y., Qiao, M., Hu, Y., Titirici, M., Lieder, M.** (2019). Hard carbon derived from rice husk as low cost negative electrodes in Na-ion batteries. *Journal of Energy Chemistry*. **29**: 17-22. Doi: 10.1016/j.jechem.2018.01.025
- Souza, C. B. de, Nakagawa, M. A., Vargas, L. R., Hilário, R. B., Impère, A. G. D., Matsushima, J. T., Quirino, S. F., Gama, A. M., Baldan, M. R., & Gonçalves, E. S.** (2019). Evolution of dielectric properties of thermally reduced graphene oxide as a function of pyrolysis temperature. *Diamond and Related Materials*. **93**: 241-251. Doi: 10.1016/j.diamond.2019.01.015
- Wang, W., Martin, J. C., Zhang, N., Ma, C., Han, A., & Sun, L.** (2011). Harvesting silica nanoparticles from rice husk. *Journal Nanoparticle Research*. **13**: 6981-6990.

Artículo original

Extracción selectiva de oro mediante membranas basadas en un nuevo material polimérico con sitios activos complejantes

Selective gold extraction using membranes based on a new polymeric material with complex active sites

© Carmen Lucía López-Solis¹, © Denis Gabriel Córdoba-Jiménez^{1,*},
© Germán Cuervo-Ochoa¹, © Jaime Martín-Franco², © Tania Milena Gutiérrez-Valencia¹

¹Grupo de Investigación en Procesos Electroquímicos, GIPEL, Departamento de Química, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

²Grupo de Investigación Química de Productos Naturales, QPN, Departamento de Química, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

Resumen

Se sintetizó un nuevo polímero orgánico con características que le permiten actuar como agente extractante de iones metálicos. Se fabricaron membranas a partir de policloruro de vinilo (PVC), plastificante éter de 2 nitrofenil octilo (NPOE) y polímero sintetizado que se emplearon en la extracción de oro a partir de disoluciones acuosas del metal. Se estudió, además, el efecto de la adición de tetrafenilborato de sodio (Na-TFB) para mejorar el intercambio iónico entre la solución de trabajo y la membrana fabricada. Se determinó la composición y el espesor de la membrana con la cual se obtuvo el mayor porcentaje de extracción de oro, así como la selectividad del material hacia Au³⁺ en presencia de otros iones metálicos (Cu²⁺, Pb²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺ y Al³⁺), cada uno con una concentración inicial de 1,4x10⁻⁴ M. Los resultados mostraron que en un ciclo se alcanzaron porcentajes de extracción cercanos al 80 % del contenido inicial de la solución (1x10⁻⁴ M), con la ventaja de que se pudo reutilizar la misma membrana en tres ciclos sin pérdidas apreciables de eficiencia.

Palabras clave: Polímero; Membrana; Extracción; Oro.

Abstract

We synthesized a new organic polymer whose characteristics allow it to act as an extracting agent for metal ions. Membranes were made from polyvinylchloride (PVC) and 2 nitrophenyl octyl ether plasticizer (NPOE) together with the synthesized polymer and were used to extract gold from aqueous solutions of the metal. Additionally, we added sodium tetraphenylborate (Na-TFB) to improve the ion exchange between the working solution and the manufactured membrane. We determined the composition and membrane thickness showing the highest percentage of gold extraction, as well as the material selectivity towards Au³⁺ in the presence of other metal ions (Cu²⁺, Pb²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, and Al³⁺), each with an initial concentration of 1.4x10⁻⁴ M. The results showed percentages close to 80% of the initial content of the solution (1x10⁻⁴ M) extracted in one cycle; besides we were able to reuse the same membrane during three cycles without appreciable losses of efficiency.

Keywords: Polymer; Membrane; Extraction; Gold.

Introducción

La tecnología actual requiere el empleo de grandes cantidades de metales preciosos que son extremadamente útiles por sus excepcionales propiedades químicas y físicas. Metales como el oro (Au), el platino (Pt), el paladio (Pd) y la plata (Ag) se utilizan en los dispositivos electrónicos y en la industria química como catalizadores en reacciones para la obtención de productos de alto valor comercial, sanitario o industrial (**Fotoohi &**

Citación: López-Solis CL, Córdoba-Jiménez DG, Cuervo-Ochoa G, *et al.* Extracción selectiva de oro mediante membranas basadas en un nuevo material polimérico con sitios activos complejantes. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):814-827, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.938>

Editor: Edgar Páez

***Correspondencia:**

Denis Gabriel Córdoba Jiménez;
denisgabriel@unicauca.edu.co

Recibido: 14 de julio de 2019

Aceptado: 21 de febrero de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Mercier, 2015; **Braibant, Bourgeois, Meyer**, 2018). Su relativa escasez, elevado costo y creciente demanda en varios sectores de la industria han llevado a los investigadores de diversos campos a dedicar sus esfuerzos a la recuperación de metales, por lo que los métodos para su extracción a partir de soluciones acuosas han cobrado gran importancia en las últimas décadas.

Los métodos más comúnmente utilizados para la recuperación de metales a partir de soluciones acuosas son la extracción con disolventes y la precipitación química. En el caso específico del oro, los sistemas tradicionalmente usados han sido la lixiviación con cianuro de sodio y la extracción con mercurio. La primera se ha empleado durante más de 100 años, pero el cianuro es muy tóxico y la elevada cantidad de residuos debidos a fugas y derrames accidentales tiene gran impacto en el medio ambiente, principalmente en los ríos (**Hilson & Monhemius**, 2006). En cuanto al mercurio, el estado colombiano ha prohibido su uso para la extracción de oro por los graves problemas sanitarios y ambientales que genera.

En este contexto, se han desarrollado nuevas estrategias económicamente viables, amigables con el medio ambiente y funcionalmente eficientes para la extracción de metales (**Gohil, et al.**, 2006; **Tan, et al.**, 2017; **Ata, et al.**, 2008; **Hosseini, et al.**, 2010; **Fu & Wang**, 2011; **Wang, et al.**, 2017; **Judd**, 2017). En los estudios recientes en busca de alternativas a la extracción de la hidrometalurgia convencional se destacan dos procesos que cobran cada vez más relevancia: el primero es el uso de tiourea y tiosulfato para la extracción selectiva de oro (**Zhang, et al.**, 2014) y el segundo es el empleo de membranas y absorbentes fabricados con polímeros que contienen agentes quelantes. Esta última alternativa ha llamado la atención debido a su alta selectividad y eficiencia en términos del porcentaje de extracción de metales a partir de soluciones acuosas. Además, las membranas presentan la ventaja de ser fáciles de manejar y generan una cantidad significativamente menor de residuos en comparación con los métodos convencionales, pueden ser usadas en varios ciclos y su selectividad se puede modificar según el agente quelante o los grupos funcionales incorporados (**Tofan, et al.**, 2017).

Hay pocos estudios sobre membranas poliméricas complejantes de metales que hayan sido sintetizadas de tal forma que contengan un grupo funcional por unidad monomérica. **Villalobos** (2014) sintetizó politiosemicarbazida en la fabricación de una membrana para la extracción de oro. Cada unidad monomérica de este polímero contiene dos grupos tiosemicarbazida que forman un sitio activo con una eficiencia de extracción mayor al 97 % empleando la membrana en procesos de permeación impulsada por presión.

En estudios sobre la recuperación de metales a partir de la chatarra electrónica, **Kubota & Kono** (2019) utilizaron N-[N,N-di(2-etilhexil) aminocarbonilmetil] glicina como extractante en membranas poliméricas de inclusión (MPI) para la extracción de Au^{3+} a partir de una solución de 2 M de ácido clorhídrico y lograron un porcentaje de extracción del 96 %. Aunque se han reportado porcentajes de extracción altos con este tipo de membranas, tienen problemas de estabilidad y vida útil debido a la pérdida de materiales y la degradación de sus componentes durante el uso, lo que las hace costosas para la implementación a gran escala (**Song, et al.**, 2018).

En otros estudios (**Monier, et al.**, 2014) se ha podido establecer que la selectividad de un agente extractante frente a un ion metálico en particular, se relaciona con el tamaño y la carga del ion que se extrae. No obstante, un extractante debe mantener características básicas, como la presencia de heteroátomos con pares electrónicos libres apropiadamente distribuidos en la estructura molecular, que permitan la formación de complejos de los iones metálicos de interés.

Los heteroátomos presentes en el agente complejante generan una cavidad cuyo tamaño depende de la distribución, las distancias y la movilidad de los grupos que los contienen. El tamaño de la cavidad permite seleccionar iones metálicos que, por el tamaño de su radio iónico, se ajusten y puedan formar un complejo con relativa estabilidad. Sin embargo, cuanto mayor sea la carga del ion metálico, el complejo formado será más estable debido, probablemente, a que reciben con mayor facilidad los pares electrónicos del ligando en comparación con los iones metálicos de menor carga.

Estos nuevos materiales deben ser sintetizados y probados para obtener una completa extracción de metales de alto valor económico y, además, su uso puede extenderse a procesos de purificación del agua. En este estudio se sintetizó y se analizó un nuevo polímero extractante con grupos funcionales amino, imino e hidroxilo para fabricar membranas y determinar su selectividad y eficiencia en la extracción de oro a partir de soluciones acuosas.

Materiales y métodos

Los materiales y reactivos, así como el procedimiento para la obtención de poli-N-(2-((2-hidroxibenciliden) amino) ciclohexil)-4-pentenamida (P2,2HACPA) y su ruta de síntesis, se presentan en la **figura 1**. Esta sustancia se utilizó posteriormente en la extracción selectiva de oro como se describe en el material suplementario.

Fabricación de las membranas para extracción de Au^{3+}

Se empleó P2,2HACPA para la fabricación de las membranas posteriormente empleadas en la extracción de oro a partir de disoluciones acuosas del metal. Los componentes usados en la fabricación de las membranas fueron: P2,2HACPA, entre 20 y 50 %, como extractante; policloruro de vinilo (PVC), entre 24 y 60 %, como material estructural, y 2-nitrofenil octil éter (NPOE), entre 24 y 47 %, como plastificante. Los porcentajes se calcularon con base en un peso total de 0,5 g de membrana. Con el fin de mejorar el intercambio de iones metálicos entre la solución de trabajo y las membranas, en algunas de ellas se incorporó entre 2,9 y 4,8 % de Na-TFBa como sal intercambiadora. En este caso se esperaba que el ion Na^+ saliera de la membrana hacia la solución, en tanto que los iones Au^{3+} ingresarían desde la solución a la membrana. La composición se varió hasta lograr un material apropiado para obtener un elevado porcentaje de extracción del ion metálico de interés, pero también la consistencia, la facilidad de manipulación y la resistencia adecuadas con respecto a la presión ejercida por las soluciones de trabajo. Todos los componentes de la membrana se disolvieron en 2 mL de tetrahidrofurano (THF) y se mezclaron hasta obtener un sistema homogéneo. La solución se esparció sobre una superficie de vidrio y se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente, con el fin de eliminar por completo el disolvente. Con el mismo procedimiento se prepararon membranas de 50, 100 y 200 ± 5 μm de espesor medidos con un calibre de Vernier para evaluar el efecto de este parámetro sobre el porcentaje de extracción de Au^{3+} .

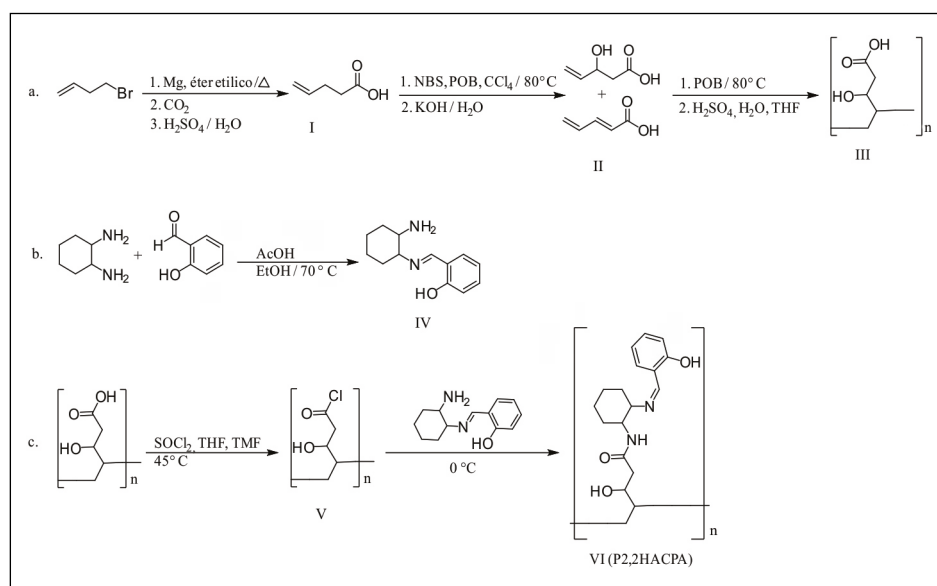


Figura 1. Ruta sintética del polímero P2,2HACPA

Extracción de oro con las membranas fabricadas

Se construyeron dos celdas cúbicas de polipropileno con capacidad de 85 cm³ cada una (**Figura 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2824>). En una celda se adicionaron 75,0 mL de solución de partida de Au³⁺ en forma de ácido cloroáurico 5x10⁻⁴ M (solución donadora). En la otra celda se adicionaron 75,0 mL de solución de 0,1 M de KNO₃ (solución receptora). En las dos celdas se ajustó el pH a 4,0 con una solución de 2,5 M de hidróxido de potasio en la solución donadora y con 2,5 M de ácido clorhídrico en la solución receptora. Las dos celdas se conectaron mediante un tubo de PVC de 1,50 cm de diámetro en el cual se incrustó una sección de la membrana sintetizada del mismo diámetro que sirvió como barrera entre las dos soluciones. El sistema se mantuvo en contacto durante 108 horas con agitación magnética a 600 rpm. Cada 12 horas se tomaron alícuotas de 2,00 mL de la solución donadora y de la solución receptora. Las alícuotas se diluyeron hasta 10,00 mL con una solución de 0,1 M de KNO₃ a un pH de 4,0 y sin más tratamiento se introdujeron en el espectrofotómetro de absorción atómica, con el fin de determinar la concentración de Au³⁺ en cada solución.

Para evaluar la vida útil de la membrana, se llevaron a cabo tres ciclos de extracción de Au³⁺ con una duración de 108 horas por ciclo. Para la recuperación de la membrana entre ciclos, se agregó una solución de 0,2 M de tiourea y 1 M de HCl en agitación magnética a 600 rpm durante una hora para lixiviar el oro retenido.

Efecto del pH de las soluciones en la membrana

Para determinar el efecto del pH de las soluciones, se colocó la membrana en medio de las dos celdas como se indicó anteriormente. En cada celda se adicionaron 75,0 mL de solución de 0,1 M de KNO₃ y se ajustó el valor del pH a 6,0. Con el fin de comparar el comportamiento del sistema en presencia y ausencia de tampón, el valor del pH se ajustó inicialmente con 0,05 M de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) y ácido clorhídrico, en tanto que en otra serie de experimentos se empleó solamente una solución de 2,5 M de ácido clorhídrico. A cada lado de la membrana se puso un electrodo de referencia de Calomel. Los electrodos de referencia se conectaron a un medidor de pH Orion Star™ A211 Thermo Scientific™ bajo agitación constante y se midió el potencial de la membrana cada 5 segundos. Se disminuyó el valor de pH de una de las soluciones en una unidad cada 20 minutos hasta llegar a un valor de pH de 1,0 utilizando una solución de 2,5 M de ácido clorhídrico y registrando continuamente el potencial de la membrana.

Evaluación del grado de selectividad de la membrana

Se evaluó el grado de selectividad de la membrana con respecto a siete iones metálicos comunes en soluciones acuosas o que pueden tener algún grado de interferencia con Au³⁺. Para ello se empleó la membrana de mejor desempeño en la extracción de oro. En una de las celdas de trabajo se adicionaron 75,0 mL de solución de 0,1 M de KNO₃ con los iones Au³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺ y Al³⁺, cada uno en una concentración de 1x10⁻⁴ M y un pH ajustado a 4,0 usando 2,5 M de hidróxido de potasio. En el otro compartimiento se agregó una solución de 0,1 M de KNO₃ con un pH ajustado a 4,0 utilizando 2,5 M de ácido clorhídrico y se mantuvo la agitación magnética a 600 rpm durante 72 horas. Se tomaron alícuotas de 5,0 mL al inicio y al final del proceso y se diluyeron en un volumen de 10 mL con agua desionizada. Se determinó la variación de la concentración de cada uno de los iones metálicos en las dos disoluciones mediante espectrofotometría de absorción atómica y con los resultados obtenidos se determinó la selectividad de la membrana hacia Au³⁺ comparada con los demás iones.

Resultados y discusión

Caracterización del P2,2HACPA y los intermediarios

Ácido 4-pentenoico (I). Líquido de color amarillo claro. IR (ATR): λ (cm⁻¹) 2400-3100 (st, OH), 1709 (st, C=O), 1415 (d, C-H), 1257 (st, C-O), 910 (d, OH), 1641 (st, C=C), 3079 (st, C=C-H), 933 (d, C=C-H), 2978 (st.asym, CH₂), 2926 (st.asym, CH₂), 1415 (d, C-H). MS-

IE: (m/z) 100,06 ($C_5H_8O_2^+ [M^+]$), 82,07 ($C_5H_6O_1^+$), 55,11 ($C_4H_7^+$), 41,09 ($C_3H_5^+$). RMN 1H (400 MHz, THF): δ (ppm) 8,3 (s, 1H, OH), 5,8 (m, 1H, CH), 5 (d, 2H, CH_2), 2,43 (t, 2H, CH_2), 2,37 (dt, 2H, CH_2). RMN ^{13}C (400 MHz, THF): δ (ppm) 178 (-OH), 33 (C-2), 28,6 (C-3), 136 (C-4), 116 (C-5).

Ácido 3-hidroxi-4-pentenoico/ácido 2,4-pentadienoico (II). Líquido viscoso de color naranja: IR (ATR): λ (cm^{-1}) 3489 (st, CH_2-OH), 1709 (st, C=O), 2400-3100 (st, OH), 1260 (st, C-O), 914 (d, OH), 1640 (st, C=C), 1043 (d, CH_2-OH), 1414 (d, C-H). MS-ES: (m/z) 115,97 ($C_5H_8O_3^+ [M^+]$), 114,97 ($C_5H_7O_3^+$), 97,97 ($C_5H_6O_2^+ [M^+]$).

Poli (ácido-3-hidroxi-4-pentenoico) (III). Líquido altamente viscoso de color marrón oscuro: IR (ATR): λ (cm^{-1}) 3450 (st, CH_2-OH), 1705 (st, C=O), 2300-3100 (st, OH), 1258 (st, C-O), 914 (d, OH), 1065 (d, CH_2-OH), 2917 (st.asym, CH_2), 2849 (st.asym, CH_2), 1451 (d, C-H). MS-ES: (m/z) 1359, 1584, 2035, 2451, 3038, 3464, 3553, 3916, 3967.

2-(((2-aminociclohexil) imino) metil) fenol (IV). Líquido de color amarillo claro: IR (ATR): λ (cm^{-1}) 3418 (st, N-H), 1350 (st, C-N), 1629 (st, C=N), 3070-3600 (st, OH), 1274 (d, NH), 2855 (st.sym, CH_2), 2926 (st.asym, CH_2). RMN 1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 8,7 (s, 1H, CH), 5,3 (s, 1H, OH), 6,8 (m, 2H, CH_2), 3 (s, 2H, NH_2). RMN ^{13}C (400 MHz, THF): δ (ppm) 161 (C-1), 118 (C-2), 134 (C-3), 120 (C-4), 134 (C-5), 124 (C-6), 160 (C-7), 67 (C-8), 29 (C-9), 25 (C-10), 25 (C-11), 33 (C-12), 53 (C-13).

P2,2HACPA (VI). Líquido altamente viscoso de color marrón: IR (ATR): λ (cm^{-1}) 3455 (st, CH_2-OH), 1202 (d,-OH), 2917 (st.asym, CH_2), 2849 (st.sym, CH_2), 1451 (d, C-H), 1579 (st, C=O), 1629 (st, C=N). RMN 1H (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 5,8 (s, 1H, NH), 5,1 (s, 1H, OH). RMN ^{13}C (400 MHz, THF): δ (ppm) 165 (C-5), 160 (C-8) 70 (C-3) 161 (C-9). MS-ES: (m/z) 3995.

La caracterización mediante espectroscopía IR (**Figura 2S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2825>) del compuesto I mostró una banda amplia y característica de estiramiento del OH del carboxilo entre 3.100 y 2.400 cm^{-1} , de 1.709 cm^{-1} de estiramiento del C=O, de 1.257 cm^{-1} de estiramiento del C-O del grupo carboxilo y de 910 cm^{-1} de deformación del OH. Se observaron claramente bandas características de un doble enlace terminal a 1.641 cm^{-1} del estiramiento del doble enlace (C=C), y a 3.079 y 993 cm^{-1} de estiramiento y deformación, respectivamente, del C-H de un doble enlace terminal. La caracterización por resonancia magnética nuclear confirmó la presencia de un grupo carboxilo y un grupo vinilo (**Figuras 3S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2826> y **4S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2827>), en tanto que el espectro de masas (**Figura 5S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2828>) evidenció un pico de ion molecular de 100 m/z.

Mediante espectroscopía IR se comprobó la formación de un alcohol (**Figura 6S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2829>) en el compuesto II, encontrándose una banda ancha y característica del estiramiento de un grupo alcohol a 3.489 cm^{-1} . Mediante espectroscopía de masas usando ionización por electronebulización se encontraron las especies con $M^+=116$ y $M^+=98$, lo que sugiere la formación de dos productos (**Figura 7S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2830>): uno por reacción de eliminación de E2 y otro por sustitución nucleofílica de S_N2 .

Después de la polimerización vía radicalaria con peróxido de benzoilo (POB) como iniciador de la reacción, se detectó la presencia de dobles enlaces en el compuesto correspondientes al compuesto obtenido por la ruta de la reacción de E2 en el paso anterior. Para obtener un polímero con grupos hidroxilo únicamente en la posición beta del ácido carboxílico fue necesaria una hidratación del grupo alqueno utilizando ácido sulfúrico, agua y tetrahidrofurano (THF) como solvente. En el espectro IR (**Figura 8S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2831>) se observó que, después del tratamiento con ácido sulfúrico, las bandas correspondientes al doble enlace (1.641 cm^{-1}) desaparecieron y aumentó la banda característica del grupo alcohol.

La obtención del compuesto IV se confirmó por espectroscopía IR (**Figura 2**). Se aprecia la formación de un grupo imina representado en la señal a 1.629 cm^{-1} , característica de un grupo C=N, y entre la región de 3.070 cm^{-1} a 3.600 cm^{-1} , la banda

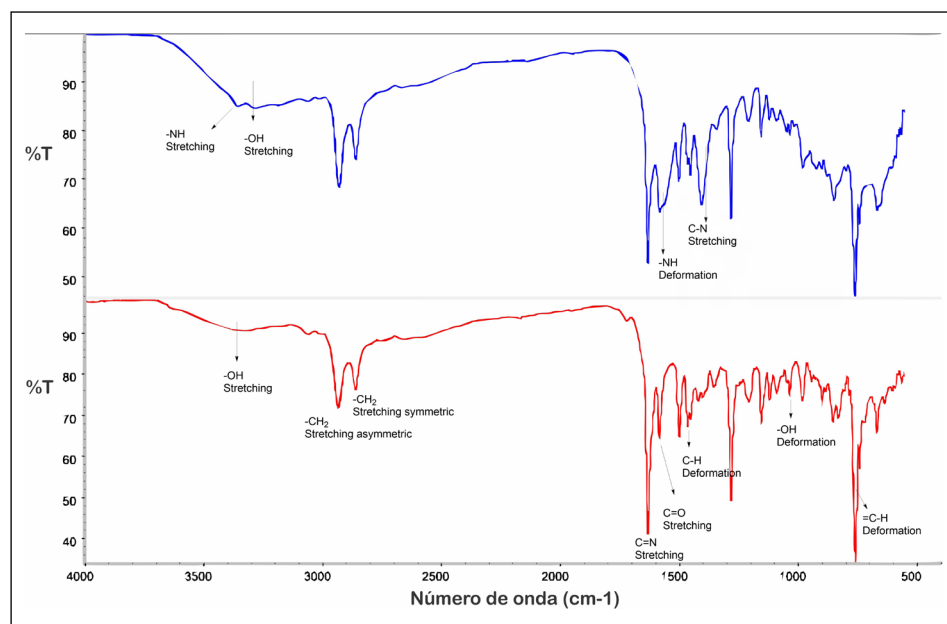


Figura 2. (-) Espectro IR del compuesto IV; (-) Espectro IR del compuesto VI

del grupo OH junto con bandas características de una amina primaria. Al comparar el espectro IR del compuesto IV con el del compuesto VI fue evidente que las señales cercanas a los 3.350 cm^{-1} del grupo amino desaparecieron debido a la formación del grupo imino. En la RMN- ^1H (**Figura 9S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2832>) y la RMN- ^{13}C (**Figura 10S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2833>) se evidenció la obtención de un grupo amida e hidroxilo con los desplazamientos característicos de la estructura de la molécula planteada. En el espectro MS obtenido con ionización ES (**Figura 11S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2834>) se observaron valores de masa altos, con un máximo de 3.967 m/z debido a la limitación del instrumento.

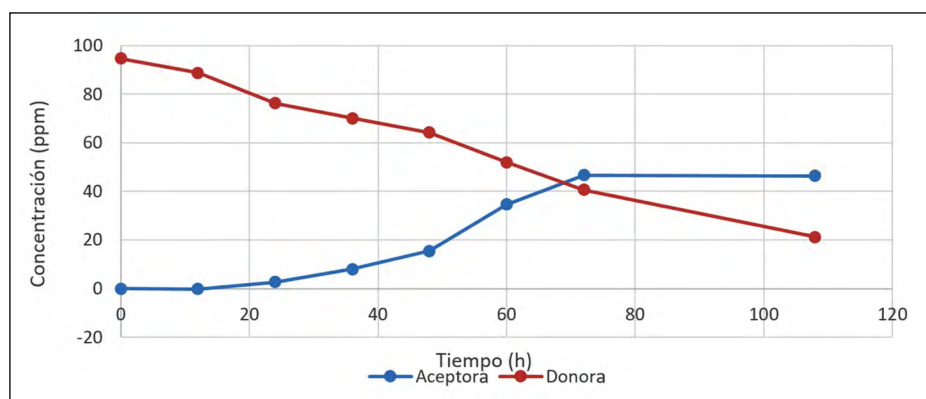
Extracción de Au^{3+}

En la fabricación de las membranas se usó el polímero sintetizado, el cual genera los sitios activos de interacción con los iones de Au^{3+} . La composición y el espesor de las membranas fabricadas, así como el porcentaje de extracción de oro, se presentan en la **tabla 1**. El porcentaje de extracción corresponde a la suma del porcentaje de metal transportado desde la solución donadora hacia la solución receptora más el porcentaje de metal retenido en la membrana. Este último se determinó después de la lixiviación del metal con una solución de $1,5\text{ M}$ de tiourea a un pH de $4,0$.

Con la membrana 1 los resultados obtenidos mediante espectrofotometría de absorción atómica indicaron la presencia de oro en ambas fases; en la **figura 3** se observa cómo la concentración final de iones de oro en la fase receptora (solución inicialmente libre de Au) fue de 49% , y en la fase donadora (solución con 100 ppm de Au al inicio del experimento) fue de 21% , lo que sugiere que en las primeras horas se generó un gradiente de concentración a través de la membrana que permitió el transporte. Más allá de las 72 horas , la concentración en la fase receptora se mantuvo constante, lo cual sugiere que el transporte de iones a través de la membrana hacia la solución receptora se detuvo, probablemente porque los sitios activos se saturaron con los iones de oro y se favoreció el proceso de retención en la misma membrana. El cambio de coloración de marrón a rosa de la membrana también evidenció que los iones extraídos de la solución donadora se acumularon sobre la misma membrana. Este fenómeno de retención puede considerarse

Tabla 1. Porcentajes de extracción de oro empleando membranas fabricadas con diferente composición y espesor

Membrana	Espesor (µm)	Composición (%)				Porcentaje de extracción	
		Polímero	PVC	NPOE	TFB-Na	Transportado	Retenido
1	50	20	30	47	3	49	30
2	50	20	47	33	0	0	12
4	50	30	40	30	0	0	51
5	50	40	30	30	0	0	59
6	50	40	60	0	0	0	11
7	50	48	24	24	5	0	26
8	50	48	24	24	3	0	30
9	50	50	25	25	0	0	17
11	100	20	30	47	3	30	36
12	200	20	30	47	3	0	48

**Figura 3.** Variación de la concentración en la fase receptora y en la fase donadora en relación con el tiempo (108 h) con la membrana de composición 1.

otra forma eficiente de extracción. La recuperación de la membrana se hizo mediante lixiviación del oro retenido sumergiendo la membrana durante una hora en una solución de 1,5 M de tiourea a un pH de 4,0 en agitación magnética. La suma de las cantidades de oro determinadas tanto en la solución receptora como en la superficie de la membrana permitió establecer que se había alcanzado una extracción del 78,6 % del oro contenido en la fase donadora. Por ello, se estableció que la membrana de composición 1 generó un alto porcentaje de extracción de oro comparado con los porcentajes que se obtienen con técnicas tradicionales como la cianuración, que no supera el 50 % de extracción a menos que se cumplan numerosos pasos para aumentar dicho valor (Syed, 2012).

A diferencia de lo encontrado con la membrana 1, la membrana de composición 2 no generó transporte de Au^{3+} hacia la solución receptora, en tanto que la concentración del metal en la solución donadora disminuyó 15 %. No obstante, la retención de oro por parte de la membrana alcanzó el 12 % con respecto a la concentración inicial de la fase donadora, lo que sugiere que la presencia del Na-TFB es necesaria para generar una especie de transporte facilitado a través de la membrana, ya que al ser una sal, su estructura permite el intercambio iónico y tiene un posible efecto sinérgico con el polímero sintetizado,

lo cual facilita el ingreso del ion desde la solución donadora al interior de la membrana, en tanto que el polímero genera los sitios activos de interacción permitiendo el movimiento de los iones hacia la solución receptora.

La membrana de composición 3, fabricada sin P2,2HACPA, generó un porcentaje de extracción de solo 3 % del oro contenido en la solución donadora, el cual no fue transportado a la solución receptora. Luego del proceso de lixiviación con solución de tiourea se recuperó el 2 % del metal, lo cual evidencia que la extracción observada con las membranas 1 y 2 se debe a la presencia de P2,2HACPA en el material.

El aumento del contenido de P2,2HACPA (membranas 4 y 5) permitió aumentar el porcentaje de extracción de oro sin que hubiera transporte hacia la solución receptora, lo que presuntamente se debió a la ausencia de Na-TFB. En estas membranas se observó una relación proporcional entre el porcentaje de extracción y la cantidad de polímero, ya que al aumentar el porcentaje de P2,2HACPA aumentaron los sitios activos de interacción con los iones de oro y, por lo tanto, hubo un mayor porcentaje de metal retenido en comparación con el observado al emplear la membrana 1, que contenía solo 20 % de P2,2HACPA. Se debe recordar que el Na-TFB se empleó como una alternativa para mejorar el intercambio iónico entre la solución donadora y la membrana. Sin embargo, el intercambio iónico también ocurrió en ausencia de Na-TFB.

Es evidente, asimismo, que la ausencia del plastificante en la membrana 6 causó una considerable disminución del porcentaje de oro extraído, a pesar de contener el 40 % del polímero sintetizado, lo que se debió a la excesiva rigidez y pérdida de homogeneidad de la estructura y confirma que, para este tipo de membranas, es indispensable usar un plastificante que permita mejorar las propiedades de resistencia mecánica y de plasticidad y que, conjuntamente con el polímero, proporcionen las condiciones apropiadas para alojar y, si es el caso, transportar las especies de interés.

Las membranas 7, 8 y 9 presentaron un cambio significativo en la elasticidad al aumentar el porcentaje de polímero hasta cerca del 50 %. El bajo contenido de PVC generó membranas con tendencia a fluir y, por lo tanto, difíciles de manipular. Las membranas con esta misma composición, pero de mayor espesor, se dejaron manipular mejor. Sin embargo, a pesar de su alto contenido de P2,2HACPA, el porcentaje de extracción de oro fue significativamente menor que el obtenido con las membranas precedentes.

En cuanto a la influencia del espesor de la membrana sobre el porcentaje de extracción, se registró una relación inversamente proporcional, ya que al aumentar el espesor de la membrana disminuyó el porcentaje de extracción. No obstante, es importante señalar que la cantidad de oro retenido en la membrana aumentó con el espesor, en tanto que la cantidad de oro transportado a la solución receptora disminuyó con ese mismo factor, lo que evidenció que la difusión del metal a través de la membrana se hizo a una velocidad relativamente baja y al cabo de 72 horas de contacto no alcanzó a atravesar la membrana de 200 micrómetros, en consecuencia, la concentración de oro en la solución receptora estuvo por debajo de los límites de detección cuando se emplearon membranas de ese espesor. Según lo planteado por **Benavente** (1998), el Na-TFB puede estar parcialmente retenido en la matriz polimérica debido a la interacción iónica entre los grupos cargados negativamente y algunos grupos protonados del polímero; así, el agente transportador pudiera estar presente en el interior de la membrana tanto en forma libre como enlazado iónicamente, por lo cual, al aumentar el espesor de la membrana, disminuye el flujo del transportador así como el porcentaje de oro transportado. En el presente estudio se confirmó que tanto la composición como el espesor de la membrana tienen un efecto significativo en la interacción con los iones de oro y su respectivo porcentaje de extracción y se logró fabricar una membrana 1 con espesor de 50 μm con la cual el porcentaje de extracción de oro fue del 79 %. Estos resultados son prometedores en cuanto a la síntesis de nuevos materiales y el diseño de métodos alternativos para la extracción de oro.

Por otro lado, es importante establecer la posibilidad de reutilizar la membrana, es decir, su comportamiento en varios ciclos de extracción de oro, ya que según la literatura especializada (**Mora-Tamez & Rodríguez de San Miguel**, 2014) esta es una de las

principales ventajas de este tipo de materiales. Se llevaron a cabo tres ciclos de extracción de 108 horas con la misma membrana (membrana 1) y bajo las condiciones de lixiviación ya mencionadas. En el primer ciclo se obtuvo un 78 % de extracción de oro y en el tercero, 76 %, lo que evidencia que la membrana puede soportar cerca de 324 horas (3 ciclos de 108 h cada uno) de uso en los procesos de extracción sin que se modifique significativamente el porcentaje de extracción de oro.

En un estudio se reportaron agentes extractantes como el N-[N,N-di(2-etilhexil)aminocarbonilmetil]glicina (D2EHAG) usados en membranas poliméricas de inclusión (Kubota, *et al.*, 2019) cuyos porcentajes de extracción fueron mayores (96 %) a los obtenidos en este trabajo. En otro estudio se sintetizó politiosemicarbazida en la fabricación de una membrana para la extracción de oro, lo que representó una ventaja, pues cada unidad monomérica de este polímero contiene dos grupos tiosemicarbazida que forman un sitio activo, lo que permite una eficiencia de extracción cercana al 97 % mediante adsorción (Villalobos, *et al.*, 2014). Los copolímeros acrílicos con grupos funcionales como el dimetilaminobenzaldehído y resinas de tiourea, también pueden adsorber con eficiencia algunos metales nobles como el oro (Tofan, *et al.*, 2017; Atia, 2005). Sin embargo, no hay reporte de que ese tipo de membrana sea capaz de soportar varios ciclos. Por lo anterior, se evidencia que un agente extractante polimerizado como el sintetizado en este trabajo (P2,2HACPA) tiene la ventaja de una mayor vida útil y permite obtener altos porcentajes de extracción de oro a partir de soluciones acuosas.

La retención de oro en la membrana 1 se confirmó, además, por el cambio de color observado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS) antes y después de la extracción de Au^{3+} . Para ello se utilizó un microscopio electrónico JEOL Modelo JSM 6490LV (McCrone Microscopes) con detector de espectroscopía de dispersión de energías por rayos X (EDS) (Oxford Instruments, modelo INCA PENTAFETx3) en un voltaje de aceleración de 20 kV y magnificaciones desde 500X hasta 1000X. En las membranas de referencia, es decir, aquellas que no habían sido utilizadas para la extracción, se requirió la adición de una capa de oro para formar una superficie conductora, en tanto que las membranas usadas en los experimentos de extracción de oro no requirieron la adición del metal debido a que el oro adsorbido durante el experimento se había reducido formando una capa conductora.

En la imagen de la **figura 4a** se observa la fotografía de una membrana con superficie homogénea poco porosa y en la imagen b se observan partículas sobresalientes de formas irregulares. El análisis de composición mediante SEM-EDS reveló que estas partículas correspondían a oro depositado y reducido en el proceso de extracción, lo que confirma que, durante el proceso, además de un mejor transporte, ocurrió también la retención y la posterior reducción de oro sobre la membrana. La reducción de Au^{3+} sobre la membrana se explica por el alto potencial de reducción de esta especie y por la presencia de Na-TFB, el cual puede oxidarse fácilmente en presencia de un agente oxidante como el mismo Au^{3+} .

Determinación del efecto del pH de las soluciones en la membrana

El comportamiento de la variación del potencial de la membrana en función del valor de pH de la solución se presenta en la **figura 5**. Al inicio de las mediciones la diferencia de potencial permaneció constante en el tiempo y cercana a 0,0 mV. En un sistema perfectamente homogéneo se esperaría una diferencia de 0,0 mV en virtud de que la medición se hizo con dos electrodos de referencia idénticos. Sin embargo, las pequeñas diferencias en la concentración del electrolito soporte o el tampón empleados, así como en la simetría de las caras de la membrana, generaron una pequeña desviación del comportamiento esperado. Al añadir 2,5 M de HCl en uno de los compartimientos, se observó una variación abrupta del potencial de la membrana producto de la diferencia de actividades del ion hidronio entre las dos soluciones. A medida que disminuyó el valor de pH, la variación del potencial aumentó debido a la mayor diferencia de actividades entre las soluciones. La lenta variación del potencial en cada valor de pH se relacionó con el intercambio de iones hidronio entre las soluciones y la membrana en búsqueda del equilibrio del sistema. Con valores de pH por debajo de 3, se observó que el potencial tendió a volver a su valor

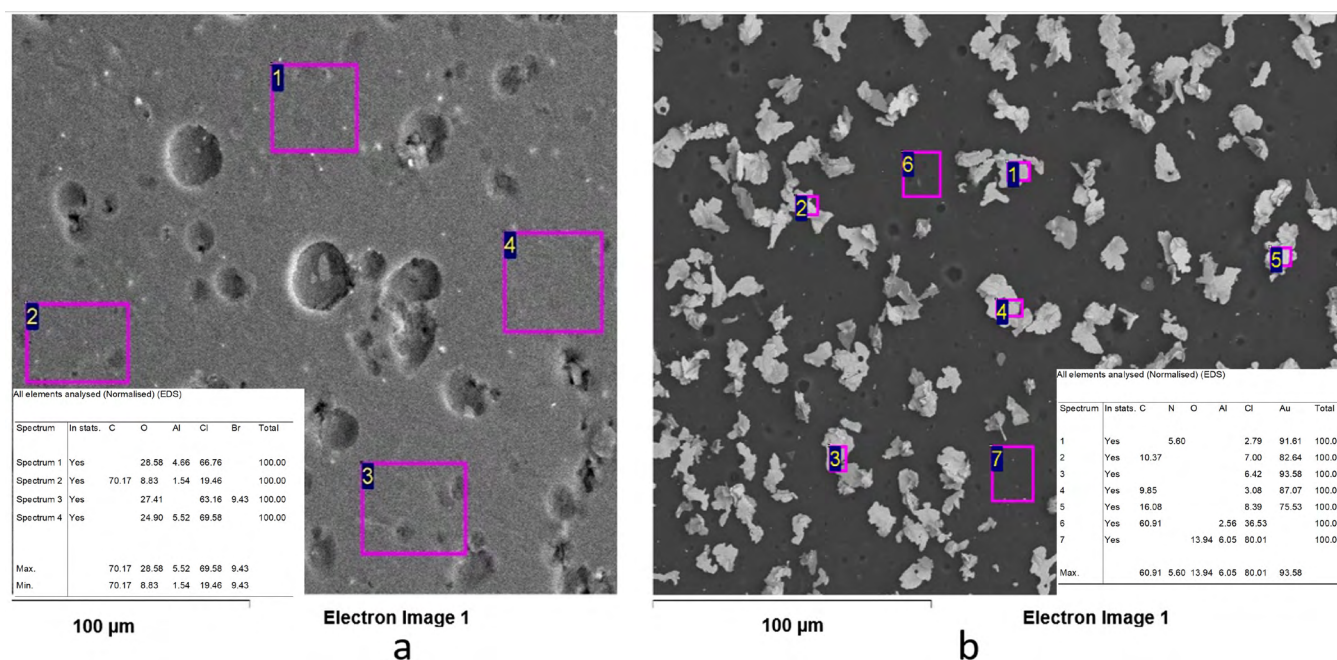


Figura 4. Imágenes SEM de la membrana antes de ser usada (a) y después de la extracción de oro (b)

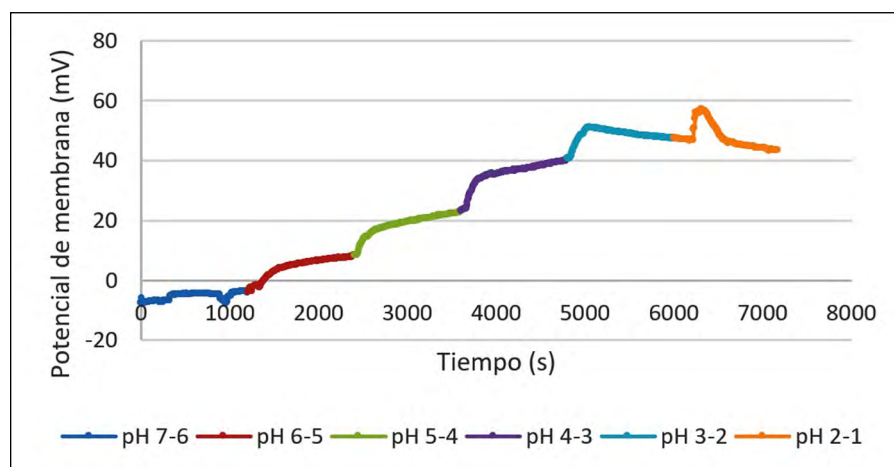


Figura 5. Potencial de membrana variando el pH una unidad cada 20 minutos con la membrana de composición 1

inicial, lo que indica que se generó el transporte de iones hidronio a través de la membrana. Es importante tener en cuenta el comportamiento que se ilustra en la **figura 5**, ya que lo ideal sería trabajar en un intervalo de pH en el que el transporte de iones H^+ sea mínimo, ya que estos podrían ocupar sitios activos de la membrana. Con valores de pH entre 7 y 6 el cambio de potencial fue casi nulo, pero sabiendo que con valores de pH mayores de 5.0 los metales tienden a precipitar, se decidió trabajar con un pH de 4,0.

El principal inconveniente de la síntesis de polímeros con grupos funcionales que poseen pares electrónicos libres en su estructura es la propensión a hidrolizarse en medios ácidos, lo que conlleva la pérdida de sitios activos y la consecuente degradación de las membranas. No obstante, en este trabajo se encontró que la membrana era estable en soluciones de pH desde 7,0 hasta 1,0, lo cual favorece la extracción de metales con valores

de pH bajos. Para comprobarlo se prepararon siete soluciones de 25 mL con valores de pH entre 7,0 y 1,0 ajustados con 2,5 M de HCl y, posteriormente, se sumergió en cada solución un fragmento de membrana durante 72 horas. A continuación, los fragmentos de membrana se extrajeron, se lavaron y se secaron para luego registrar el espectro IR de cada uno. Los resultados no evidenciaron cambios ni pérdidas de los grupos funcionales en el intervalo de pH evaluado (**Figura 12S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2835>).

Evaluación de la selectividad de la membrana

En la **tabla 2** se presentan los valores del porcentaje de extracción de diferentes iones metálicos transportados y retenidos en la membrana como indicativo de su selectividad frente a cada uno de los metales estudiados.

Además de oro, solo se detectó cobre en la fase receptora (1,38 %). El cobre también fue el metal con mayor porcentaje de retención en la membrana polimérica, con 29,09 %. Este hecho lleva a pensar en la posibilidad de que la configuración electrónica del ion metálico pudiera tener algún efecto sobre la capacidad de formar complejos con cierta estabilidad entre el mismo ion y los sitios activos del polímero. Lo anterior se infiere del hecho de que los iones de oro y cobre pertenecen al mismo grupo de la tabla periódica y son precisamente los que presentan mayores porcentajes de extracción. Sin embargo, el hierro (II) también presenta cierta afinidad con la membrana, con un 13,29 % de adsorción, pero sin transporte hacia la fase receptora. Otros factores que pueden influir en la selectividad de la membrana son el radio iónico del metal y el valor de su carga. En este caso, sin embargo, dada la similitud de los valores de radio iónico de los diferentes metales estudiados, la selectividad hacia el oro puede explicarse por el mayor valor de la carga del ion Au^{3+} con respecto a los iones M^{2+} . Además, según la teoría del campo de los ligantes, los iones metálicos pueden formar complejos estables con números de coordinación y formas estructurales definidas. En algunos casos, la flexibilidad de las cadenas poliméricas favorecería la adopción de estructuras que faciliten la coordinación de uno u otro ion presente en la solución, lo que también sería un factor con efectos en la selectividad del polímero sintetizado, aspecto que está fuera del alcance de este trabajo.

En resumen, los metales que pueden actuar como posibles interferentes frente a la extracción de oro son el cobre y el hierro, ya que, a pesar de que el transporte del cobre es bajo y el del hierro nulo, hay retención en la membrana polimérica, lo que implica que los sitios activos se ocupan y disminuye el porcentaje de extracción de oro.

Por el otro lado, como se observa en la **tabla 2**, el contenido de plomo, calcio, zinc, níquel y aluminio permaneció casi inalterable en la solución donadora, por lo cual no representó interferencia para la recuperación de oro. Para confirmarlo, se hizo un nuevo

Tabla 2. Porcentajes de extracción de iones metálicos empleando la membrana de composición 1. Tiempo de contacto: 72 horas

Metal	% Metal en fase donadora a las 72 h	Porcentaje de extracción	
		Transportado	Retenido
Cu	69,53	1,38	29,09
Pb	99,58	0	0,42
Ca	99,35	0	0,65
Zn	99,71	0	0,29
Fe	86,71	0	13,29
Ni	99,48	0	0,52
Al	97,94	0	2,06
Au	37,60	47,13	14,21

experimento en el que se incluyeron en la solución de metales solamente Au^{3+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} en concentraciones iguales y se monitoreó el porcentaje de extracción de oro por espectrofotometría de absorción atómica. Como era de esperarse, el porcentaje de extracción de oro disminuyó de 78 %, logrado en una solución con oro únicamente, a un 62 % en presencia de los otros dos metales evaluados.

Sin embargo, la presencia de cobre no representa un inconveniente mayor, ya que, según lo reportado por Miller (2002), el prelavado con ácido es un método eficiente para eliminar este tipo de interferencia, ya que la mayoría de los metales es sensible a algunos ácidos.

Conclusiones

Se sintetizó el nuevo polímero extractante P2,2HACPA con el propósito de extraer oro con base en diversos estudios en los que se ha demostrado que los grupos imina, amida y, en algunos casos los grupos carboxilo e hidroxilo, son adecuados para la extracción selectiva de oro. La caracterización por espectroscopía IR, MS y RMN de los intermediarios y el producto final demostró la formación del compuesto.

La obtención de un nuevo material extractante de oro a partir de soluciones acuosas es de gran importancia para reemplazar metodologías convencionales poco eficientes y contaminantes del medio ambiente. Los resultados demostraron que el nuevo polímero P2,2HACPA utilizado como agente extractante en membranas poliméricas es selectivo hacia Au^{3+} como complejo $[\text{AuCl}_4]^-$ en presencia de otros iones metálicos en una solución con un pH de 4,0.

Los resultados evidenciaron que la membrana de composición 1 con 20 % de P2,2HACPA y un espesor de $50 \pm 5 \mu\text{m}$ generó los porcentajes más altos de extracción de oro, con un máximo de 79 % comparado con la concentración inicial de oro en la solución donadora, evidenciándose el transporte de metal a través de la membrana.

Las membranas obtenidas en el presente estudio podrían emplearse en sistemas piloto de la industria minera para la extracción en minas de oro no refractario y en la recuperación del metal a partir de chatarra electrónica después de realizar una hidrólisis ácida y el respectivo ajuste del pH de las soluciones obtenidas. La posibilidad de emplear la misma membrana en varios ciclos disminuye los costos de fabricación y reduce sustancialmente los residuos generados.

El porcentaje de extracción de oro en presencia de otros metales puede disminuir hasta un 15 %, especialmente por la presencia de cobre, que actúa como interferente al ocupar sitios activos del agente extractante, y por el que P2,2HACPA muestra afinidad, como se verificó con una extracción de hasta 29 % de este metal.

Material suplementario

Figura 1S. Preparación y montaje de las membranas en las celdas. Vea la figura 1S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2824>

Figura 2S. Espectro IR del compuesto I. Vea la figura 2S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2825>

Figura 3S. Espectro RMN ^1H del compuesto I. Vea la figura 3S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2826>

Figura 4S. Espectro RMN ^{13}C del compuesto I. Vea la figura 4S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2827>

Figura 5S. Espectro MS del compuesto I. Vea la figura 5S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2828>

Figura 6S. Espectro IR del compuesto II. Vea la figura 6S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2829>

Figura 7S. Espectro MS del compuesto II. Vea la figura 7S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2830>

Figura 8S. (-) Espectro IR del producto de polimerización; (-) Espectro IR del producto de polimerización después de la hidrólisis ácida (compuesto III). Vea la figura 8S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2831>

Figura 9S. Espectro RMN ^1H del compuesto VI. Vea la figura 9S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2832>

Figura 10S. Espectro RMN ^{13}C del compuesto VI. Vea la figura 10S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2833>

Figura 11S. Espectro MS del compuesto VI. Vea la figura 11S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2834>

Figura 12S. Espectros IR de la membrana 1 sumergida en soluciones de pH 1 y 7. Vea la figura 12S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/938/2835>

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca por el apoyo financiero para la ejecución de este trabajo (proyecto ID 4478). Asimismo, agradecen a la Unidad de Análisis Industriales del Departamento de Química de la Universidad del Cauca por su apoyo logístico.

Contribución de los autores

DGC y CLL realizaron la totalidad de las actividades experimentales que se requirieron para la ejecución del trabajo. También participaron en el diseño de la ruta y los mecanismos de reacción para la síntesis del polímero. JMF diseñó las primeras rutas de síntesis del polímero y analizó los resultados de espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear. TMGV orientó el tratamiento de la muestra y la caracterización del polímero mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas, así como los análisis de metales mediante espectrofotometría de absorción atómica. GCO dirigió el trabajo y asesoró la síntesis de las membranas y los montajes de los sistemas de extracción de los metales en sistemas de una y de dos celdas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses relacionados con los resultados de la investigación aquí publicados.

Referencias

- Ata, N., Yazicigil, Z., Oztekin, Y. (2008). The electrochemical investigation of salts partition with ion exchange membranes. *Journal of Hazardous Materials*. **160** (1): 154-160. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.02.099
- Atia, A. A. (2005). Adsorption of silver(I) and gold(III) on resins derived from bithiourea and application to retrieval of silver ions from processed photo films. *Hydrometallurgy*. **80** (1-2): 98-106. Doi: 10.1016/J.HYDROMET.2005.07.004
- Benavente, J., Oleinikova, M., Muñoz, M., Valiente, M. (1998). Characterization of novel activated composite membranes by impedance spectroscopy. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **451** (1-2): 173-180. Doi: 10.1016/S0022-0728(98)00070-9
- Braibant, B., Bourgeois, D., Meyer, D. (2018). Three-liquid-phase extraction in metal recovery from complex mixtures. *Separation and Purification Technology*. **195**: 367-376. Doi: 10.1016/J.SEPPUR.2017.12.036
- Fotoohi, B. & Mercier, L. (2015). Recovery of precious metals from ammoniacal thiosulfate solutions by hybrid mesoporous silica: 2 - A prospect of PGM adsorption. *Separation and Purification Technology*. **149**: 82-91. Doi: 10.1016/j.seppur.2015.05.020
- Fu, F. & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of Environmental Management*. **92** (3): 407-418. Doi: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011
- Gohil, G. S., Binsu, V. V., Shahi, V. K. (2006). Preparation and characterization of mono-valent ion selective polypyrrole composite ion-exchange membranes. *Journal of Membrane Science*. **280** (1-2): 210-218. Doi: 10.1016/j.memsci.2006.01.020

- Hilson, G. & Monhemius, A. J.** (2006). Alternatives to cyanide in the gold mining industry: what prospects for the future? *Journal of Cleaner Production*. **14** (12-13): 1158-1167. Doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2004.09.005
- Hosseini, S. M., Madaeni, S. S., Khodabakhshi, A. R.** (2010). Heterogeneous cation exchange membrane: preparation, characterization and comparison of transport properties of mono and bivalent cations. *Separation Science and Technology*. **45** (16): 2308-2321. Doi: 10.1080/01496395.2010.497792
- Judd, S. J.** (2017). Membrane technology costs and me. *Water Research*. **122**: 1-9. Doi: 10.1016/j.watres.2017.05.027
- Kubota, F., Kono, R., Yoshida, W., Sharaf, M., Kolev, S. D., Goto, M.** (2019). Recovery of gold ions from discarded mobile phone leachate by solvent extraction and polymer inclusion membrane (PIM) based separation using an amic acid extractant. *Separation and Purification Technology*. **214**: 156-161. Doi: 10.1016/j.seppur.2018.04.031
- Li, J. & Miller, J.** (2002). Reaction kinetics for gold dissolution in acid thiourea solution using formamidine disulfide as oxidant. *Hydrometallurgy*. **63** (3): 215-223. Doi: 10.1016/S0304-386X(01)00212-2
- Monier, M., Akl, M. A., Ali, W. M.** (2014). Modification and characterization of cellulose cotton fibers for fast extraction of some precious metal ions. *International Journal of Biological Macromolecules*. **66**: 125-134. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.068
- Mora-Tamez, L., Rodríguez de San Miguel, E., Briones-Guerash, U., Munguía-Acevedo, N. M., de Gyves, J.** (2014). Semi-interpenetrating hybrid membranes containing ADOGEN® 364 for Cd(II) transport from HCl media. *Journal of Hazardous Materials*. **280**: 603-611. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.056
- Song, J., Huang, T., Qiu, H., Niu, X., Li, X. M., Xie, Y., He, T.** (2018). A critical review on membrane extraction with improved stability: Potential application for recycling metals from city mine. *Desalination*. **440**: 18-38. Doi: 10.1016/j.desal.2018.01.007
- Syed, S.** (2012). Recovery of gold from secondary sources-A review. *Hydrometallurgy*. **115-116**: 30-51. Doi: 10.1016/j.hydromet.2011.12.012
- Tan, P., Jiang, H. R., Zhu, X. B., An, L., Jung, C. Y., Wu, M. C., ... Zhao, T. S.** (2017). Advances and challenges in lithium-air batteries. *Applied Energy*. **204**: 780-806. Doi: 10.1016/J.APENERGY.2017.07.054
- Tofan, L., Bunia, I., Paduraru, C., Teodosiu, C.** (2017). Synthesis, characterization and experimental assessment of a novel functionalized macroporous acrylic copolymer for gold separation from wastewater. *Process Safety and Environmental Protection*. **106** (2): 150-162. Doi: 10.1016/j.psep.2017.01.002
- Villalobos, L. F., Yapici, T., Peinemann, K. V.** (2014). Poly-thiosemicarbazide membrane for gold recovery. *Separation and Purification Technology*. **136**: 94-104. Doi: 10.1016/j.seppur.2014.08.027
- Wang, D. Q., Zhu, M. L., Xuan, F. Z.** (2017). Correlation of local strain with microstructures around fusion zone of a Cr-Ni-Mo-V steel welded joint. *Materials Science and Engineering A*. **685**: 205-212. Doi: 10.1016/j.msea.2017.01.015
- Zhang, J., Shen, S., Cheng, Y., Lan, H., Hu, X., Wang, F.** (2014). Dual lixiviant leaching process for extraction and recovery of gold from ores at room temperature. *Hydrometallurgy*. **144-145**: 114-123. Doi: 10.1016/j.hydromet.2014.02.001

Original article

Validation of an analytical method by GC-FID for the quantification of styrene and α -methylstyrene

Validación de un método analítico por GC-FID para la cuantificación de estireno y α -metilestireno

Brayan David Verdugo-Torres, Jairo Antonio Cubillo-Lobo,
Hugo Alfonso Rojas Sarmiento

Grupo de Catálisis (GC-UPTC), Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia

Abstract

Styrene and α -methylstyrene are substrates of great interest in asymmetric catalysis. Although they have been widely used, known quantification methodologies are restricted to the use of mass spectrometry detectors and are not validated. In the present work, we developed and validated a reliable method by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) for the analysis of non-functionalized olefins (styrene and α -methylstyrene) in a liquid matrix using toluene as the internal standard. We explored validation parameters such as selectivity, linearity, detection limit, quantification limit, precision, and accuracy. The results showed an adequate separation of each olefin under the conditions and range of work implemented (6.83×10^{-4} mol/L - 4.059×10^{-3} mol/L). The parameters evaluated are within acceptable values indicating that the validated method is selective, linear, precise, and accurate. This work represents an effort to develop a highly safe, efficient, and validated chromatographic method for the quantification of styrene and α -methylstyrene in liquid matrices for their possible application in the field of resins, plasticizers, and polymers where they are mainly involved.

Keywords: Validation; Method; Styrene; α -methylstyrene; GC-FID.

Resumen

Estireno y α -metilestireno son sustratos de gran interés en catálisis asimétrica. Aunque han sido ampliamente usados, las metodologías de cuantificación conocidas se restringen al uso de detectores de espectrometría de masas y no se encuentran validadas. En el presente trabajo se desarrolló y validó un método confiable mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) para el análisis de olefinas no funcionalizadas (estireno y α -metilestireno) en matrices líquidas utilizando el tolueno como patrón interno. Los parámetros de validación evaluados incluyeron selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud. El análisis evidenció una separación adecuada de cada analito de interés bajo las condiciones y el rango de trabajo implementado ($6,83 \times 10^{-4}$ mol/L - $4,059 \times 10^{-3}$ mol/L). Los parámetros evaluados registraron valores dentro de los rangos de aceptación, lo que confirmó que el método validado es selectivo, lineal, preciso y exacto. Este trabajo representa un esfuerzo por desarrollar un método cromatográfico validado seguro y eficiente para la cuantificación de estireno y α -metilestireno en matrices líquidas, y su posible aplicación en el campo de las resinas, plastificantes y polímeros.

Palabras clave: Validación; Método; Estireno; α -metilestireno; GC-FID.

Citation: Verdugo-Torres BD, Cubillo-Lobo JA, Rojas Sarmiento HA, *et al.* Validation of an analytical method by GC-FID for the quantification of styrene and α -methylstyrene. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):828-834, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1021>

Editor: Luis Fernando Echeverry

***Corresponding autor:**
Brayan David Verdugo Torres;
brayan.verdugo@uptc.edu.co

Received: October 30, 2019

Accepted: April 28, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Introduction

Within asymmetric catalysis, styrene and α -methylstyrene are found as substrates of great interest since their enantiomeric epoxides have highly desirable properties due to their reactive versatility for which they are involved in the synthesis of medicines and agrochemicals (Wong & Shi, 2008; Xia, *et al.*, 2005). Although these substrates have

been widely used (Huang, *et al.*, 2019; Tang, *et al.*, 2008) the chromatographic methods for the quantification of styrene and α -methylstyrene in this type of reaction have not been validated (Berijani, *et al.*, 2019; Hadian & Hosseini, 2016) and, therefore, the results have not been supported. In this context, the objective of the present study was to report the results of the validation of a chromatographic method for the quantification of these olefins in samples and/or enantioselective epoxidation tests. The method we describe here for styrene has comparable results with those reported in other areas (Gennari, *et al.*, 2012) as regards the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and it is the only validated method of GC-FID quantification of α -methylstyrene. Additionally, the method also works with an FID detector, which was not the case with a previously reported MS detector (Bubeniková, *et al.*, 2019; Even, *et al.*, 2019; Hwang, *et al.*, 2019), and it allows simultaneous quantification of the two substrates thus expanding the possible fields of application.

Materials and methods

Materials

We developed and verified the method using commercial samples of styrene and α -methylstyrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) and toluene (Merck, Darmstadt, Germany). We separated the analytes on a chiral capillary column (β -DEX, Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) of 30 m in length, 0.25 mm of internal diameter, and a 0.25 μ m film thickness, located on a Varian-CP 3800 gas chromatograph (Palo Alto, United States) with a flame ionization detector (FID). The method was developed under the following conditions: injector temperature, 280°C; split ratio, 1/100; injection volume, 0.2 μ L; oven heating program, 50°C for 1 min at 2°C/min, 80°C for 2 min at 10°C/min, and 200°C for 12 min; FID detector temperature, 280°C. We used helium as the carrier gas at a flow and head pressure of 30 ml/min and 33 psi and the analysis time was 30 min.

We estimated the areas under the curve using the Interactive Graphics software of the Varian MS Workstation version 6.6[®].

Verification of the chromatographic method

To verify the chromatographic method we validated the quality parameters of selectivity, linearity, LOD, LOQ, precision, and accuracy. Following the steps of a typical experiment, we added 2 ml of dichloromethane to the amount required according to the calibration curve under evaluation (3.3 - 19.6 μ l styrene and 3.7 - 22.1 μ l α -methylstyrene); then we diluted an aliquot of 100 μ l in 2 ml with the same solvent, and, finally, we added 15 μ l of toluene as the internal standard. We injected the resulting sample under the conditions previously mentioned (Table 1) and we collected the chromatographic area and elution time data.

Selectivity. Selectivity refers to the ability of the method to measure and/or identify

Table 1. Linearity values of the chromatographic method

	Styrene	α -Methylstyrene
Equation	$y = 2.1002x - 0.011$	$y = 1.521x + 0.0023$
Slope	2.100	1.521
Intercept	-0.011	0.0023
Correlation coefficient (r)	0.9903	0.9940
Determination coefficient (r²)	0.9807	0.9881
G_{exp} < G_{tab}	0.34 < 0.68	0.96x10 ⁻³ < 0.68
t_{exp} > t_{cal}	25.70 > 2.16	32.39 > 2.16

simultaneously or separately the analytes of interest (Aguirre, *et al.*, 2001; Nageswara, 2018). Using the selectivity factor α as in Ec. 1, we determined if the compounds evaluated were chemically distinct under the proposed method:

$$\alpha = \left(\frac{t_{rB} - t_m}{t_{rA} - t_m} \right), \quad (1)$$

where t_{rA} and t_{rB} are the retention times of styrene and α -methylstyrene, respectively, and t_m is the dead time of the analysis.

Linearity. The linearity defines the ability of a method to obtain test results proportional to the analyte concentration in a sample (UNODC, 2009). In gas chromatography, the calibration with an internal standard is very often used (Poole, 2012). Here we determined the linearity of the method by constructing a calibration curve with five levels of concentration of the commercial sample injected in triplicate. As acceptance criteria, we used various parameters of linear regression: A correlation coefficient ($r \geq 0.99$), a determination coefficient ($r^2 \geq 0.98$), a slope significantly different from 0 ($t_{\text{exp}} > t_{\text{cal}}$), and a Cochran test ($G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$) as proof of the homogeneity of variances.

Limits of detection and quantification. The LOD of an analytical procedure is defined as the lowest detectable amount of analyte in a sample, that may not necessarily be quantifiable as an exact value (ICH, 2005; Gabhe, 2015). On the other hand, the LOQ is the lowest amount of analyte in a sample that can be quantitatively determined with the appropriate precision and accuracy (ICH, 2005; Gabhe, 2015). According to the ICH and IUPAC guidelines, the detection limit can be determined from the standard deviation of the replicated blank measurements and the slope of the calibration curve. However, when it is difficult to determine them due to instrumental noise, they can be calculated from enriched samples with a concentration close to zero.

We calculated LOD (X_d) and LOQ (X_c) using Ec. 2, 3, and 4 (Poole, 2012), where b_1 is the slope of the calibration curve, σ_{bl} is the standard deviation of the concentration sample close to 0, and k_c , k_d y k_q are statistics constants that depend on the level of significance (α) and the degrees of freedom ($gl = n-1$). In this case, $\alpha = 0.05$ y $gl = 9$, so that $k_c = k_d = 1.83$, y $k_q = 10$.

$$X_d = \left(\frac{k'_d * \sigma_{bl}}{b_1} \right) \quad (2)$$

$$k'_d = k_c + k_d \quad (3)$$

$$X_c = \left(\frac{k_q * \sigma_{bl}}{b_1} \right) \quad (4)$$

Precision. The precision of an analytical method represents the proximity between the series of measurements obtained from the same sample under the prescribed conditions (FDA, 2001). Repeatability is the estimated precision in the most optimal operating conditions: The same laboratory, the same analyst, the same instrument, and a short time interval. To assess the precision of the method, we injected each level of the calibration curve three times. We determined the experimental relative standard deviation (RSD_{exp}) and we compared the value obtained to that of the standard deviation (RSD_{cal}) in Horwitz's equation (Ec. 5).

$$RSD_{\text{cal}} = 2^{1-0.5} \log C \quad (5)$$

where C is the concentration of compound expressed as a dimensionless mass fraction at each level of the calibration curve. The precision is considered acceptable when the RSD_{exp} is less than $0.67 * RSD_{\text{cal}}$ (Zuas, *et al.*, 2016). We used a Cochran test, where the calculated statistic should be less than the tabulated one, to determine if the concentration had an effect on precision.

Accuracy. Accuracy is the proximity between the average value of a number of test results and the accepted reference value (Poole, 2012). We evaluated this parameter through the percentage of recovery or bias (Ec. 6).

$$\text{Bias (\%)} = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} * 100 \quad (6)$$

where \bar{x} is the average of the experimental concentrations of three injections for each level of the calibration curve found through the equation and x_{ref} is the real concentration used.

Commonly accepted values are between $100\pm 20\%$ (FDA, 2001, Gomes, *et al.*, 2010).

Results and discussion

Selectivity

Given the retention times of 5.47 min for styrene (A) and 9.38 min for α -methylstyrene (B) and a dead time of 1.02 min, the selectivity factor of B with respect to A equaled 1.87 indicating that under the working conditions the chromatographic method exhibited selectivity towards the two compounds.

Linearity

The results presented in **figure 1A and B** and in **table 1** indicated that the method was linear for both substrates in the concentration range evaluated since we obtained correlation coefficients (r) over 0.99 and determination coefficients (r^2) over 0.98. On the other hand, $t_{exp} > t_{tab}$ and $G_{exp} < G_{tab}$ evidenced that the slope was significantly different from 0 and that the concentration had no effect on the linearity of the method, respectively.

Limits of detection and quantification

In **table 2** we summarize the values of LOD and LOQ found for both styrene and α -methylstyrene. These results showed that the chromatographic method had remarkably low values for the quantification of these substrates.

Precision

The results shown in **table 3** indicated that the analytical method met the accepted criteria of repeatability since at all the concentration levels evaluated the RSD_{exp} was less than $0.67 * RSD_{cal}$. In its turn, the concentration variable had no effect on the precision since $G_{cal} \leq G_{tab}$.

Accuracy

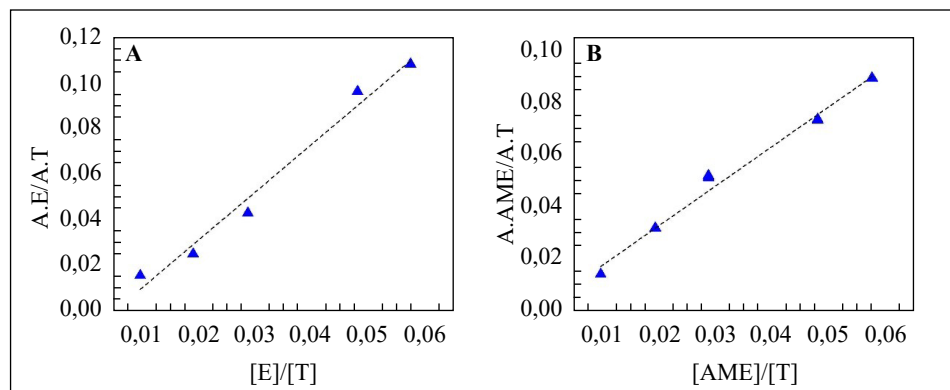


Figure 1. Calibration curves: **A.** styrene and **B.** α -methylstyrene

Table 2. LOD and LOQ valued of the chromatographic method

	Concentration (mol/L) (10^{-7})	Absolute standard deviation (mol/L) (10^{-7})	Slope of the calibration curve (*)	LOD (mol/L) (10^{-7}) ($\mu\text{g/ml}$)•	LOQ (mol/L) (10^{-7}) ($\mu\text{g/ml}$)•
Styrene	49,31	5,63	2,10	8,83 (0,09)•	26,80 (0,28)•
α -Methylstyrene	43,84	1,44	1,52	3,12 (0,04)•	9,47 (0,11)•

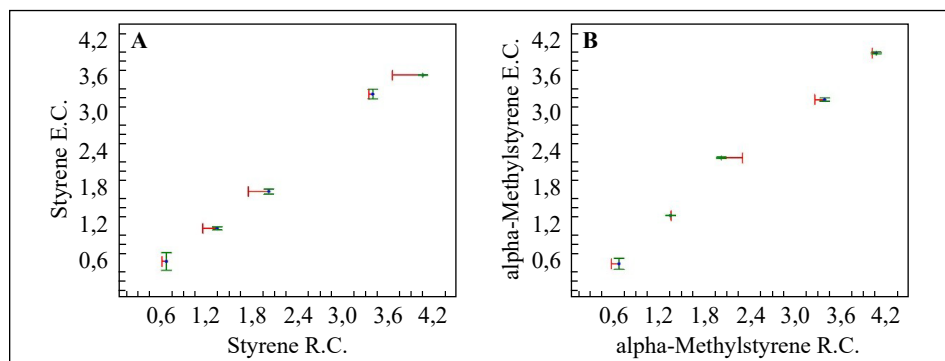
* Area/concentration

Table 3. Precision of the chromatographic method

		Concentration (mol/L)(10 ⁻³)				
Styrene	Statistics	0.683	1.346	2.029	3.396	4.059
	X ± S	(0.62 ± 0.014)x10 ⁻³	(1.16 ± 0.026)x10 ⁻³	(1.76 ± 0.043)x10 ⁻³	(3.35 ± 0.076)x10 ⁻³	(3.66 ± 0.004)x10 ⁻³
	S ²	1.95x10 ⁻³	1.70x10 ⁻³	1.96x10 ⁻³	2.25x10 ⁻³	0.52x10 ⁻⁵
	RSD _{exp}	2.32	2.27	2.42	2.28	0.11
	RSD _{cal}	8.41	7.60	7.14	6.61	6.43
	0.67*RSD_{cal}	5.64	5.09	4.78	4.43	4.31
G _{exp} < G _{tab} (0.05;5;3) 0.28 ≤ 0.68						
α-Methylstyrene	Statistics	0.681	1.362	2.029	3.388	4.069
	X ± S	(0.58 ± 0.009)x10 ⁻³	(1.37 ± 0.007)x10 ⁻³	(2.31 ± 0.013)x10 ⁻³	(3.26 ± 0.028)x10 ⁻³	(4.02 ± 0.014)x10 ⁻³
	S ²	4.25x10 ⁻⁴	0.58x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴	1.61x10 ⁻⁴	0.26x10 ⁻⁴
	RSD _{exp}	1.60	0.49	0.56	0.86	0.33
	RSD _{cal}	8.26	7.44	7.01	6.49	6.31
	0.67*RSD_{cal}	5.53	4.98	4.69	4.34	4.23
G _{cal} ≤ G _{tab} (0.05;5;3) 0.55 ≤ 0.68						

*X: Average, S: Standard deviation, S²: Variance**Table 4.** Accuracy of the chromatographic method

	Real concentration (mol/L)(10 ⁻³)	Experimental concentration (mol/L)(10 ⁻³) (X ± S)	Bias (%) (X ± S)
Styrene	0.68	0.62 ± 0.143	90,35 ± 2.10
	1.35	1.16 ± 0.026	86,58 ± 1.96
	2.03	1.76 ± 0.043	87,00 ± 2.11
	3.40	3.35 ± 0.077	98,74 ± 2.25
	4.06	3.66 ± 0.004	90,27 ± 0.10
α-Methylstyrene	0.68	0.58 ± 0.092	84,51 ± 1.35
	1.36	1.37 ± 0.007	100,60 ± 0.50
	2.03	2.31 ± 0.013	113,84 ± 0.64
	3.39	3.26 ± 0.028	96,26 ± 0.83
	4.07	4.02 ± 0.013	98,95 ± 0.33

**Figure 2. A-B.** Accuracy of the method developed: **A.** Styrene, **B.** α-methylstyrene. *E.C.: Experimental concentration, R.C.: Real concentration

As shown in **table 4** and **figure 2 A-B**, the bias values or recovery percentage at all concentration levels for the two olefins used were within the acceptable values for this parameter ($100\pm 20\%$), which means the method was accurate throughout the range of work.

Conclusions

The chromatographic method developed for the quantification of styrene and α -methylstyrene had acceptable results for each validation parameter and providing sufficient evidence to assert that it is a reliable, selective, linear, precise, and accurate method in the concentration ranges evaluated. The method and the enantioselective epoxidation reactions can be used for the analysis of samples containing either of the two substrates in plasticizers, resins, or polymers that commonly involve them.

Acknowledgements

To Colciencias and to *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia* for providing the resources for this project (*Programa de Investigadores Jóvenes*, Call 775 - Colciencias and UPTC SGI 2308).

Authors contribution

Todos los autores contribuyeron con diferentes aspectos del trabajo, BDV sección experimental y contribución a la escritura del manuscrito, JAC análisis estadístico y contribución a la escritura del manuscrito, HAR contribución a la escritura del artículo.

Conflicts of interests

All authors declare no conflicts of interest.

References

- Aguirre-Ortega, L., Pérez-Cuadrado, J., Pujol-Forn, M.** (2001). Validación de métodos analíticos. Barcelona, España: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. p. 46.
- Association of Official Agricultural Chemists - AOAC.** (2013). Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. Accessed on September 28, 2019. Available at: http://www.coma.aoac.org/app_k.pdf
- Berijani, K., Morsali, A., Hupp, J. T.** (2019). An effective strategy for creating asymmetric MOFs for chirality induction: a chiral Zr-based MOF for enantioselective epoxidation. *Catalysis Science & Technology*. **9** (13): 3388-3397.
- Bubeníková, T., Bednár, M., Gergel, T., Igaz, R.** (2019). Adsorption Effect of Added Powder Graphite on Reduction of Volatile Organic Compounds Emissions from Expanded Polystyrene. *BioResources*. **14** (4): 9729-9738.
- Coelho, M. & Ribeiro, B.** (2016). White biotechnology for sustainable chemistry (p. 249). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Even, M., Hutzler, C., Wilke, O., Luch, A.** (2019). Emissions of volatile organic compounds from polymer-based consumer products: comparison of three emission chamber sizes. *Indoor Air*. **30** (1): 40-48.
- Food and Drug Administration - FDA.** (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Accessed on September 28, 2019. Available at: <https://www.fda.gov/media/70858/download>
- Gabhe, S.** (2015). Development And Validation Of Chromatographic Methods For Simultaneous Quantification Of Drugs In Bulk And In Their Formulations: HPLC And HPTLC Techniques (p. 22-25). Hamburg, Germany: Anchor Academic Publishing.
- Gennari, O., Albrizio, S., Monteiro, M.** (2012). A GC-FID method to determine styrene in polystyrene glasses. *Food Analytical Methods*. **5** (6): 1411-1418.
- Gomes, D., de Pinho, P., Pontes, H., Ferreira, L., Branco, P., Remião, F., et al.** (2010). Gas chromatography-ion trap mass spectrometry method for the simultaneous measurement of MDMA (ecstasy) and its metabolites, MDA, HMA, and HMMA in plasma and urine. *Journal Of Chromatography B*. **878** (9-10): 815-822.
- Hadian-Dehkordi, L. & Hosseini-Monfared, H.** (2016). Enantioselective aerobic oxidation of

- olefins by magnetite nanoparticles at room temperature: a chiral carboxylic acid strategy. *Green Chemistry*. **18** (2): 497-507.
- Huang, J., Liu, S., Ma, Y., Cai, J.** (2019). Chiral salen Mn (III) immobilized on ZnPS-PVPA through alkoxy-triazole for superior performance catalyst in asymmetric epoxidation of unfunctionalized olefins. *Journal Of Organometallic Chemistry*. **886**: 27-33.
- Hwang, J. B., Lee, S., Yeum, J., Kim, M., Choi, J. C., Park, S.-J., Kim, J.** (2019). HS-GC/MS method development and exposure assessment of volatile organic compounds from food packaging into food simulants. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **36** (10): 1574-1583.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH.** (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Paper presented at the International conference on harmonization, Geneva, Switzerland.
- Poole, C.** (2012). *Gas chromatography* (1st ed., pp. 435-448). Amsterdam, Netherland: Elsevier.
- Nageswara-Rao, T.** (2018). Validation of Analytical Methods. En M.Stauffer (Ed.). *Calibration and Validation of Analytical Methods: A Sampling of Current Approaches* (pp. 131-141). London, United Kingdom: BoD-Books on Demand.
- Tang, X., Tang, Y., Xu, G., Wei, S., Sun, Y.** (2008). Highly enantioselective epoxidation of styrene and α -methylstyrene catalyzed by new doubly-immobilized chiral (salen) Mn(III) catalysts. *Catalysis Communications*. **10** (3): 317-320.
- United Nations Office on Drugs and Crime - UNODC.** (2009). *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. Accessed on September 27, 2019. Available at: https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf
- Wong, O. & Shi, Y.** (2008). Organocatalytic Oxidation. Asymmetric Epoxidation of Olefins Catalyzed by Chiral Ketones and Iminium Salts. *Chemical Reviews*. **108** (9): 3958-3987.
- Xia, Q., Ge, H., Ye, C., Liu, Z., Su, K.** (2005). Advances in Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Asymmetric Epoxidation. *Chemical Reviews*. **105** (5): 1603-1662.
- Zuas, O., Mulyana, M. R., Budiman, H.** (2016). Analytical method validation of GC-FID for the simultaneous measurement of hydrocarbons (C2-C4) in their gas mixture. *Revista Colombiana de Química*. **45** (3): 22-27.

Original article

Rapid electrochemical detection of *Staphylococcus aureus* based on screen-printed gold electrodes modified with cysteine and Guinea grass (*Panicum maximum*) peroxidase

Método electroquímico para la detección rápida de *Staphylococcus aureus* en cultivos por electrodos serigrafiados de oro modificados con cisteína y peroxidasa de pasto Guinea (*Panicum maximum*)

● Paula Guarín, ● Jonatan Cristancho, ● John J. Castillo*

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Abstract

We present a novel electrochemical method for a rapid analytical detection of *Staphylococcus aureus* in culture and spiked milk samples through hydrogen peroxide (H_2O_2) consumption on a screen-printed gold electrode (SPGE) modified with cysteine and peroxidase from Guinea grass leaves (GGP). This peroxidase (POD) had a specific activity of $470 U mg^{-1}$ and it was immobilized on an SPGE surface previously modified with cysteine. Cyclic voltammograms of gold electrodes modified with peroxidase and cysteine in the presence of potassium ferrocyanide as a redox probe demonstrated an increase of approximately 5% in the current compared to the bare gold electrode. The SPGE modified electrode exhibited a good electrocatalytic response towards H_2O_2 reduction. We added a constant H_2O_2 concentration of $1 \times 10^{-3} M$ to the culture medium and measured the decrease in the H_2O_2 current at $-780 mV$ consumed by catalase from *S. aureus*. Our modified electrode proved to sense *S. aureus* in a range concentration between 3×10^2 and $3 \times 10^8 CFU/mL^{-1}$ with a detection limit of $102 CFU/mL^{-1}$, detection time of about ~ 20 min, and a sensitivity of $0.020 mA CFU^{-1}$.

Keywords: Guinea grass peroxidase; *Staphylococcus aureus*; Electrochemical detection; Screen-printed electrodes.

Resumen

Se desarrolló un novedoso método electroquímico para la detección rápida y analítica de *Staphylococcus aureus* en cultivos y muestras de leche enriquecidas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante el consumo de peróxido por electrodos serigrafiados de oro (ESO) modificados con cisteína y peroxidasa de pasto Guinea (PPG). La peroxidasa de las hojas del pasto Guinea, con una actividad específica de $470 U mg^{-1}$, se inmovilizó sobre la superficie de los ESO previamente modificada con cisteína. Los voltamperogramas cíclicos de los ESO modificados con PPG y cisteína en presencia de ferrocianuro de potasio como sonda redox exhibieron un incremento en la corriente de aproximadamente 5 % comparado con el electrodo sin modificar. El ESO modificado mostró una buena respuesta electrocatalítica en la reducción de H_2O_2 . El medio de cultivo en presencia de $1 \times 10^{-3} M$ de H_2O_2 registró una disminución en la corriente por la catalasa presente en *S. aureus* a un potencial de $-780 mV$. El ESO modificado pudo detectar *S. aureus* en un rango de concentraciones entre 3×10^2 and $3 \times 10^8 UFC mL^{-1}$ con un límite de detección de $102 ufc mL^{-1}$, un tiempo de detección de ~ 20 min y una sensibilidad de $0,020 mA UFC^{-1}$.

Palabras clave: Peroxidasa de pasto Guinea; *Staphylococcus aureus*; Detección electroquímica; Electrodos serigrafiados.

Citation: Guarín P, Cristancho J, Castillo JJ. Rapid electrochemical detection of *Staphylococcus aureus* based on screen-printed gold electrodes modified with cysteine and Guinea grass (*Panicum maximum*) peroxidase. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):835-844, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1019>

Editor: Myriam Sánchez de Gómez

***Corresponding autor:**
John J. Castillo; jcasleon@uis.edu.co

Received: November 14, 2019

Accepted: April 24, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Introduction

The growth of the world population and the increase of mega-farming to meet nutritional needs have contributed to the spread of bacterial infectious diseases worldwide (**Lazcka, et al.**, 2007; **Yue, et al.**, 2016; **Muraoka, et al.**, 2011). Every year, millions of people are infected with pathogenic bacteria after consuming food contaminated, mainly with *Staphylococcus aureus*, a Gram-positive bacterium that causes skin infections (including abscesses), gastroenteritis, and food poisoning (**Velusamy, et al.**, 2010; **Liu, et al.**, 2017). In this context, the detection of bacterial pathogens is crucial in the fields of medicine, food safety, and public health, among others (**Amiri, et al.**, 2018).

Several methods have been described to detect bacterial pathogens including routine bacterial agar plate culture, polymerase chain reactions (PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and molecular biology protocols based on nucleic acids (**Xu, et al.**, 2012; **Escamilla-Gómez, et al.**, 2007). Although the effectiveness and robustness of these methods are not under discussion, most of them are costly, complex, time-consuming, and have low sensitivity. Therefore, it is very important to develop innovative strategies to improve their performance.

Electrochemical sensors are powerful analytical tools that play a key role in the detection of environmental and biomedical analytes when combined with enzymes as biorecognition elements due to their simplicity, *in situ* real time analysis, rapidity, and convenience (**Gao, et al.**, 2007). Enzymatic biosensors based on horseradish peroxidase (HRP) has received much attention in the last two decades for their high specificity towards hydrogen peroxide (**Chen, et al.**, 2006). However, this type of peroxidase (POD) is potentially inactivated at high H_2O_2 concentrations, which limits its bioelectrocatalytic activity. Therefore, the search for new alternative sources of POD with improved biocatalytic properties is a challenge for biotechnological applications. Recently, a novel POD from Guinea grass (*Panicum maximum*) (GGP) was isolated and biochemically characterized (**Centeno, et al.**, 2017). GGP was integrated with zinc nanoparticles in screen-printed platinum electrodes to detect H_2O_2 , a molecule of environmental and biological significance that can be used as a biomarker in cellular apoptosis processes (**Uribe, et al.**, 2019). In another study, GGP was integrated on the surface of screen-printed carbon nanotubes electrodes for triclosan detection showing an electrocatalytic activity of 370 mV at a redox potential and a linear response between 20 mM to 80 mM (**Orduz, et al.**, 2019).

Several researchers have developed novel electrochemical biosensors for measuring bacterial populations based on common electrochemical methods such as voltammetry, amperometry/potentiometry, and impedance spectroscopy. For example, **Pérez, et al.** (2001) developed an amperometric culture-based method using 4-aminophenyl- β -D-galactopyranoside hydrolysis on an electroactive compound (4-aminophenol) for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in water. Using a similar approach, **Nistor, et al.** (2002) fabricated a cellobiose dehydrogenase sensor to test *E. coli* cell viability. **Alexandre, et al.** (2018) achieved the rapid determination of *Salmonella typhimurium* in milk samples with a low limit detection (10 CFU/mL^{-1}) using a specific biosensor developed from modified gold screen-printed electrodes. An electrochemical method using cyclic voltammetry successfully detected polyaniline-labeled *E. coli* O157:H7 with 7 CFU/mL (**Settington, et al.** 2011) while real-time monitoring of bacterial contamination was done with a piezoelectric microelectrode array system exhibiting a detection limit of 102 CFU/mL^{-1} and analysis time of 5 h. (**Ren, et al.**, 2014). On the other hand, researchers have used impedimetric detection methods to measure impedance changes of small amplitude with a sinusoidal voltage signal as a frequency function while an anti-*E. coli* antibody was immobilized on a gold electrode exhibiting a linear relationship between the electron-transfer resistance and *E. coli* concentration logarithmic values in the range of 3×10^3 - $3 \times 10^7\text{ CFU/mL}^{-1}$ (**Wang, et al.**, 2012). Other teams have used a microfluidic immunosensor based on nanoporous membranes to detect *S. aureus* through the blocking of the electrolyte current and monitored the change by impedance spectroscopy (**Tan, et al.**, 2011).

These electrochemical techniques take advantage of the electroactive molecules excreted or taken by microorganisms to measure the concentration of different bacterial populations indirectly. *S. aureus* produces different toxins and enzymes which are virulent factors and possess many defense mechanisms based on enzymes such as catalases, which facilitate cell detoxification by neutralizing the bactericidal effects of H₂O₂ (HIS, *et al.*, 2014). Catalase has been useful to differentiate between staphylococci and streptococci and, besides, it promotes the conversion of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen. By using the *S. aureus* catalase it is possible to detect hydrogen peroxide and, thus, measure its consumption to determine the concentration of bacterial populations. Interestingly, this mechanism has been used for the rapid electrochemical quantification of *Staphylococcus aureus* through the indirect consumption of H₂O₂ by catalase in sample foods using platinum electrodes (Majumdar, *et al.*, 2013). Despite all the advantages of platinum electrodes, there are still limitations that require novel strategies like the incorporation of PODs, enzymes that require H₂O₂ to carry out their biocatalytic functions, on the surface electrode to improve their performance.

The aim of the present study was the electrochemical detection of *S. aureus* through the monitoring of H₂O₂ consumption by the *S. aureus* catalase using screen-printed gold electrodes (SPGE) modified with cysteine and peroxidase from Guinea grass (*Panicum maximum*).

Experimental

Materials and chemicals

Screen-printed gold electrodes (SPGE, 220AT) were provided by DropSens (Oviedo, Spain). They are composed of a gold surface (working electrode, 4 mm of diameter), a silver pseudo-reference electrode, and a carbon electrode as an auxiliary electrode. All chemicals and culture media used in this study were commercially purchased from Sigma-Aldrich Corp. and Merck.

Extraction and partial purification of Guinea grass peroxidase

POD was partially purified from Guinea grass leaves as described by Rodriguez, *et al.* (2002). Briefly, leaves were triturated and homogenized with constant stirring in 30 mM phosphate buffer, pH 8.0 for 1 h at 25°C. The homogenate was filtered and centrifuged (7000 rpm, 15 min) and the solid was discarded. Then, the polyphenolic compounds were extracted by using a two-phase system containing 14% (w/v) poly (ethylene glycol) and 15% (w/v) (NH₄)₂SO₄. The aqueous phase was applied directly to a Sephadex G-75 column (1.5 x 35cm) previously equilibrated with TRIS buffer 1mM, pH 8.0. Finally, the fractions containing the POD were concentrated by ultracentrifugation (7000 rpm for 25 min at 4°C) with Amicon membranes (10,000 kDa), and the activity was measured by UV-vis spectrophotometry following the oxidation of guaiacol 10 mM ($\epsilon_{470} = 5200 \text{ M cm}^{-1}$) in the presence of H₂O₂ 4 mM and 10 μL of the enzyme. Protein concentration was measured with the Bradford assay (Bradford, *et al.*, 1976).

Preparation of the bacterial culture

We cultured a pre-inoculum of *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 25922 in Luria-Bertani (LB) and MRSA in Müller-Hinton (MH) agar at 37°C and 200 rpm during 12 h. Then, the culture of each strain was set at 0.5 with the MacFarland scale (10⁸ CFU/mL⁻¹) The bacteria were centrifuged at 6000 rpm for 5 min to remove the supernatant and then washed with PBS three times. Finally, bacterial culture was serially diluted in a range between 3x10⁻² and 3x10⁸ CFU/mL⁻¹.

Modification of screen-printed gold electrodes

Before immobilizing the cysteine and the GGP, gold electrodes were carefully cleaned with a mild version of a piranha solution (50 mM H₂SO₄ / 25% H₂O₂) for 10 min and rinsed with milli-Q water. For the SPGE modification, a self-assembly monolayer of

cysteine was formed on the surface of bare gold electrodes by soaking them in 1 mM cysteine solution for 10 min at room temperature (this electrode was denoted as SPGE-cys). Then, these SPGE-cys were gently rinsed with PBS buffer 10 mM pH 7.0 to remove free GGP and cysteine. To modify SPGE-cys with GGP, 4 μ L of homogeneous EDC solution (25 mM) were mixed with 6 μ L of GGP and magnetically stirred for 1 h. The conjugation reaction was carried out in the presence of sulfo-NHS to avoid competing reactions (Castillo, *et al.*, 2014). Then the GGP activated with EDC was further dropped on top of the electrode surface. After 4 h of incubation at 4°C, the modified electrode was washed with phosphate buffer 10 mM pH 7.0 to eliminate EDC and GGP. **Figure 1** shows a schematic representation of the SPGE modification with cysteine and GGP and the principle of *S. aureus* detection.

Electrochemical studies

Electro-analytical measurements were done with an Autolab PGSTAT101 (Echo Chemie, Utrecht) controlled by the NOVA 1.10.1.9 software (Metrohm, Filderstand). All the experiments were carried out at room temperature; before each cyclic voltammetry (CV) experiment, the solution was degasified with pure N₂ and magnetically stirred for 30 s, then, ascorbic acid (oxygen scavenger) at 0.05 mM was added to the cell measurement.

CVs were used to study the electrocatalytic activity of GGP towards H₂O₂ reduction and to evaluate the electron transfer process by using potassium ferrocyanide ((Fe(CN)₆)^{3-/4-} 10 mM and KCl 100 mM contained in a PBS solution 10 mM (pH 7.0) as a redox probe; they were carried out at a scan rate of 100 mV/s.

Electrochemical sensing of H₂O₂ consumption by *Staphylococcus aureus* in pure culture and milk samples

The SPGE-cys-GGP electrodes were immersed in each of the *S. aureus* solutions in the presence of 1mM of H₂O₂. Then, the electrode was left for 3 minutes to evaluate the response at the rapid growth phase of bacteria. CVs at a range potential between 800 and -800 mV were measured for each concentration of the bacteria.

Considering the pathogenicity of *S. aureus* in contaminated food samples, we analyzed milk samples pre-inoculated with the bacteria (3x10⁴ CFU/mL⁻¹) as real samples to evaluate the performance of the SPGE-cys-GGP electrode.

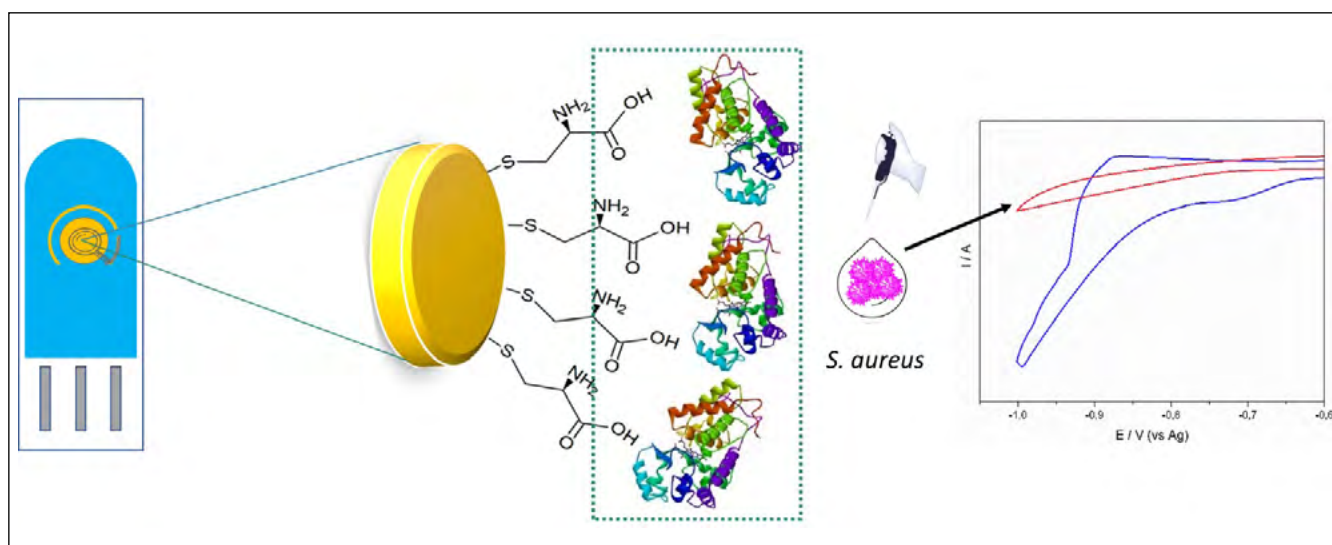


Figure 1. Schematic representation of gold modified electrode with GGP and cysteine and electrochemical principle of detection of *S. aureus*. (A) Gold screen printed electrode modified with cysteine and GGP; (B) Cyclic voltammograms of the detection of H₂O₂ 1 mM in presence (red line) and in absence of *S. aureus* (blue line).

Results and discussion

Partial purification of Guinea grass peroxidase

GGP is an anionic peroxidase with a molecular weight of 35 KDa; like many other PODs from plants it has a high concentration of coloured compounds that were removed by using the two-phase system PEG-ammonium sulfate.

As shown in **table 1**, after eliminating the pigments, GGP specific activity was 217.7 U mg⁻¹. An additional increase in the purification factor was observed after exclusion chromatography and ultrafiltration with a specific activity of 351,7 and 470,8 U mg⁻¹, respectively, which agrees with previous results by **Centeno, et al.** (2017).

Electrochemical characterization of screen-printed gold modified and unmodified electrodes

The electrochemical response of SPGE to ferrocyanide (Fe(CN)₆)⁴⁻/ferricyanide (Fe(CN)₆)³⁻ redox probe system was established to monitor the barrier created after each modification step on the surface electrode. **Figure 2A** shows the ferro/ferricyanide couple CVs for the modified and unmodified gold electrodes. The CVs of the unmodified and modified electrodes with cysteine and cysteine-GGP, respectively, evidenced well-defined redox signals ($\Delta E_p = 111$ mV, $\Delta E_p = 108$ mV, and $\Delta E_p = 74$ mV for SPGE, SPGE-cys, and SPGE-cys-GGP, respectively), which reflects a quasi-reversible behavior controlled by the diffusion of the electroactive species moving to the electrode surface. The peroxidase-SPGE-modified electrode improved the transfer between GGP and the electrode compared to the bare gold electrode.

Table 1. Stages in the partial purification of GGP

Stage	Volume (mL)	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification fold
Leaves extraction	199	35	36930	185	100	1
Removing of pigments	119	14	25911	217	70	1,8
Exclusion chromatography	68	6	23916	351	64	3,8
Ultrafiltration	42	2	19773	470	53	9,3

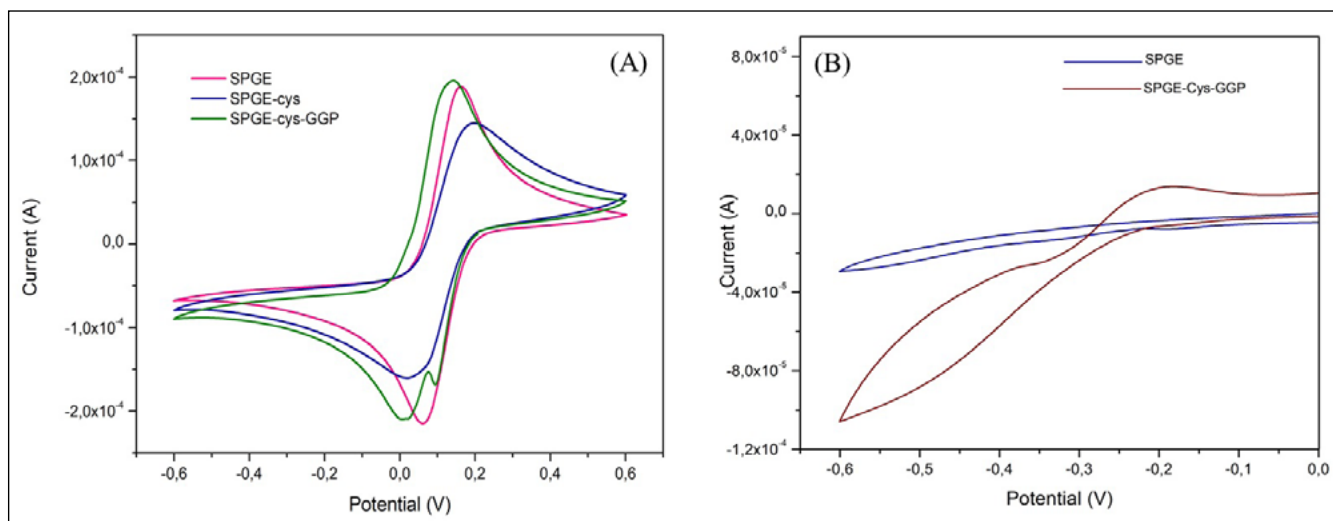


Figure 2. (A) CVs of bare SPGE (pink), SPGE-cys (blue) and SPGE-cys-GGP (green) in the presence of 10 mM K₃Fe(CN)₆ containing 0.1 M KCl, scan rate 50 mV s⁻¹, (B) CVs of unmodified SPGE (blue) and SPGE-cys-GGP (wine) in the presence of 1mM H₂O₂, scan rate 50 mV s⁻¹.

Bioelectrocatalytic reduction of H_2O_2 by modified and unmodified electrodes

To evaluate the reduction of H_2O_2 by GGP, we measured CVs in the presence and in the absence of H_2O_2 1mM for bare SPGE electrodes and those modified with peroxidase. There was no appreciable change in the current reduction peak for the bare gold electrode and, as expected, when GGP sensed H_2O_2 we observed a decrease in the reduction peak around -457 mV (**Figure 2B**) thus demonstrating the role of PODs as an efficient biocatalyst. Most of the electrochemical biosensors based on plant peroxidases have shown similar potential for bioelectrocatalytic reduction of H_2O_2 (**Gao, et al., 2007; Castillo, et al., 2006; Villamizar, et al., 2016**). These results suggest that the electrocatalytic reduction of H_2O_2 by SPGE-cys-GGP has potential utility for monitoring the decrease in hydrogen peroxide concentration to detect catalase-positive bacteria.

Detection of *Staphylococcus aureus* by screen-printed gold electrode modified with cysteine and Guinea grass peroxidase

Staphylococcus aureus is a Gram-positive catalase-producing bacterium, an enzyme that allows the bacteria to better resist intra- and extra-cellular death by hydrogen peroxide. On the other hand, GGP needs hydrogen peroxide to oxidize its typical substrates; therefore, these two features determine the sensing principle of the hydrogen peroxide consumed by the GGP in the absence or in the presence of *S. aureus*. This sensing principle was also used by **Majumdar, et al. (2013)** to detect *S. aureus* using platinum electrodes.

To evaluate the response of the SPGE-cys-GGP electrode we studied it in *S. aureus* concentrations ranging between 3×10^2 - 3×10^8 CFU/mL⁻¹ (**Figure 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1019/2836>).

CVs (**Figure 3A**) were analysed around -780 mV for the quantitative determination of *S. aureus*. As shown in **figure 3B**, the reduction current of H_2O_2 decreased while *S. aureus* concentration increased due to the consumption of the H_2O_2 by the catalase present in the bacteria. A linear relationship existed between the reduction of the H_2O_2 current and the *S. aureus* concentration logarithm. The linear fit obtained was $I(\text{mA}) = 2,83 \times 10^{-5} (\text{UFC/mL}^{-1}) - 0,02091$, with a 0,9816 correlation coefficient. The SPGE-modified electrode exhibited a wide linear range (10^2 to 10^8 CFU/mL⁻¹), a sensitivity of $0.020 \text{ mA CFU}^{-1}$, and a detection limit of 10^2 CFU/mL⁻¹.

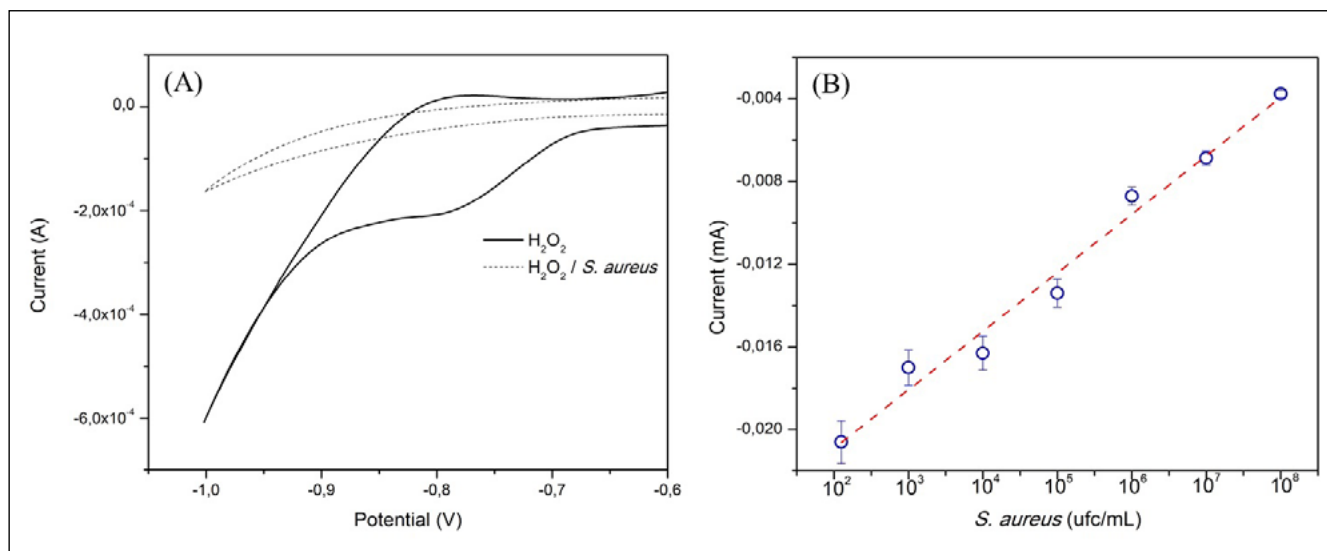


Figure 3. (A) Cyclic voltammetry response of SPGE-cys-GGP in 1 mM H_2O_2 in the presence of *S. aureus* 3×10^8 cfu mL⁻¹ (dash line) and in the absence (solid line), scan rate 50 mV s^{-1} , (B) Reduction current response of H_2O_2 1 mM by SPGE-cys-GGP at different concentrations of *S. aureus*, -780 mV potential.

To evaluate the ability of our sensor to differentiate between Gram-positive and Gram-negative bacteria, we followed the same procedure as with *S. aureus* but with *E. coli*, a Gram-negative, facultatively anaerobic, rod-shaped, and catalase-negative bacteria that we used as a negative control (**Figure 4**). It is worth mentioning that there are other types of catalase-positive bacteria that can affect the selectivity of the sensor, as well as other types of interferences (**Han, et al., 2019; Xu, et al., 2018**). The purpose of this experiment was to evaluate the ability of the sensor to differentiate the electrochemical response of *S. aureus* from *E. coli*.

The electrocatalytic current of H_2O_2 by the GGP on a gold electrode in PBS and *E. coli* 10^4 CFU/mL⁻¹ remained almost unaffected but exhibited notable differences compared with *S. aureus* at the same concentration. The data indicated a cathodic current (I_c) value of nearly 73 μA for *S. aureus*, whereas PBS and *E. coli* exhibited an I_c of 90 and 91 μA , respectively (**Figure 3A**).

Additionally, the mean detection time using our modified gold electrode was about 20 min, shorter than routine microbiological methods (48 h). These results indicated that the modified gold electrode we developed had a rapid electrochemical response. **Table 2** compares the analytical performance in previous reports and the results obtained in this study.

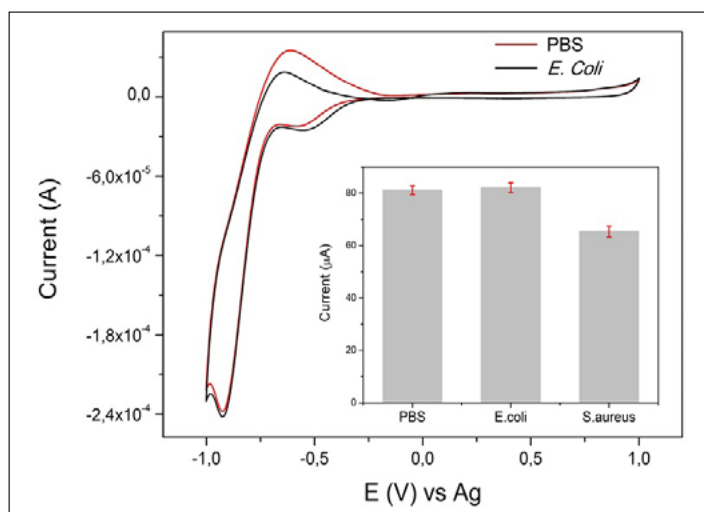


Figure 4. CV response of SPGE-cys-GGP in PBS + H_2O_2 1 mM and in the presence of *E. coli* culture + H_2O_2 1 mM; inset: comparison of H_2O_2 reduction current by SPGE-cys-GGP in PBS, *E. coli*, and *S. aureus*, 3×10^4 CFU/mL⁻¹

Table 2. Comparison of electrochemical methods for sensing bacterial populations

Electrochemical technique	Bacteria	Electrode	Detection range (CFU/mL ⁻¹)	Detection time (min)	Reference
Amperometry	<i>Salmonella</i>	Screen-printed gold electrode	1×10^1 - 1×10^6	125	(Alexandre, et al., 2018)
DPV	<i>Staphylococcus aureus</i>	Mesoporous hollow carbon paste electrode	0.125×10^2 - 2.5×10^2	-	(Niu, et al., 2018)
Impedimetry	<i>Staphylococcus aureus</i>	Glassy carbon electrode	1×10^1 - 1×10^6	60	(Wei, et al., 2014)
Amperometry	<i>Salmonella</i>	Glassy carbon electrode	1×10^1 - 1×10^5	50	(Liebana, et al., 2009)
EIS	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gold nanoparticles	1.2×10^1 - 1.2×10^8	30	(Shahrokhian, et al., 2018)
Amperometry	<i>Escherichia coli</i>	Screen-printed carbon electrode	1×10^2 - 1×10^7	-	(Lin, et al., 2008)
CV	<i>Staphylococcus aureus</i>	Screen-printed gold electrode	1×10^1 - 1×10^8	20	This work

DPV: Differential Pulse Voltammetry; EIS: Electrochemical Impedance Spectroscopy; CV: Cyclic Voltammetry

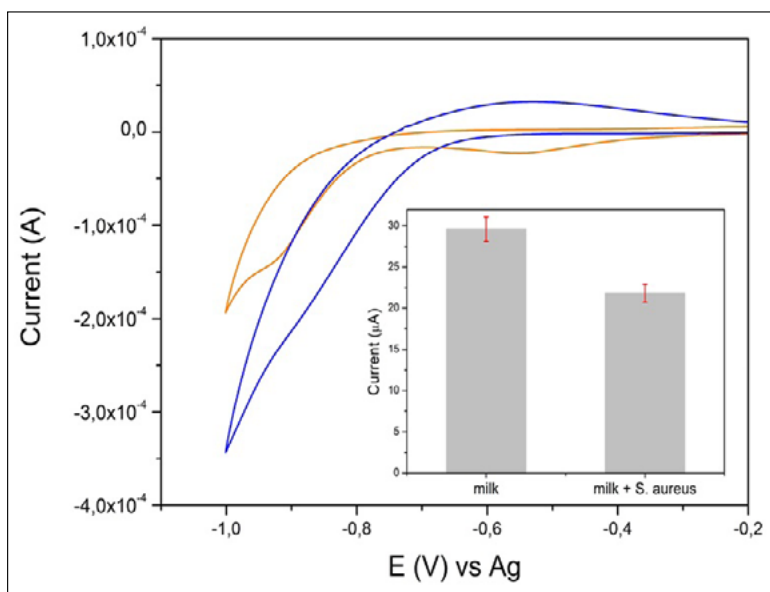


Figure 5. CVs of milk samples in the absence (orange) and in the presence (blue) of *S. aureus* 3×10^4 CFU/mL⁻¹; inset: comparison of the reduction current of H₂O₂ by SPGE-cys-GGP in milk samples

To test the ability of our SPGE-cys-GGP electrode in real samples, we used a brand of commercial milk from a local store. The milk sample was previously spiked with H₂O₂ 1 mM and *S. aureus* at a concentration of 10^4 CFU/mL⁻¹ and we registered the electrocatalytic reduction current of H₂O₂ by GGP. A milk sample with no *S. aureus* was used as a control.

As is shown in **figure 5B**, the reduction current for H₂O₂ registered a value of 30 μA while in the milk sample with *S. aureus* it was 21 μA indicating that the GGP-SPGE-modified electrode was suitable for sensing *S. aureus* in real food samples.

Conclusions

A sensitive and rapid electrochemical method for the detection of *S. aureus* was successfully developed. The modification of the gold bare electrode with a cysteine layer and guinea Grass peroxidase increased the electron transfer and the electrochemical signal allowing direct detection of *S. aureus* in pure culture and milk samples without any pre-enrichment method with short times to obtain an electrochemical response. These features make the SPGE-cys-GGP electrode a promising bioanalytical tool for rapid and easy detection of *S. aureus* in food samples.

Supplementary information

Figure 1S. Cyclic voltammetry response of SPGE-cys-GGP different concentrations of *S. aureus* in 1 mM H₂O₂, scan rate 50 mV s⁻¹. See the figure 1S en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1019/2836>

Acknowledgements

We are grateful to *Universidad Industrial de Santander* for the financial support provided to Project 5762.

Authors contribution

PG developed the assay and recorded and treated most data; JC developed the bacteria assays; JJCL designed and supervised the project and wrote the main text with PG and JC. The manuscript was discussed and corrected by all co-authors.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Alexandre, D.L., Melo, A.A., Furtado, R.F., Borges, M.F., Figueiredo, E.A., Biswas, A., Cheng, H.N., Alves, C. (2018). A rapid and specific biosensor for Salmonella typhimurium detection in milk. *Food and Biop Techn.* **11**: 748-756.
- Amiri, M., Bezaatpour, A., Jafari, H., Boukherroub, R., Szunerits, S. (2018). Electrochemical methodologies for the detection of pathogens. *ACS Sensors.* **6**: 1059-1086.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **254**: 248-254.
- Castillo, J., Ferapontova, E., Hushpulian, D., Tasca, F., Tishkov, V., Chubar, Gorton, L. (2006). Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of H₂O₂ reduction of recombinant tobacco peroxidase on graphite. Effect of peroxidase single-point mutation on Ca²⁺-modulated catalytic activity. *J Electroanal Chem.* **588**: 112-121.
- Castillo, J. J., Rindzevicius, T., Wu, K., Schmidt, M. S., Janik, K. A., Boisen, A., Castillo-León, J. (2014). Synthesis and characterization of covalent diphenylalanine nanotube-folic acid conjugates. *J Nanop Res.* **16**: 2524-2532.
- Centeno, D. A., Solano, X. H., Castillo, J. J. (2017). A new peroxidase from leaves of Guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry.* **116**: 33-38.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Xu, L., Wang, N., Li, X., Zhang, L. (2006). Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on the layer-by-layer assembly films of gold colloidal nanoparticles and toluidine blue. *Electroanalysis.* **18**: 471-477.
- Escamilla-Gómez, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J. M. (2007). Development of an amperometric immunosensor for the quantification of *Staphylococcus aureus* using self-assembled monolayer-modified electrodes as immobilization platforms. *Electroanalysis.* **19**: 1476-1482.
- Gao, F., Yuan, R., Chai, Y., Tang, M., Cao, S., Chen, S. (2007). Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of Hb on gold nanoparticles/cysteine/poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-modified platinum disk electrode. *Col Surf A: Physicochem Eng Asp.* **295**: 223-227.
- Gao, F., Yuan, R., Chai, Y., Tang, M., Cao, S., Chen, S. (2007). Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of Hb on gold nanoparticles/cysteine/poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-modified platinum disk electrode. *Col Surf A: Physicochem Eng Asp.* **295**: 223-227.
- Han, D., Yan, Y., Wang, J., Zhao, M., Duan, X., Kong, L., Wu, H., Cheng, W., Min, X., Ding, S. (2019). An enzyme-free electrochemiluminescence aptasensor for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* by the quenching effect of MoS₂-PtNPs-vancomycin to S₂O₈²⁻/O₂ system. *Sensors Act. B: Chem.* **288**: 586-593.
- HSI, M. (2014). *Staphylococcus aureus* can Produce Catalase Enzyme when React with Human Wbcs as a Source of H₂O₂ Productions in Human Plasma or Serum in the Laboratory. *J Med Microbiol & Diag.* **3**: 3-4.
- Lazcka, O., Campo, F. J. Del, Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Bios Bioelect.* **22**: 1205-1217.
- Liebana, S., Lermo, A., Campoy, S., Cortes, M., Alegret, S., Pividori, A. (2009). Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. *Bios Bioelect.* **25**: 510-513.
- Liu, H., Li, H., Wu, T., Hao, T. (2017). Differences of Bactericidal Efficacy on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* of Slightly and Strongly Acidic Electrolyzed Water. *Food and Biop Techn.* **10**: 155-164.
- Lin, Y., Chen, S., Chuang, Y., Lu, Y., Shen, T., Chang, C., Lin, C. (2008). Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens Bioelect.* **23**: 1832-1837.
- Majumdar, T., Chakraborty, R., Raychaudhuri, U. (2013). Rapid Electrochemical Quantification of Food Borne Pathogen *Staphylococcus aureus* Based on Hydrogen Peroxide Degradation by Catalase. *J Electrochem Soc.* **160**: G75-G78.

- Muraoka, T. & Wesley, I.** (2011). Time of Entry of *Salmonella* and *Campylobacter* into the Turkey Brooder House. *Food and Biop Techn.* **4**: 616-623.
- Nistor, C., Osvik, A., Davidsson, R., Rose, A., Wollenberger, U., Fiksdal, L.** (2002). Detection of *Escherichia coli* in water by culture-based amperometric and luminometric methods. *Wat Sci Techn.* **45**: 191-199.
- Niu, X., Si, Q., Chen, Y., Luo, R., Wang, H.** (2018). A sortase A-immobilized mesoporous hollow carbon sphere-based Biosensor for detection of gram-positive bacteria. *J Elect Mat.* **47**: 4124-4135.
- Orduz, A. E., Gutiérrez, J. A., Blanco, S. I., Castillo, J. J.** (2019). Amperometric detection of triclosan with screen-printed carbon nanotube electrodes modified with Guinea Grass (*Panicum maximum*) peroxidase. *Universit Scient.* **24**: 363-379.
- Pérez, F., Tryland, I., Mascini, M., Fiksdal, L.** (2001). Rapid detection of *Escherichia coli* in water by a culture-based amperometric method. *Anal Chim Acta*, **427**: 149-154.
- Ranjbar, S. & Shahrokhian, S.** (2018). Design and fabrication of an electrochemical aptasensor using Au nanoparticles/carbon nanoparticles/cellulose nanofibers nanocomposite for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry.* **123**: 70-76.
- Ren, J., Zhou, Y., Zhou, Y., Zhou, C., Li, Z., Lin, Q., Huang, X.** (2015). A piezoelectric piezoelectrode arrays system for real-time monitoring of bacterial contamination in fresh milk. *Food and Biop Techn.* **8**: 228-237.
- Rodríguez, A., Pina, D. G., Yélamos, B., Castillo León, J. J., Zhadan, G. G., Villar, Shnyrov, V. L.** (2002). Thermal stability of peroxidase from the African oil palm tree *Elaeis guineensis*. *Europ J Biochem.* **269**: 2584-2590.
- Settingington, E. B. & Alocilja, E. C.** (2011). Rapid electrochemical detection of polyaniline-labeled *Escherichia coli* O157:H7. *Bios Bioelect.* **26**: 2208-2214.
- Tan, F., Leung, P. H. M., Liu, Z. Bin, Zhang, Y., Xiao, L., Ye, W., Yang, M.** (2011). A PDMS microfluidic impedance immunosensor for *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* detection via antibody-immobilized nanoporous membrane. *Sens Actuat B: Chem.* **159**: 328-335.
- Uribe, P. A., Ortiz, C. C., Centeno, D. A., Castillo, J. J., Blanco, S. I., Gutiérrez, J. A.** (2019). Self-assembled Pt screen printed electrodes with a novel peroxidase *Panicum maximum* and zinc oxide nanoparticles for H₂O₂ detection. *Col Surf A: Physicochem Eng Asp.* **561**: 18-24.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C.** (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotech Adv.* **28**: 232-254.
- Villamizar, E. N., Ríos, C. A., Castillo, J. J.** (2016). A hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of the highly stable royal palm tree peroxidase (*Roystonea regia*) with chitosan and glutaraldehyde on screen-printed graphene. *J Mex Chem Soc.* **60**: 135-140.
- Wang, Y., Ye, Z., Ying, Y.** (2012). New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors.* **12**: 3449-3471.
- Wei, X., Wang, Z., Xia, Y., Wu, S., Duan, N., Jia, F.** (2014). Impedimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles. *Microchim Acta.* **181**: 967-974.
- Xu, L., Liang, W., Yang, X., Jia, N., Zuo, X., Liu, G.** (2018). An ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection of mecA gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosens. Bioelect.* **99**: 424-430.
- Xu, S.** (2012). Electromechanical biosensors for pathogen detection. *Microchim Acta.* **178**: 3-4.
- Yue, H., Zhou, Y., Wang, P., Wang, X., Wang, Z., Wang, L., Fu, Z.** (2016). A facile label-free electrochemiluminescent biosensor for specific detection of *Staphylococcus aureus* utilizing the binding between immunoglobulin G and protein A. *Talanta*, **153**: 401-406.

Artículo original

Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes

Comparison of the composition and antioxidant activity of the chamomile essential oil (*Matricaria chamomilla* L.) obtained by supercritical fluids extraction and other green techniques

✉ María Camila Melo-Guerrero*, ✉ Daniel Esteban Ortiz-Jurado,
✉ Andrés Mauricio Hurtado-Benavides

Programa de Ingeniería Agroindustrial, de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, en Pasto, Nariño, Colombia.

Resumen

Se comparó la composición química y la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos (*supercritical fluid extraction*, SFE) y otras técnicas de extracción verdes (arrastre con vapor, AV; hidrodestilación, HD; destilación por arrastre con vapor y extracción simultánea con solvente orgánico, DES, y maceración, MC). Se optimizó el proceso de extracción evaluando el efecto de la temperatura (T) (35-65 °C) y la presión (P) (90-210 bar) en el rendimiento de la extracción (% p/p) y se determinó que una temperatura de 65 °C y una presión de 210 bar eran las mejores condiciones de extracción (0,87 % p/p). La composición química se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se establecieron los constituyentes con base en sus patrones de fragmentación y el índice de retención de Kovats. La actividad antioxidante se evaluó mediante el método ABTS. Los componentes principales fueron enindicioleter, β -farneseno y óxido de bisabolol A. Los resultados de los análisis de GC-MS indicaron que la composición y concentración del aceite esencial cambiaron al emplear diferentes métodos de extracción, por ejemplo, en los aceites extraídos por MC el componente mayoritario fue el enindicioleter, en tanto que en los extraídos por HD fue el β -farneseno y con DES fue el óxido de bisabolol A. El aceite obtenido por AV (27,56 μ mol de trolox/ml de aceite) presentó una mayor actividad antioxidante en comparación con los otros métodos de extracción, incluso comparado con el SFE (15,25 μ mol de trolox/ml de aceite).

Palabras clave: *Matricaria chamomilla* L.; Aceite esencial; Actividad antioxidante.

Abstract

The chemical composition and antioxidant activity of the chamomile essential oil (*Matricaria chamomilla* L.) obtained by supercritical fluids extraction (SFE) and other green techniques (steam stripping, AV; hydrodistillation, HD; steam-dragging distillation with simultaneous steam-extraction using an organic solvent, DES, and maceration (MC). We optimized the extraction process with supercritical fluids by checking the effect of temperature (35-65°C) and pressure (90-210 bar) on the extraction yield (% w/w) and we determined that the best extraction conditions (0.87% w / w) were at 65°C and 210 bar. We analyzed the chemical composition by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and identified the constituents based on their fragmentation patterns and Kovat's index. We evaluated the antioxidant activity using the ABTS method. The main components were en-yn-dicycloeter, β -farnesene, and bisabolol oxide A.

Citación: Melo-Guerrero MC, Ortiz-Jurado DE, Hurtado-Benavides AM. Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):845-856, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.862>

Editor: Sonia Moreno

***Correspondencia:**

María Camila Melo Guerrero;
maria.camy28@hotmail.com

Recibido: 28 de junio de 2019

Aceptado: 24 de marzo de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

The results of the GC-MS analyses indicate that when using different extraction methods the composition and concentration of the essential oil changes, for example, the oils extracted by MC had en-yn-dicycloeter is their main component while for those extracted by HD it was β -farnesene, and by DES ii was bisabolol oxide A. The oil obtained by AV (27.56 μmol trolox/ml of oil) had a higher antioxidant activity compared to the other extraction methods, even when compared with SFE (15.25 μmol trolox/ml of oil).

Key words: *Matricaria chamomilla* L.; Essential oil; Antioxidant activity.

Introducción

Colombia es considerado un país privilegiado por su gran diversidad de ecosistemas y microclimas, lo que permite que su vegetación sea muy variada, rica en especies endémicas y de gran variedad genética. Algunas de dichas especies producen aceites esenciales cuyos principios activos resultan interesantes para la investigación y el desarrollo de productos naturales (Torrenegra, *et al.*, 2017).

Hoy existe la tendencia entre los consumidores a preferir alimentos libres de productos sintéticos (pesticidas, insecticidas, fungicidas, y fertilizantes, entre otros) y aditivos químicos (neutralizantes, conservantes, antioxidantes, colorantes y saborizantes), por lo que resulta primordial estudiar la actividad antioxidante de los aceites de plantas nativas para recomendar su potencial uso como aditivos naturales (Granados, *et al.*, 2012).

La manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) se usa como té y como remedio casero por su amplia gama de actividades farmacológicas, terapéuticas, antiespasmódicas, antivirales y antimicrobianas. Es una de las plantas aromáticas (poleo, tomillo, albahaca, mafafa) de mayor producción en Colombia y se la comercializa frecuentemente como una fuente de aceite para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Bonilla, *et al.*, 2005).

En años recientes se han estudiado los extractos y aceites esenciales desde un punto de vista funcional. Sin embargo, esta funcionalidad está determinada por el método de extracción que se emplee, ya que ello influye en la proporción de los compuestos funcionales que tienen. Las técnicas de extracción se clasifican en convencionales o no convencionales: las convencionales requieren el uso de solventes asociados con el empleo de calor y agitación, así como tiempos prolongados de residencia, en tanto que las técnicas modernas o no convencionales, llamadas verdes o limpias, minimizan o eliminan el uso de solventes orgánicos, mejoran la calidad del extracto, acortan el tiempo de extracción y aumentan el rendimiento (Rodríguez, *et al.*, 2009).

El objetivo de este trabajo fue comparar la composición y la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos, destilación por arrastre con vapor, hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor y extracción simultánea con solvente orgánico, y maceración; la composición se determinó por GC-MS y la actividad antioxidante con el método ABTS.

Materiales y métodos

Materia prima

La manzanilla (*M. chamomilla* L.) se obtuvo como muestra seca (hojas y flores) de la empresa Agrocomercial del Sur S.A.S. de la ciudad de Ipiales- Colombia.

Caracterización del material vegetal

Para caracterizar el material vegetal se hizo un análisis granulométrico y se midió el porcentaje de humedad. Se determinó el tamaño promedio de las partículas en una Tamizadora pinzuar (modelo PS-35, serie 1182) empleando un juego de tamices de mallas (10-100) ordenadas de mayor a menor; el porcentaje de humedad se determinó en una balanza gravimétrica Radwag® PMR-50/NH a una temperatura de 103°C.

Obtención de los extractos

Extracción con fluidos supercríticos (SFE). En la extracción se empleó el equipo SFE 500 de Waters® con celda de extracción de 500 mL, una bomba de alta presión, un separador y sistemas de control de presión, de temperatura y de flujo de CO₂; se usó dióxido de carbono como disolvente.

Los experimentos se realizaron empleando un rango de presiones de 90 a 210 bar y temperaturas de 35 a 65 °C. Las condiciones de extracción se establecieron teniendo en cuenta algunos estudios sobre la extracción de aceite esencial de manzanilla. Se utilizaron (10 bar y 20°C) como condiciones de separación. Se aplicó un diseño factorial de 3² con 4 puntos centrales (150 bar y 50 °C) de manera aleatoria para determinar la influencia de las condiciones de presión y temperatura supercríticas en el rendimiento (% p/p) y la composición y la actividad antioxidante utilizando una significación de p<0,05.

El rendimiento se calculó mediante la ecuación (1) y se expresó como porcentaje de aceite extraído.

$$\text{Rendimiento (\% p/p)} = \left(\frac{\text{Peso del aceite extraído}}{\text{peso de la muestra seca y molida}} \right) \times 100 \quad (1).$$

El proceso extractivo se llevó a cabo utilizando una carga de 140 g de manzanilla molida dispuestos en el recipiente de extracción. Se hizo pasar el CO₂ a través de un serpentín sumergido en líquido refrigerante (etilenglicol) a una temperatura de 2 °C para evitar su gasificación y mantenerlo líquido. Empleando una bomba de alta presión se bombeó el CO₂ en intervalos de 90 a 210 bares; la temperatura dentro del recipiente extractor se elevó de 35 a 65 °C. Una vez alcanzadas las condiciones de operación (presión y temperatura) en el extractor, se inició el proceso de extracción ajustando el flujo de CO₂ a 30 g/min durante 150 minutos (el CO₂ extrae el aceite de las flores secas de manzanilla). Por último, se despresurizó el equipo, el CO₂ en estado gaseoso circuló hasta el escape, el aceite extraído se recogió en el separador, se almacenó en un vial ámbar y se calculó el rendimiento del proceso de extracción en el aceite esencial.

Extracción por destilación por arrastre con vapor (AV). La extracción del aceite esencial por el método de arrastre con vapor se hizo siguiendo la metodología descrita por **Arango, et al.** (2012): se utilizó vapor saturado a presión atmosférica de 1 psig y densidad del lecho de 95,4 g.L⁻¹, la extracción se hizo con 7,25 kg de manzanilla seca con un tiempo de extracción aproximado de cuatro horas. El rendimiento se calculó a partir de la cantidad de aceite esencial obtenido por unidad másica de materia prima en términos porcentuales. El equipo utilizado fue la unidad de extracción por arrastre con vapor DINOX con capacidad de 80 L.

Extracción por maceración (MC). La maceración se hizo en un balón de vidrio de 2.000 mL en el que se dispusieron 500 g de manzanilla seca y 1.000 mL de etanol puro; el tiempo de extracción fue de 16 días, los extractos se concentraron en un rotaevaporador EYELA N-1100, con una base de agua a 60 °C y posteriormente se almacenaron en refrigeración y protegidos de la luz.

Hidrodestilación (HD). El procedimiento se hizo en un equipo de hidrodestilación con manta calefactora Thermoscientific y condensador tipo clewenger (Walter Velasco, Colombia). Se tomaron 100 g de manzanilla seca y se depositaron en un balón de vidrio de 2.000 mL junto con 1.500 mL de agua, y este se calentó hasta el punto de ebullición usando una malla térmica durante tres horas; posteriormente, se hizo una extracción líquido-líquido del extracto obtenido con diclorometano y se obtuvo una mezcla de aceite esencial y diclorometano, la cual se almacenó en refrigeración y protegida de la luz para su concentración y posterior análisis.

Destilación por arrastre con vapor y extracción simultánea con solvente orgánico (DES). Se pesaron aproximadamente 20 g de manzanilla seca y se agregaron al balón A con agua suficiente para tapar la muestra de material vegetal (140 mL); se agregaron 50 mL de diclorometano al balón B y se inició el calentamiento en ambos balones hasta alcanzar la temperatura de ebullición de cada solvente a lo largo de dos horas; como producto del

proceso de condensación se obtuvo una mezcla de aceite esencial y diclorometano. La mezcla se separó, se concentró en un rotaevaporador EYELA N-1100, se envasó en un recipiente ámbar protegido de la incidencia de la luz y se mantuvo en refrigeración.

Medición de la actividad antioxidante del aceite esencial por el método ABTS

La metodología aplicada fue la descrita por **Re, et al.** (1999), citados por **Jiménez & Villarreal** (2008). El radical ABTS•+ se generó tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM). La mezcla reaccionante permaneció a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 24 horas. El ABTS•+ preparado se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,8 + 0,2 a una longitud de onda de 734 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys™ UV-VIS 10S (Thermo Scientific, USA).

Se hizo una curva de calibración con distintas concentraciones de trolox (0,5 – 2,5 mmol), para lo cual se tomaron 2 mL de la solución ABTS•+ y se añadieron 20 µL de las distintas concentraciones de trolox para después agitar durante un minuto y medir la absorbancia al cabo de 6 minutos más a 734 nm. Cada muestra se midió por triplicado y se obtuvo la siguiente ecuación: $Y = -0,144X + 0,6655$ ($R^2 = 0,9946$). Los resultados se expresaron como actividad antioxidante equivalente en trolox (TEAC) en unidades de µmol de trolox por mL de aceite de manzanilla. El potencial antioxidante de la muestra se probó con la adición de 2 mL de la solución del radical ABTS•+ a 20 µL del aceite diluido en una mezcla de isopropanol y etanol de 80:20 y se leyó la absorbancia a 734 nm; la lectura se interpoló en la ecuación de la recta obtenida a partir del trolox. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico de 1,5 mmol al cual se le aplicó el mismo procedimiento que a las muestras de aceite.

Análisis por cromatografía de gases

El análisis cromatográfico del aceite esencial de *M. chamomilla* se hizo en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño mediante cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un equipo Shimadzu QP2010S GC-MS y la metodología descrita por **Arango, et al.** (2012).

Para la determinación de los componentes químicos se utilizó una columna DB-5 de J&W Scientific con 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro, espesor de película de 0,25 µm, un flujo de helio de 1 mL/min UAP como gas portador, y una temperatura del detector o la interfaz (GC-MS) de 300°C. La temperatura inicial de la columna fue de 40 °C, que luego se incrementó de 5 °C/min a 250 °C con una isoterma de separación durante 15 minutos. La energía de ionización fue de 70 eV.

Se inyectó 1,0 µL del aceite esencial en el GC-MS a una concentración del 10 % disuelto en diclorometano. Los componentes se determinaron comparando sus espectros de masas con los referenciados en las bases de datos Nist y Adams. La cuantificación de los componentes se calculó a partir de las cantidades relativas de áreas.

Diseño experimental y análisis estadístico

Las matrices del diseño de experimentos y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion XV® (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). El análisis estadístico de los datos se hizo mediante el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 %, con lo cual se determinó la significación estadística de los factores sobre la variable de respuesta.

Para el análisis estadístico de la composición y de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de manzanilla se usó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos correspondientes a las técnicas de extracción y tres repeticiones por método: extracción con fluidos supercríticos (SFE), arrastre con vapor (AV), hidrodestilación (HD), destilación y extracción simultánea (DES) y maceración (MC) y cuatro variables de respuesta que correspondieron a tres componentes mayoritarios encontrados en los perfiles cromatográficos: enindicloeter, β-farneseno y óxido de bisabolol A, y al porcentaje de actividad antioxidante (µmol de trolox/mL de aceite).

Como referencia para la extracción con fluidos supercríticos se emplearon los valores del punto óptimo ($T=65$ °C y $P=210$ bar).

Resultados y discusión

Obtención de los extractos

Los extractos se obtuvieron a partir de manzanilla con una humedad de 4,83 % y un tamaño promedio de partícula de 0,54 mm.

Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Los resultados de rendimiento obtenido con CO₂-SC bajo condiciones de extracción se muestran en la **tabla 1** y la significación estadística de los factores (temperatura y presión) y sus interacciones en el rendimiento se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) (**Tabla 2**).

El mayor rendimiento obtenido en la extracción con fluidos supercríticos fue de 0,87 % a 210 bar y 65 °C en un tiempo de extracción de 150 minutos; estas condiciones se consideraron como el punto óptimo en este estudio. **Rahimi, et al.** (2011) obtuvieron un rendimiento de 0,6 % de aceite esencial de manzanilla empleando la tecnología de fluidos supercríticos a una temperatura de 40 °C y una presión de 250 bar, es decir, inferior al obtenido en el presente estudio con condiciones de extracción similares.

Tabla 1. Rendimiento del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) mediante SFE

T (°C)	Presión (bar)	Rendimiento (%)
50	150	0,031
50	150	0,500
35	90	0,154
35	210	0,021
50	90	0,060
50	150	0,133
50	210	0,036
50	150	0,319
65	210	0,871
65	90	0,228
65	150	0,512
35	150	0,047
50	150	0,299

Tabla 2. Análisis de varianza para el rendimiento del aceite de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por SFE

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p
A:Temperatura	0,321554	1	0,321554	11,3	0,0121
B:Presión	0,039366	1	0,039366	1,38	0,2781
AA	0,0561111	1	0,056111	1,97	0,2031
AB	0,150544	1	0,150544	5,29	0,055
BB	0,0218601	1	0,021860	0,77	0,4099
Error total	0,199269	7	0,028467		
Total (corr.)	0,770726	12			

Gl: Grados de libertad; P: Valor-P

En el análisis de varianza (**Tabla 2**) se pudo observar que únicamente la temperatura (A) influyó significativamente en el rendimiento del aceite de manzanilla extraído ($p < 0,05$), en tanto que la presión (B) y las demás interacciones no tuvieron un efecto significativo en el intervalo de las condiciones estudiadas (**Figura 1**). La investigación realizada por **Kotnik, et al.** (2007) demostró que, efectivamente, el rendimiento de la extracción es directamente proporcional a la temperatura.

Extracción por arrastre con vapor

La extracción por arrastre con vapor se ajustó a la metodología descrita por **Arango, et al.** (2012). El rendimiento del aceite esencial de manzanilla extraído por arrastre con vapor fue de 0,046 % p/p, un valor bajo comparado con el obtenido por **Gawde, et al.** (2014) y **González** (2004), quienes utilizaron la misma técnica y obtuvieron rendimientos de 0,31 y 0,34 %, respetivamente.

Análisis del aceite esencial de manzanilla mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis por GC-MS permitió la identificación de 26 compuestos (**Tabla 3**) con base en un porcentaje relativo de área superior al uno por ciento; entre ellos se destacan los diciteloeteres, los sesquiterpenos y los sesquiterpenos oxigenados. Los componentes mayoritarios en el aceite esencial de manzanilla determinados en esta investigación fueron, en su orden, enindicicloeter, β -farneseno y óxido de bisabolol A. El análisis de varianza (ANOVA) de estos componentes mayoritarios se puede observar en la **tabla 4**; no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los métodos de extracción evaluados para estos compuestos.

En el aceite extraído por maceración y con fluidos supercríticos se encontró mayoritariamente enindicicloeter (47,6 y 29,6 %, respectivamente) comparados con los otros métodos (**Figura 2 A**). Esto coincide con estudios como los de **Formisano, et al.** (2015), quienes extrajeron aceite esencial de manzanilla empleando el método de maceración y obtuvieron como componente mayoritario enindicicloeter, en tanto que **Rahimi, et al.** (2011) obtuvieron como compuesto mayoritario enindicicloeter al extraer aceite esencial de manzanilla por SFE.

El β -farneseno tuvo un mayor porcentaje relativo de área con los métodos de hidrodestilación y arrastre con vapor y fue el componente mayoritario (**Figura 2-B**), lo que se explica porque ambos métodos emplean principios muy similares. **Scalia, et al.** (1999) y **Tolouee, et al.** (2010) extrajeron aceite esencial de manzanilla por arrastre con vapor e hidrodestilación, respectivamente, y encontraron el β -farneseno como uno de sus compuestos mayoritarios; por otra parte, **Rahimi, et al.** (2011) reportaron un contenido mínimo de β -farneseno con la extracción con fluidos supercríticos. Todos estos valores son similares a los obtenidos en la presente investigación.

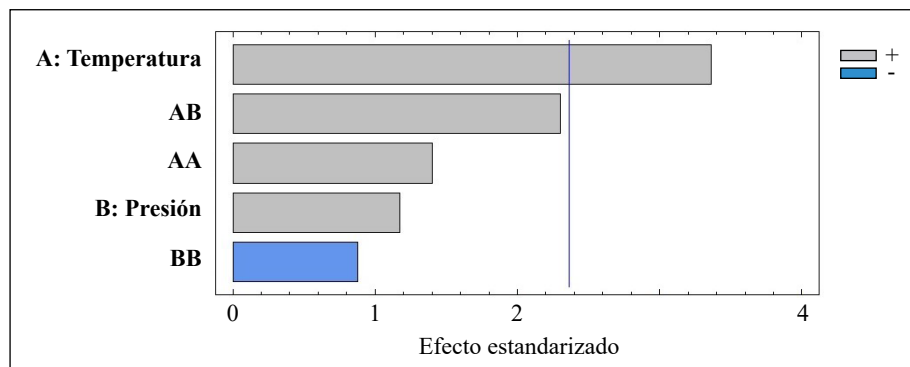


Figura 1. Diagrama de Pareto para el rendimiento de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por FSC

Tabla 3. Compuestos identificados en el aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) por GC-MS

ID	%A					IRL							
						Teorico	Fuente	EXPERIMENTAL					
	HD	DES	AV	MC	SFE			HD	DES	AV	MC	SFE	
Limoneno	-	-	3,8	-	-	1036	Hognadottir A. 2003	-	-	1035	-	-	
Tetradecano	2,2	-	-	-	-	1399	Adams RP. 1995	1400	-	-	-	-	
Anetol	-	-	7,8	-	-	-	-	-	-	1308	-	-	
p-Cimeno	-	1,25	-	-	10,07	1033	Hognadottir A. 2003	-	1330	-	-	1332	
Eucaliptol	3,71	-	-	-	-	1039	Hognadottir A. 2003	1036	-	-	-	-	
β-Farneseno	37,62	1,52	30,2	6,1	7,6	1458	Adams RP. 1995	1465	1464	1468	1381	1465	
1,2 epoxido de limoneno	2,2	-	-	-	-	-	-	1484	-	-	-	-	
Germacreno-D	1,6	-	2,1	-	-	1480	Hognadottir A. 2003	1510	-	1511	-	-	
α-farneseno	2,72	-	-	-	-	1508	Adams RP. 1995	1517	-	1414	-	-	
espatulenol	3,37	1,5	2,9	-	-	1575	Tellez MR. 1999	1621	1621	1621	-	-	
Óxido de bisabolol	5,26	5,2	4,4	1,7	1,24	-	-	1691	1691	1691	1690	1691	
7-metoxi-coumarina	-	-	-	4,4	1,4	-	-	-	-	-	1788	1789	
α-bisabolol	3,62	-	3,4	-	-	1701	Baranauskiene R. 2003	1717	-	1717	-	-	
N.I.	-	1,2	-	-	-	-	-	-	1701	-	-	-	
Óxido de bisabolona	8,85	2,8	7,4	-	1,32	-	-	1722	1722	1723	-	1723	
Óxido de bisabolol A	23,04	47,1	22	24,15	18,79	-	-	1795	1798	1796	1794	1796	
en-in-dicicloeter	10,34	9,7	15,93	47,6	36,13	-	-	1930	1932	1937	1931	1935	
en-in-dicicloeter isómero	3,8	27,7	-	11,24	7,66	-	-	1940	1947	-	1940	1943	
ácido linoleico metil ester	-	2,1	-	-	-	-	-	-	2110	-	-	-	
ácido palmítico metil ester	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2001	-	
Fitol	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	2133	-	
pentatriacontano	-	-	-	-	6,8	-	-	-	-	-	-	2138	
Linoleato de etilo	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	2174	-	
Docosano	-	-	-	-	4,16	-	-	-	-	-	-	2307	
Octacosano	-	-	-	-	16,445	-	-	-	-	-	-	2509	
Nonacosano	-	-	-	-	6,03	-	-	-	-	-	-	2712	

*HD: hidrodestilación; DES: destilación por arrastre con vapor y extracción simultánea con solvente orgánico; AV: extracción por destilación por arrastre con vapor; MC: extracción por maceración; SFE: extracción con fluidos supercríticos. * % A: porcentaje relativo de área; * IRL: índice de retención lineal

En los estudios de **Cano (2002)**, **Gawde, et al. (2014)** y **Scalia, et al. (1999)**, se reportaron altos contenidos de óxido de bisabolol A en el aceite esencial de manzanilla obtenido por arrastre con vapor, lo que difiere de los valores obtenidos en la presente investigación (**Figura 2-C**) y se explica por el efecto de diferentes factores ambientales sobre el contenido de compuestos de las plantas medicinales: la intensidad de la luz y el fotoperiodo, que varían de región en región, la época de recolección y la edad de las plantas que afectan la composición del aceite esencial.

Evaluación de la actividad antioxidante

La mayor actividad antioxidante obtenida por el método ABTS se observó en el aceite de manzanilla extraído por arrastre con vapor (27,56 μmol de trolox/mL de aceite) (**Tabla 5**), el cual, además, era de color azul. **Formisano, et al. (2015)** aseguran que el color azul

Tabla 4. Valor de p en los análisis de varianza para el enindicioeter, el β-farneseno y el óxido de bisabolol A en el aceite esencial de manzanilla

Componente	Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p
Enindicioeter	Entre grupos	3200,93	4	800,231	156,85	0,000
	Dentro de los grupos	51,0191	10	5,10191		
	Total (corr.)	3251,94	14			
β-farneseno	Entre grupos	3059,25	4	772,312	380,11	0,000
	Dentro de los grupos	20,3182	10	2,03182		
	Total (corr.)	3109,57	14			
Óxido de bisabolol A	Entre grupos	1711,84	4	427,959	83,6	0,000
	Dentro de los grupos	51,1906	10	5,11906		
	Total (corr.)	1763,03	14			

Gl: Grados de libertad; P: Valor-P

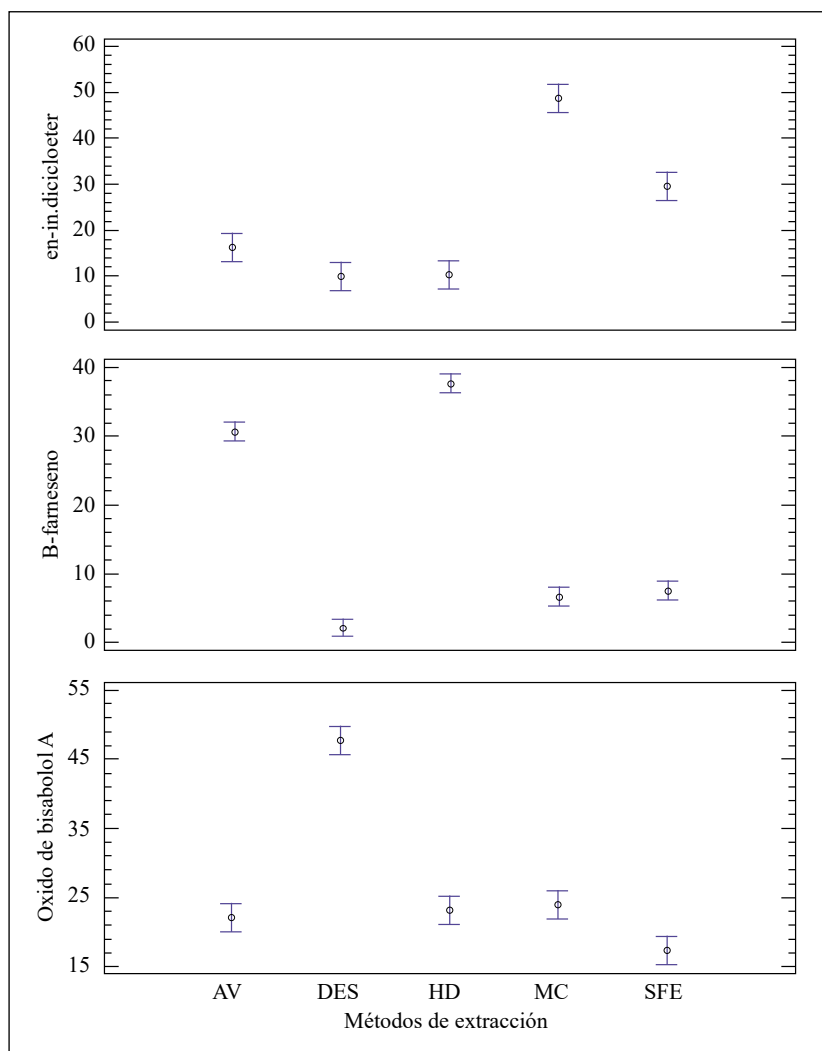


Figura 2. Gráficas de medias y 95 % de Tukey HSD para: **A.** Eni-dicioeter, **B.** B-farneseno y **C.** óxido de bisabolol A presentes en el aceite esencial de manzanilla extraído por AV, DES, HD, MC, SFE

en el aceite se debe a la presencia de chamazuleno, un compuesto de elevada actividad antioxidante, ya que inhibe la peroxidación de lípidos. Dicho compuesto no se destacó en este caso, pero podría estar presente con una mayor concentración en el aceite esencial obtenido por arrastre con vapor que en el extraído por los otros métodos.

Hubo diferencias estadísticamente significativas de la actividad antioxidante entre los diferentes métodos de extracción utilizados, lo que se observó en el análisis de varianza (ANOVA), en el cual el valor de p fue $\leq 0,05$ (Tabla 6). Se hizo, además, una gráfica de medias y se empleó la diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey con un intervalo de confianza del 95 % (Figura 3) para verificar que los métodos eran diferentes entre sí y que con el arrastre con vapor se obtenía la mayor actividad antioxidante.

Tabla 5. Actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE, AV, HD, MC, y DES analizados por ABTS•+

Métodos	Promedio	TEAC
		μmol de trolox/mL de aceite
SFE	0,466	15,25
MC	0,356	23,62
HD	0,485	13,81
DES	0,413	19,24
AV	0,304	27,56

Tabla 6. Valor de p en el análisis de varianza para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	p
Entre grupos	457,172	4	114,293	50,76	0,0000
Dentro de los grupos	22,516	10	2,2516		
Total (Corr.)	479,688	14			

Gl: Grados de libertad; P: Valor-P

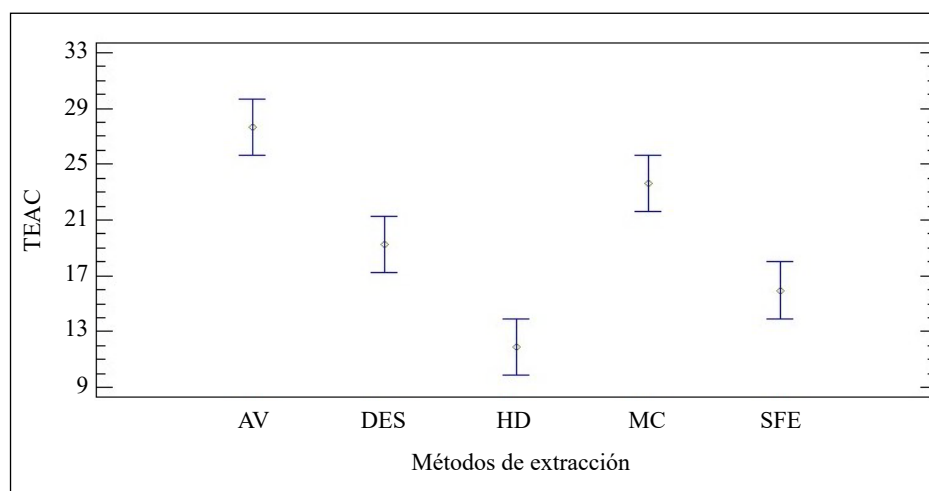


Figura 3. Gráfica de medias y 95 % del Tukey HSD para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído por AV, DES, HD, MC, SFE

La actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla fue de: 27,56 μmol de trolox/mL con el arrastre con vapor, de 23,62 con la maceración, de 19,24 con la destilación y extracción simultánea, de 15,25 con extracción con fluidos supercríticos y de 13,81 con hidrodestilación. Estos valores son mayores que los reportados por **Formisano, et al.**, (2015) y **Kolodziejczyk, et al.** (2015), quienes obtuvieron 8,45 y 12,00 μmol de trolox/mL de aceite esencial de manzanilla, respectivamente.

Torrenegra, et al. (2017) evaluaron la capacidad antioxidante (ABTS) del aceite esencial de manzanilla extraído por hidrodestilación y obtuvieron 59,07 μg /mL \pm 0,33. En este trabajo se obtuvieron 13,80 μmol de trolox/mL por hidrodestilación, diferencia que podría deberse a que Torrenegra, et al. obtuvieron bisabolol (85 % de abundancia relativa) como componente mayoritario, y este es habitual en muchos productos destinados al cuidado de la piel, puesto que presenta propiedades antiinflamatorias y antiradicales (Mckay & Blumberg, 2006).

Al comparar la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla con la de otros aceites esenciales, la del primero resultó mayor que la de especies como el estragón morado (3,68 μmol de trolox/g de extracto), el anís (5,6 μmol de trolox/g de extracto), la albahaca (5,1 μmol de trolox/g de extracto), el estragón (0,00023 μmol de trolox/g de extracto), el hinojo (0,00015 μmol de trolox/g de extracto) (**Muñoz, et al.**, 2009) y el cilantro (0,6585 μmol de trolox/g de extracto) (**Ceballos & Giraldo**, 2011). Sin embargo, **Muñoz, et al.** (2007) encontraron que la actividad antioxidante del orégano (2040 μmol de trolox/ g de extracto) y del tomillo (890 μmol de trolox/ g de extracto) eran superiores a las obtenidas en la presente investigación, y **Granados, et al.** (2015) y **Granados, et al.** (2012) reportaron valores superiores para el eucalipto (38,96 μmol de trolox/ g de extracto) y la muña (631,72 μmol de trolox/g de extracto).

Conclusiones

Se registraron diferencias estadísticamente significativas en la composición de las muestras de aceite esencial de manzanilla (*M. chamomilla* L.) dependiendo del método de extracción.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) ofrece considerables ventajas sobre el método tradicional de arrastre con vapor (AV). El aceite esencial de manzanilla se extrajo en menor tiempo utilizando CO₂ supercrítico y el rendimiento de extracción fue mayor (0,871 %).

El aceite esencial de *M. chamomilla* L. obtenido por el método de arrastre con vapor tuvo la mayor actividad antioxidante (27,556 μmol de trolox/mL de aceite), superior a los aceites obtenidos mediante otros métodos de extracción, incluso superior al aceite extraído por SFE, con el cual se obtuvieron, además de aceite, resinas y oleorresinas, extractos que favorecen el rendimiento, pero disminuyen la actividad antioxidante debido a la acción sinérgica de sus compuestos.

El aceite esencial de manzanilla (*M. chamomilla* L.) exhibe una actividad antioxidante superior a otras especies aromáticas como el estragón, el estragón morado, el anís, la albahaca, el hinojo y el cilantro.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Nariño, al grupo de Investigación en Tecnologías Emergentes en Agroindustria y al personal de los laboratorios especializados, por su apoyo y asesoría.

Contribución de los autores

AHB, asesoría en el diseño de experimentos, metodología, disponibilidad de los equipos, reactivos y realización del escrito; MCM y DEOrtiz, ejecución del proyecto y cumplimiento de los objetivos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Adams, RP.** (1995). Identificación de componentes de aceites esenciales por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Arango, O., Pantoja, D., Santacruz, L., Hurtado, A.** (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia organoides* H. B. K) del Alto Patía. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial. **10** (2): 79-86.
- Baranauskienė R., Venskutonis, RP, Demyttenaere, JCR.** (2003). Evaluación sensorial e instrumental del aroma de hierba gatera (*Nepeta cataria* L.). J. Agric. Food Chem. **51**: 3840-3848.
- Bonilla, R., Samanca, H., Perdomo, J.** (2008). Caracterización y evaluación de la cadena de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias, aceites esenciales y afines en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. p.2-81.
- Cano, T. M.** (2002). Obtención y caracterización de aceite esencial de 4 plantas medicinales cultivadas a diferentes niveles altitudinales de Guatemala.
- Ceballos, A. & Giraldo, G.** (2011). El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) como fuente potencial de antioxidantes naturales. Vector. **6**: 85-93.
- Formisano, C., Delfino, S., Oliviero, F., Tenore, G. C., Rigano, D., Senatore, F.** (2015). Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). Industrial Crops and Products. **63**: 256-263.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., Reglero, G.** (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. Journal of Chromatography A. **1250**: 34-48.
- Garzón, L. P.** (2016). Conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales de yarumo (*Cecropia sciadophylla*), carambolo (*Averrhoa carambola*) y uña de gato (*Uncaria tomentosa*) en el resguardo indígena de Macedonia, Amazonas. Luna Azul. **43** (43): 386-414.
- Gawde, A., Cantrell, C. L., Zheljzkov, V. D., Astatkie, T., Schlegel, V.** (2014). Steam distillation extraction kinetics regression models to predict essential oil yield, composition, and bioactivity of chamomile oil. Industrial Crops & Products. **58**: 61-67.
- González, A.** (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia. p.2-87.
- Granados, C., Santafé, G., Acevedo, D.** (2015). Chemical composition and evaluation of antioxidant activity of leaf essential oil *Eucalyptus camaldulensis* from Norte de Santander (Colombia). Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. **18** (1): 235-240.
- Granados, C., Yáñez, X., Santafé, G.** (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas. **10** (1): 12-23.
- Högnadóttir, A. & Rouseff, RL.** (2003). Identificación de compuestos aromáticos activos en aceite de esencia de naranja mediante cromatografía de gases - olfatometría y cromatografía de gases - espectrometría de masas. J. Chromatogr. A. **998**: 201-211.
- Jiménez, J. & Villarreal, J.** (2008). Estudio Químico de Pigmentos Tipo Antocianina Presentes en el Fruto del Motilon (*Hyeronima macrocarpa*) (tesis de pregrado). Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. p.20-96.
- Kolodziejczyk, J., Bijak, M., Saluk, J., Ponczek, M. B., Zbikowska, H. M., Nowak, P., ... Pawlaczyk, I.** (2015). Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic-polysaccharide conjugates. International Journal of Biological Macromolecules. **72**: 1152-1158.
- Kotnik, P., Skerget, M., Knez, Z.** (2007). Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. Journal of Supercritical Fluids. **43** (2): 192-198.
- Mckay, D. L. & Blumberg, J. B.** (2006). A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). Phytotherapy Research. **20**: 519-530.
- Muñoz, A., Castañeda, M., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J., Kouznetsov, V., Stashenko, E.** (2007). Composición y actividad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Scientia et Technica. **8** (33): 125-128.
- Muñoz, A., Kouznetsov, V., Stashenko, E.** (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. Salud UIS: Revista de La Universidad Industrial de Santa Fe. **41**: 287-294.
- Rahimi, E., Prado, J. M., Zahedi, G., Meireles, M. A. A.** (2011). Chamomile extraction with supercritical carbon dioxide: Mathematical modeling and optimization. The Journal of Super-

critical Fluids. **56** (1): 80-88.

- Rodríguez, C., Quirantes, R., Fernández, A., Segura, A.** (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*. **66**: 246-254.
- Scalia, S., Giuffreda, L., Pallado, P.** (1999). Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **21** (3): 549-558.
- Soquetta, M. B., Terra, L. de M., Bastos, C. P.** (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CYTA - Journal of Food*. **16** (1): 400-412.
- Stashenko, E. E.** (2009). Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga, Colombia: Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales - CENIVAM. p.16-30.
- Téllez, M.R., Canel, C., Rimando, A.M., Duke, S.O.** (1999). Acumulación diferencial de isoprenoides en *Artemisia annua* L. sin glándulas. *Phytochem*. **52**: 1035-1040.
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., ... Razzaghi-Abyaneh, M.** (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*. **139** (3): 127-133.
- Torrenegra, M., Granados, C., Pájaro, N., Méndez, G., Tejada, C.** (2017). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* L. *Revista Cubana de Farmacia*. **51** (1): 1-14.
- Urbizu, L., Castillo, O., Martínez, G., Torres, J.** (2017). Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **10** (2): 121-125.
- Uden, A. Van, Abril, M., Duarte, E.** (2005). Curso teórico-práctico del cultivo de la sábila (*Aloe vera barbadensis*, Miller) y plantaciones alternativas (Lombricultura y plantas aromáticas y medicinales). Tolima, Colombia. *Biológicos Brabante*. p.1-125.

Review article

On the general circulation of the atmosphere around Colombia Circulación general de la atmósfera alrededor de Colombia

Óscar José Mesa-Sánchez, Julián David Rojo-Hernández*

Departamento de Geociencias y Medio Ambiente, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia

Abstract

The average annual precipitation in the Pacific coast of Colombia ranges from 8,000 to 13,000 mm. The annual average (1960-2018) in Puerto López (Cauca) rain gauge ($77^{\circ}14'56.3''\text{W}$, $2^{\circ}50'43.0''\text{N}$) is 13.159 mm making it, probably, the rainiest place on the Earth. Such a large amount of precipitation also means a sizeable diabatic heating source over western Colombia, which is responsible for driving the circulation in northern South America and Mesoamerica from mid-March to the end of November. We applied a simple conceptual model to study the heat-induced circulation. Our results indicated that the heating source over western Colombia produces a steady, low-level westerly inflow as a result of a half planetary wave propagating over Mesoamerica and the far eastern Pacific that generates two cyclonical flows. On the east side of the heating source, a Kelvin wave generates a low-level easterly flow from the tropical Atlantic Ocean and the Northern Amazon and Orinoco basins in a Walker-type circulation. This Rossby and Kelvin patterns create information pathways, which, in their turn, dominate the low- and upper-level wind fields. Documented observations about the atmosphere's general circulation over northern South America and Mesoamérica are consistent enough to support the assertion that a set of waves trapped in the tropics induced by a heating source explains the circulation over Colombia and its surroundings.

Keywords: Equatorial waves; South America; Mesoamerica; Colombia; Hydroclimatology.

Resumen

La precipitación media multianual en las llanuras de la costa Pacífica colombiana varía entre los 8.000 y los 13.000 mm. El promedio anual en Puerto López (Cauca) ($77^{\circ}14'56,3''\text{O}$, $2^{\circ}50'43,0''\text{N}$) es de 13.159 mm (1960-2018), probablemente el más alto del planeta. Tal cantidad de precipitación también implica el establecimiento de una fuente de calor diabática por condensación, la cual, a su vez, es responsable de la generación de la circulación atmosférica sobre el norte de Suramérica y Mesoamérica entre mediados de marzo y el fin de noviembre. En el presente trabajo se aplicó un modelo simple de circulación inducida por una fuente de calor diabática para estudiar la circulación general de la atmósfera alrededor de Colombia. Los resultados indicaron que la mencionada fuente de calor produce por sí misma fuertes vientos del oeste como respuesta a la propagación de media onda de Rossby sobre Mesoamérica y el Pacífico Este. Hacia el este de la fuente de calor, una onda Kelvin es responsable de los vientos del este que viajan desde el océano Atlántico tropical hacia Colombia. Ambas ondas, la planetaria y la Kelvin, dominan las trayectorias de flujo de los campos de vientos a bajo y alto nivel en la tropósfera sobre Colombia y su vecindario. Las observaciones documentadas sobre la circulación general de la atmósfera en el norte de Suramérica y Mesoamérica son suficientemente sólidas para respaldar la afirmación de que un conjunto de ondas inducidas por una fuente de calor y atrapadas en el ecuador explican la circulación general de la atmósfera sobre Colombia y su vecindario.

Palabras claves: Ondas ecuatoriales; Mesoamérica; Suramérica; Hidro-climatología; Colombia.

Citation: Mesa-Sánchez ÓJ, Rojo-Hernández JD. On the general circulation of the atmosphere around Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):857-875, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.899>

Editor: José Daniel Pabón Caicedo

***Corresponding autor:**

Julián David Rojo Hernández;
jdrojoh@unal.edu.co

Received: May 23, 2019

Accepted: April 28, 2020

Published: September 30, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Introduction

Despite the advances (Eslava, 1974; Snow, 1976; Mesa, *et al.*, 1997; Poveda & Mesa, 2000; Pabón-Caycedo, *et al.*, 2001; Urrea, *et al.*, 2019), there is no satisfactory theory to explain the climate of Colombia and the causes of its regional, seasonal, and inter-annual variability. The present work contributes to the development of such a theory considering the circulation induced by the latent heat released from the copious rainfall over the country, particularly, the Pacific coast. The theory of the linear equatorial waves provided the main elements for explaining the general circulation and the seasonal and inter-annual variability.

The low-level lands on the Pacific coast of Colombia (northwest of South America) are one of the most significant places on Earth where air raises. It is also the rainiest region on the planet (López, 1966; Arnett & Steadman, 1970; Snow, 1975; Nieuwolt, 1977; Eslava, 1993; Poveda & Mesa, 1997; Poveda & Mesa, 2000; Mapes, *et al.*, 2003; Sakamoto, *et al.*, 2011; Álvarez-Villa, *et al.*, 2011; Durán-Quesada, *et al.*, 2012) and one of the largest diabatic heat sources (Zhang, *et al.*, 2017). The existence of a low-level westerly jet, known as *Chorro del Occidente Colombiano* or CHOCO jet, has been the traditional explanation for such a high average annual precipitation (over 13,000 mm). This jet interacts with topography and evapotranspiration from the tropical rainforests of western Colombia (Poveda & Mesa, 1997; Poveda, *et al.*, 2006; Poveda, *et al.*, 2014).

Poveda & Mesa (2000) associated the dynamics and strength of the CHOCO jet with the sea surface temperature gradient between the cold tongue of Equator-Perú and the warmer Pacific in front of Colombia. The change of direction of the cross-equatorial trade winds favors the development of the jet (Poveda & Mesa, 2000; Poveda, *et al.*, 2002; Poveda, *et al.*, 2006; Kessler & Gourdeau, 2006; Amador, *et al.*, 2006). The corresponding change in the sign of the Coriolis acceleration, the predominant north-south coast orientation, as well as the land-sea temperature gradient and the friction gradients, contribute to establishing a westerly jet centered at 5°N. For these reasons, the traditional CHOCO jet explanation is the so-called Stensrud's mechanisms (Stensrud, 1996). Furthermore, the latent heat release reinforces the CHOCO jet due to the high amounts of condensation and rainfall. Most of this condensation occurs in mesoscale convective systems (MCS), which, in their turn, favor the wind surface convergence (Velasco & Fritsch, 1987; Poveda & Mesa, 2000; Mapes, *et al.*, 2003; Zuluaga & Poveda, 2004; Mejía & Poveda, 2005; Poveda, *et al.*, 2006).

Another essential feature of the regional circulation is the so-called Caribbean jet, located between the north of South America and the Greater Antilles (Amador & Magana, 1999; Poveda & Mesa, 1999; Magaña, *et al.*, 1999). This other jet also transports large amounts of moisture from the Caribbean Sea to the Eastern Pacific, northern South America, and Central America (Xie, *et al.*, 2005; Mestas-Núñez, *et al.*, 2007; Wang, 2007; Wang & Lee, 2007; Whyte, *et al.*, 2008; Amador, *et al.*, 2006; Amador, 2008; Cook & Vizy, 2010). During most of the year, it is possible to observe how the winds coming from the Caribbean are recurved towards the south crossing the Papagayo Gulf and the Panama isthmus (Chelton, *et al.*, 2000; Xie, *et al.*, 2005; Romero-Centeno, *et al.*, 2007; Serra, *et al.*, 2010). Besides, sometimes the winds cross over Tehuantepec (Romero-Centeno, *et al.*, 2007) to merge with those winds from the CHOCO jet and turn to the west to reach the Colombian coast (Poveda, *et al.*, 2014). None of these mechanisms explaining the curvature of the CHOCO jet can explain the turn of the winds coming from the Caribbean jet to Colombia. Additionally, there is a low-level pressure in Panamá (Called the "Panamá Low"), which could explain the main features of wind recurving in that area (Poveda, 1998). Poveda, *et al.* (2014) also postulated the existence of the biotic pump mechanism in western Colombia following the Makarieva and Gorshkov hypothesis (Makarieva & Gorshkov, 2006; Makarieva & Gorshkov, 2010).

Wang (2002, 2004) analyzed the existence of a Walker cell in northern South America. His work describes the existence of an east-west circulation with rising air in the west

(Northern South America) diverging to the east in the high troposphere to sink over the colder eastern Atlantic and return to the west, which is directly associated with diabatic heating and Hadley's circulation cell. **Poveda & Mesa (1999)** and **Poveda, et al. (2006)** also described the presence of strong easterly winds in the middle equatorial troposphere traveling like a jet from the Atlantic Ocean to the Andes.

The moisture advection associated with all these winds produces copious orographic precipitation in both flanks of the Andes, although more abundant in western Colombia. Where precipitation largely exceeds evaporation in specific regions, a significant amount of latent heat becomes available to influence the atmospheric circulation. Recently, **Cruz (2017)** considered the dynamic and thermodynamic structure of the atmosphere heating and its effects over Colombian climatology using the vertically-integrated diabatic heating from NCEP-NCAR and ERA-interim reanalysis. She assumed that the latent heating associated with condensation controls the longitudinal variation of the radiative fluxes (**Webster, 1972**). One of the most relevant results of Cruz's work is the annual cycle of vertically integrated diabatic heating. These observations confirmed that over northern South America, specifically in western Colombia, there is one of the most prominent regions of diabatic heating on Earth. These observations are also consistent with the dynamics of the outgoing longwave radiation in the region studied by **Zhang, et al. (2017)** and the analysis of the thermodynamic structure of the atmosphere from ERA-40 atlas reported by **Chan & Nigam (2009)**. From mid-March to the end of November, this heat source is concentrated in a specific area and has a small size in comparison with the circulation around.

It is clear, then, that there is a sizeable diabatic heating source concentrated over western Colombia whose presence is due to the convergence of low-level moisture toward the Andes producing large amounts of orographic precipitation and the consequent large amount of latent heat release from the beginning of March until the end of November. On the west side of the heating source, there are two curvatures in the wind circulation responsible for strong westerly winds, one in the northwest branch associated with the Caribbean jet and the other in the southwest known as the CHOCÓ jet. Besides, there is a Walker cell on the east side of the heat source, which generates easterly winds. **Figure 1** shows a conceptual scheme of the pathways in the low-level circulation as described in the literature; these pathways are similar to those proposed by **Poveda, et al. (2014)** and **Arias, et al. (2015)**.

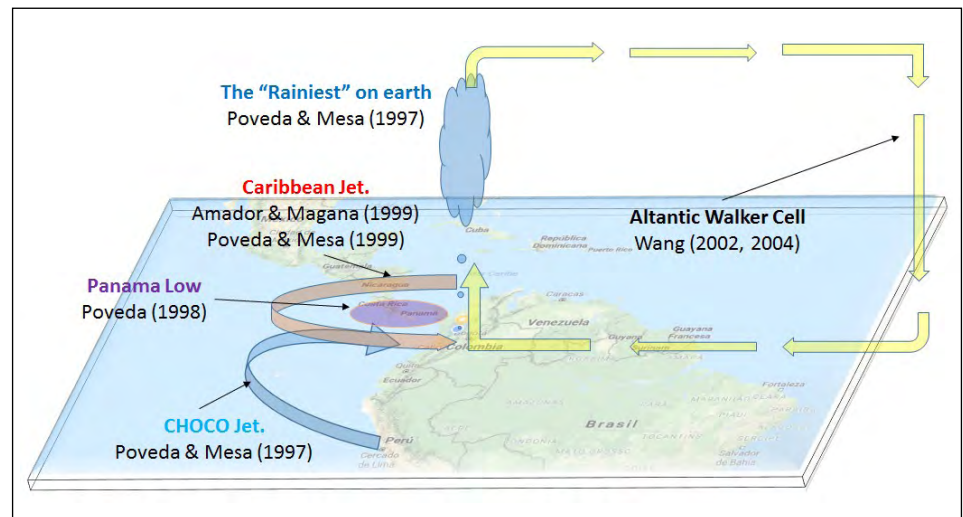


Figure 1. Schematic diagram of the general circulation of the atmosphere in northern South America and Mesomérica based on the review of relevant literature

Xie, et al. (2006) considered the strong westerly winds associated with the orographic precipitation and the high latent heat release. Also, **Holton** (2012) argued that the existence of diabatic heating sources can induce large-scale circulation. Some examples are the Walker cell and its variations (El Niño-Southern Oscillation), the monsoon circulation, the Madden-Julian Oscillation, and the equatorial waves (**Zhang, et al.**, 2017). There are several models of this induced circulation. They are founded on the early work by **Webster** (1972) and **Gill** (1980) whose basis, in turn, comes from a still earlier original work on the linear equatorial wave theory (**Matsuno**, 1966). The main assumptions of those models are that: (i) heating associated with the condensation of water vapor in deep convection drives the surface winds, and (ii) linear dynamics is adequate to understand the surface wind response to this heating.

The qualitative results of this kind of model and the documented observations on the atmosphere's general circulation over northern South America are consistent enough to affirm that a set of equatorially trapped waves induced by a heating source explains the circulation around Colombia. Developing this hypothesis is an essential step for a better understanding of the Colombian hydroclimatology, as well as Northern South America and Mesoamérica circulation. The present paper is organized as follows: Section 2 revisits the rainiest place on Earth using diverse gauging stations in western Colombia; in section 3 we present the Matsuno –Webster Gill Model to propose a linear mechanism to explain how the diabatic heating due to intense precipitation determines surrounding circulation in response to exited equatorially trapped waves; section 4 discusses the model and how it describes the main features of the general atmosphere circulation around Colombia and compares the reanalysis with the simple model results; section 5 extends the linear model to some numerical experiments on the seasonal variability of the diabatic heating; finally, we make a brief summary and present our conclusions in section 6.

The rainiest place on Earth revisited

The town of Lloró, in the department of Chocó, Colombia, received 12,717 mm of average annual rainfall from 1952 to 1958 as registered in the Lloró La Granja station (**Snow**, 1976) while the nearby town of Vigía de Curvaradó received 26,871 mm in 1974 (**Eslava**, 1974). These records surpass or are very close to those in Cherrapunji's, India, and Mr. Waialeale's, Hawaii, widely accepted as the rainiest locations on Earth (see Ahrens, 1998, p. 355), which led **Poveda & Mesa** (1998) to present Lloró as the rainiest locality on Earth.

Lloró La Granja station has records only for seven years and the gauge station is no longer working. Another station located to replace it only registered 8,240 mm of average annual rainfall during the period 1983-2018. Therefore, to select Colombia's rainiest recording gauge, we considered only active stations with sufficient years of registration. **Table 1** presents the annual average precipitation (P), as well as the total maximum annual rainfall (Pmax) for some stations located in the low lands of the Colombian Pacific coast using the official data of the Colombian Institute of Hydrology, Meteorology, and Environmental Studies (IDEAM). We also present the first year of records (year) and the geographic coordinates of each station. The rainiest gauge in Colombia, and probably on Earth, is Puerto López (77°14'56.3"W, 2°50'43.0"N) in the department of Cauca with 13,159 mm/year. In the same town but in La Concha location, we have the second rainiest gauge with 12,069 mm/year while the rain gauge of San Antonio de Yurumanguí (77°15'33.3"W, 3°15'38.4"N), in the nearby city of Buenaventura, received 26,987 mm in 2018.

The rainiest place on Earth is not only a record; it is also a noteworthy hot spot in the tropical circulation. A large amount of rainfall also means a large amount of latent heat release. This heating source is originated in the convergence of low-level moisture toward the Andes. Condensation heating appears to be the primary energy source in the tropics as the diabatic heating associated with tropical precipitation not only drives a local response in the atmospheric circulation but also an excitation of equatorial waves which induce

Table 1. Mean annual rainfall and maximum annual records at different gauging stations in western Colombia

Est_code	Estation name	City	State	Lat	Lon	Elevation (a.m.s.l)	Year	Average rainfall (P)	Maximun rainfall (Pmax)
53070030	PTO LOPEZ	López de Micay	Cauca	2.85	-77.25	80	1960-	13159	22572 (1984)
53080020	La Concha	López de Micay	Cauca	3.17	-77.14	130	1985-	12069	20288 (1981)
11040010	Tutunendó	Tutunendo	Chocó	5.74	-76.54	54	1966-	10946	19468 (1981)
53080010	Yurumanguí San Antonio	Buenaventura	Valle	3.26	-77.26	70	1980-	10536	26987 (2018)
51020010	Junín	Barbacoas	Nariño	1.34	-78.12	1157	1963-	9106	12125 (1974)
54020020	Nóvita	Novita	Chocó	4.96	-76.61	66	1966-	9020	13765 (1971)
11010010	La Vuelta	Cértegui	Chocó	5.46	-76.55	100	1943	8741	11159 (2000)
54020080	Bebedó	Medio San Juan	Chocó	4.93	-76.83	50	1973-	8724	13551 (2009)
11030010	Cértegui	Cértegui	Chocó	5.38	-76.61	54	1967-	8264	11730 (1999)
11035010	Lloró	Lloró	Chocó	5.50	-76.54	90	1983-	8240	10695 (1999)
11045010	Apto el Carano	Quibdó	Chocó	5.69	-76.64	53	1947-	8128	12428 (1975)
54020060	Opogodó	Condoto	Chocó	5.06	-76.65	70	1966-	8029	14157 (1999)

remote responses and large scale circulation (Holton & Hakim, 2012). For this reason, the three-dimensional structure of the diabatic heating closely relates to the atmospheric circulation because it not only drives the circulation, it also receives feedback from it.

The heat-induced circulation model

The Matsuno–Webster–Gill (MWG) Model

Matsuno (1966) studied the linearized shallow water equations applied to an equatorial β -plane:

$$\frac{\partial u}{\partial t} - fv = -g \frac{\partial h}{\partial x} \quad [1],$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + fu = -g \frac{\partial h}{\partial y} \quad [2],$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} + H \left(\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} \right) = 0 \quad [3],$$

where u and v are the velocities in the x and y directions, respectively, and h is the small deviation of the elevation on the top surface, the mean value of which is denoted by H . f is the Coriolis parameter and g is the acceleration of gravity. As shown in figure S1, <https://www.raccefyfyn.co/index.php/raccefyfyn/article/view/899/2837>; the x -axis is along the equator directing eastward and the y -axis is northward.

Here $f = \beta y$, where y is the meridional length measured from $y=0$ at the equator and $\beta = df/dy$ is the so-called Rossby parameter and is approximated to a constant. One can rewrite the set of equations using the geo-potential height ϕ instead of the geometrical height h .

$$\frac{\partial u}{\partial t} - fv = -\frac{\partial \phi}{\partial x} \quad [4],$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + fu = -\frac{\partial \phi}{\partial y} \quad [5],$$

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + c^2 \left(\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} \right) = 0 \quad [6],$$

where $c^2 = gH$ which is the square of the velocity of pure gravity waves.

Webster (1972) developed a theoretical analysis of the large-scale, stationary, zonally asymmetric motions that result from heating and orographic effects in the tropical atmosphere. Then, Gill (1980) using also the Matsuno (1966) equations proposed a simple

analytical model, which explains the main characteristics of the response of the atmosphere to concentrated diabatic heating in the tropics over a finite area. Both Webster and Gill found that there is a significant asymmetry in the circulation at the east and west sides of the heat source explained by solutions of the shallow waters equations in steady-state with a forcing equivalent to a concentrated heat source.

Suppose an atmosphere at rest is perturbed by adding an amount of heat Q and the perturbation is small enough to apply the linear theory, in that case, equatorially trapped waves describe well the response of the atmosphere. If the heating was switched on at some initial time, Kelvin waves would carry information rapidly to the east, thereby creating easterly winds in that region; also, winds will rise over the heat region generating a Walker-type circulation cell. If dissipative processes were significant, the easterly winds would reduce their speed gradually. On the other hand, switching on the heat source can also generate a half planetary wave (or half Rossby wave) which carries information quickly to the west. These planetary waves are much faster, three times as fast as the Kelvin waves, so the planetary wave size is one third of the Kelvin wave, resulting in two low-level cyclones with strong westerly winds.

When the movement occurs in the tropical region, reducing the problem to the non-dimensional form of a shallow water equations system with thermal forcing is useful. To that end, the units of time and length should be taken as:

$$T = (2\beta c)^{-1/2} \quad [7],$$

$$a = [c/(2\beta)]^{1/2}. \quad [8],$$

where a is the equatorial Rossby radius and T is a length of time. The following equation is used to write the shallow water equations in a non-dimensional form introducing the non-dimensional quantifiers denoted by an asterisk (Gill & Clarke, 1974):

$$x^* = x/a \quad y^* = y/a \quad u^* = u/c \quad v^* = v/c \quad \phi^* = c^2\phi \quad Q^* = c^2Q/T.$$

Finally, the non-dimensional equations (dropping the asterisk) are:

$$\frac{\partial u}{\partial t} - \frac{1}{2}yv = -\frac{\partial \phi}{\partial x} \quad [9],$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \frac{1}{2}yu = -\frac{\partial \phi}{\partial y} \quad [10],$$

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} = -Q \quad [11],$$

In these equations, the independent variables (x, y) represent the non-dimensional distances with x varying eastward and y along the north with $y=0$ at the equator. Both u and v are proportional to the components of horizontal velocity, and ϕ is proportional to the geo-potential disturbance. Q is proportional to the heating rate and the signs imply that a positive Q represents warming. Variables u, v, ϕ are measured on the surface. Equations [9] and [10] represent the momentum equations while [11] is the continuity.

Dissipative processes need to be introduced in some way to study the response to a stationary forcing. The most convenient ones are the “Rayleigh friction” and the “Newtonian cooling,” in which the operator $\partial/\partial t$ is replaced by $\partial/\partial t + \varepsilon$. An even more considerable mathematical simplification comes from assuming that ε adopts the same values in all the equations; this means that ε represents friction in the momentum equation and cooling in the continuity equation. Under steady flow with dissipation, the system of equations above becomes:

$$\varepsilon u - \frac{1}{2}yv = -\frac{\partial \phi}{\partial x} \quad [12],$$

$$\varepsilon v + \frac{1}{2}yu = -\frac{\partial \phi}{\partial y} \quad [13],$$

$$\varepsilon \phi + \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} = -Q \quad [14].$$

Assuming a small $\varepsilon \ll 1$ and that the forcing function is such that on the y -axis perturbations have an order of magnitude close to one with wavelength k small, then

$2\epsilon k \ll 1$. This relationship implies that the east-west forcing scale (k) is much larger than to 2ϵ . Therefore the term ϵv could be omitted. Then,

$$\frac{1}{2} y u = -\frac{\partial \phi}{\partial y} \quad [15].$$

This simplification implies that the horizontal velocity u is in geostrophic balance with the pressure gradient, a simplification equivalent to the long wave approximation when analyzing the system of equations in the transitory regime. Finally, the set of equations of the MWG model are:

$$\epsilon u - \frac{1}{2} y v = -\frac{\partial \phi}{\partial x} \quad [16],$$

$$\frac{1}{2} y u = -\frac{\partial \phi}{\partial y} \quad [17],$$

$$\epsilon \phi + \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} = -Q \quad [18].$$

Besides, the vertical velocity w comes from the buoyancy equation:

$$w = \frac{\partial \phi}{\partial t} + Q \quad [19].$$

The analytical solution of the MWG model for symmetrical heating to the equator

Assuming that the heat source is located symmetrically to the equator as shown in **figure 2a**, there is a neat analytical solution proposed by Gill in terms of parabolic cylindrical functions. Since the parabolic function $D(y) = \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$ is symmetric to the equator, one can use it to define the symmetric heating source as:

$$Q(x, y) = F(x)D(y) \text{ Where } F(x) = \begin{cases} \cos kx & |x| \leq L \\ 0 & |x| > L \end{cases} \quad [20].$$

In this case, the wave number k is

$$k = \frac{\pi}{2L} \quad [21].$$

When $n = 0$, the atmospheric response to an asymmetric heat source to the equator generates a Kelvin wave that travels to the east as shown in the following solution:

$$u = \phi = \frac{1}{2} q_0(x) \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$$

$$v = 0$$

$$w = \frac{1}{2} [\epsilon q_0(x) + 2F(x)] \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$$

$$q_0(x) = \begin{cases} 0 & x < -L \\ \frac{-\epsilon \cos kx - k[\sin kx + e^{-\epsilon(x+L)})]}{k^2 + \epsilon^2} & |x| \leq L \\ \frac{-k[1 + e^{-2\epsilon L}]e^{\epsilon(L-x)}}{k^2 + \epsilon^2} & x > L \end{cases}$$

Figure 2b shows Gill's solution for $n = 0$ and a heating source over the equator for $L=2$ and $\epsilon=0.1$. The previous solution represents a Walker circulation to the east ($x>L$) with easterly winds ($q_0 < 0, u < 0$) which travel parallel to the equator towards the heat source ($|x| \leq L$) where the winds rise ($w > 0$) with a maximum $x=0$ and then return towards the east in the high troposphere. The wave moves with unit celerity and dissipative rate ϵ . On the equator, there is always low pressure. However, it decreases towards the west until reaching its minimum on the heat source. The Kelvin wave does not carry information to the west of the heat source, so the solution for $x < -L$ is zero.

When $n = 1$, the system of equations has a solution described by a half planetary wave to the west of the heat source whose equations are:

$$\phi = \frac{1}{2} q_2(x)(1 + y^2) \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$$

$$u = \frac{1}{2} q_2(x)(y^2 - 3) \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$$

$$v = [F(x) + 4\epsilon q_2(x)] y \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$$

$$w = \frac{1}{2} [F(x) + 4\epsilon q_2(x)(1 + y^2)] \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right)$$

$$q_2(x) = \begin{cases} \frac{-k[1 + e^{-6\epsilon L}]e^{3\epsilon(x+L)}}{k^2 + (3\epsilon)^2} & x < -L \\ \frac{-3\epsilon \cos kx + k[\sin kx - e^{3\epsilon(x-L)}]}{k^2 + (3\epsilon)^2} & |x| \leq L \\ 0 & x > L. \end{cases}$$

Figure 2c shows the circulation to the west of the heat source described by the half planetary wave.

There are some important observations about the properties of this solution:

- $u = -\frac{3}{2}q_2(x)$ when $y=0$ and $q_2(x) < 0$ for $x < -L$. Therefore, the winds are from the west over the equator on the west side of the heating source.

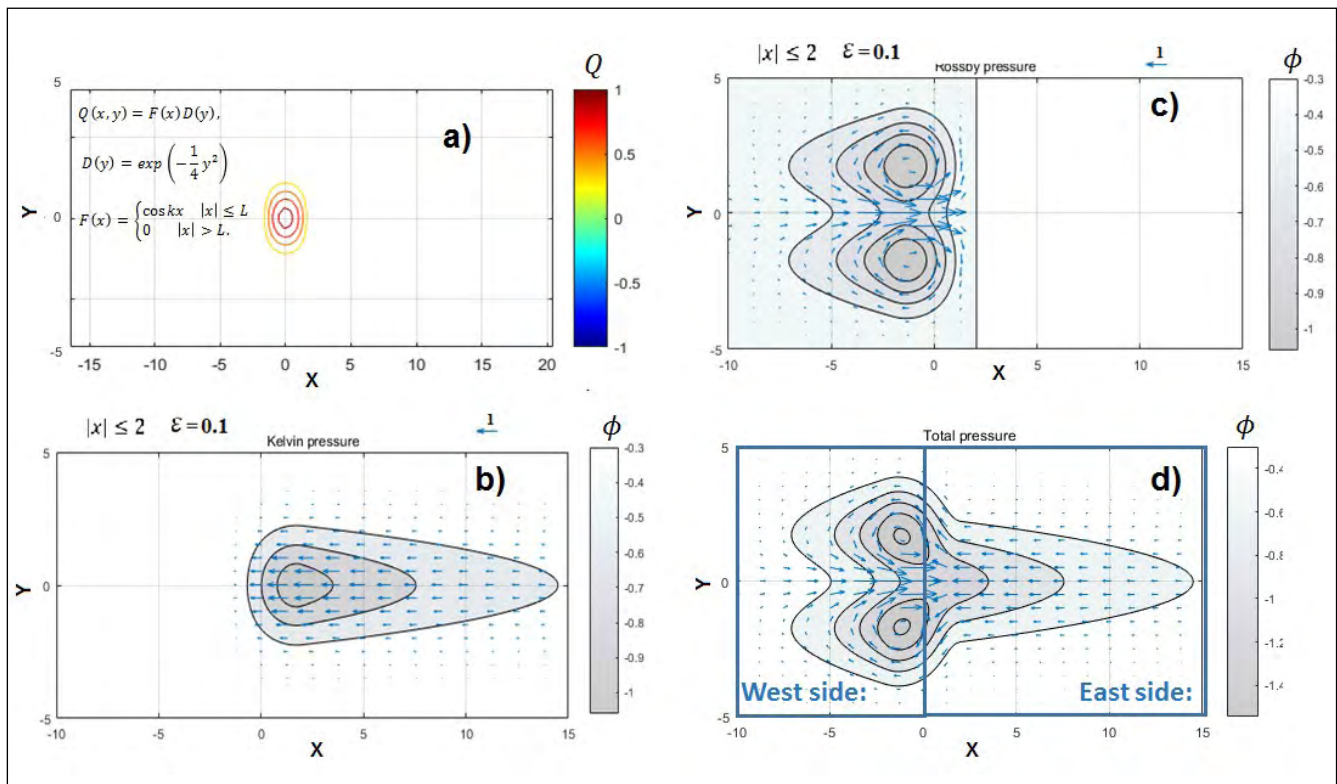


Figure 2. Solution for heating symmetric about the equator for decay factor $\epsilon = 0.1$ and $L=2$ in the lower troposphere (Gill, 1980); contours show perturbation in pressure, which is negative everywhere. **a)** Heat located symmetrically to the equator. **b)** Gill’s solution for $n = 0$ - Kelvin wave. **c)** Gill’s solution for $n = 1$ - Rossby wave. **d)** Total MWG solution for the system response to a heat source symmetric to the equator

- $u=0$ for $y=\pm\sqrt{3}$, which means that westerly winds vanish at a distance $\sqrt{3}$ above and below the equator. When $y>\sqrt{3}$ and $y<-\sqrt{3}$, the winds are from the east. In other words, winds recurve to the west of the heating source, as much to the north as to the south, generating two cyclones.

- The above inferences imply that the air is descending everywhere in the region $x<-L$ and is equatorward.

- Pressure decreases from the west to the east and the flow over the equator follows the pressure differences. By thermal wind and pure baroclinic mode in the upper troposphere, the fluxes are easterly.

The system of governing equations in the MWG model is linear, so the principle of superposition of the solutions is applicable. The sum of the solutions associated with the equatorial Kelvin and Rossby waves generates the total flow in response to a constant heating source such as that found in the western portions of the tropical ocean basins. **Figure 2d** shows the total MWG solution for the system response to a heat source symmetric to the equator for $\varepsilon=0.1$ and $L=2$. In the figure, the winds are westerlies on the west side of the heating source and easterlies on the east side. Notice that there is an ascending motion over the heating zone. Also, the shape of the rising air area is similar to that of the forcing region. There is subsidence outside the heating region, especially to the west. The pressure is negative on all sides with a minimum over the heat source. The pressure to the west of the forcing region is relatively high at points farther from the equator.

Examining the meridional flows over the heating region at the limit when ε tends to 0, it is evident that $v=0$. This implies that the flow is longitudinal with no meridional component east of the heating zone. For the Rossby wave to the west, we have:

$$v = yF(x) \exp\left(-\frac{1}{4}y^2\right).$$

Therefore, v decays exponentially away from the equator. However, perhaps the most exciting feature revealed by the above equation is that $v>0$ for $y>0$, which is a flow to the north while for $y<0$, $v<0$ the flow is to the south. These signs mean that the low-level flow is poleward out of the heating zone. Besides, $w>0$, so the conjunction between v with w components generates a flow over the heating source that is upward and outward creating a vortex tube.

The conceptual scheme in **figure S2**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/899/2838>; presents the MWG solution with easterly winds to the east side of the heat source and strong westerly winds to the west. There is a poleward divergence flow over the heating zone in the lower troposphere. Meteorologically, easterly and westerly winds transport cold air towards the heating zone and, then, the wind will return towards east/west in the high troposphere according to the thermal wind relationship. Strong easterly winds associated with two anticyclones in the upper troposphere (300 hPa) compensate the two cyclones associated with strong westerly winds in the low-level troposphere (850 hPa). Similarly, at the east side of the heat source, low-level easterly winds are balanced by westerly winds associated with weak cyclonic circulation in the upper troposphere. In light of these results, it is much simpler to understand the response of the upper troposphere to a heat source dynamically formed in lower levels.

The numerical model of tropical circulation in northern South America

Figure 3a shows MWG's numerical solution for heating symmetrical to the equator located at 77°W scaled on a map of the Americas using a numerical approximation of central finite differences scheme to solve the linear system of equations under the steady-state conditions. One can notice a Walker circulation over the tropical Atlantic and the Orinoco and Amazon basins with easterly winds that travel parallel to the equator toward the heat source where the winds ascend ($w>0$ with maximum $x=0$) and then return to the Atlantic in the high troposphere. On the west side of the heat source, two cyclones generate strong westerly winds, one of them located to the north-west, which forces the flow to cross Central America recurving to northern South America and there is also another similar

recurving from the Peruvian coast. Winds rise on the heat source by a vortex tube that directs the winds poleward in the high levels of the troposphere. On the upper troposphere, there are two anticyclones which generate westerly winds to the west of the heat source. All those features of the MWG model match with the observations in the literature review.

Using the MWG's solution we could integrate into a single physical framework all the previous analysis of the atmospheric circulation over northern South America. Among other things, this theoretical framework provides:

- (i) A new explanation for the Caribbean jet recurving (not explained until now).
- (ii) A reinterpretation of the re-curvature of the winds coming from the Peruvian coasts (the so-called CHOCO Jet) using a new reason not related by Stenrud's mechanisms.
- (iii) A connection between these two with the existence of a Walker cell between the tropical Atlantic and the north of South America.

The analysis of the annual diabatic heating cycle presented by **Cruz (2017)** shows that the heat source is usually at 4° - 5° N from mid-March to mid-November. Therefore, to have a more realistic condition of the circulation in northern South America, we should solve the problem associated with a heat source positioned to the north but close to the equator. We simulate asymmetric heating located at 4° - 5° N represented by a meridional displacement of $+0.9$ in y in the non-dimensional model as presented in **figure 3b**.

The heat source is still close to the equator and many of the patterns observed in the symmetric forcing circulation are preserved, for example, the winds on the eastern flank remain almost intact preserving most of the features of Walker's cell with a slight reduction in the maximum value of the easterly winds. The most significant changes occur on the west side of the heating zone in the circulation associated with the planetary wave. Both cyclones are still present but that to the north-west of the heating source is strengthened by decreasing the pressure values in its center of action (decreases by 50%) while the cyclone to the south-west weakens due to an increase in pressure of 30%. These changes generate a slight increase in the magnitude of the westerly winds (5%) and a slight reduction in vertical velocity; an increase in the outflow from the heat source with preference to the north in the low-level troposphere can also be observed.

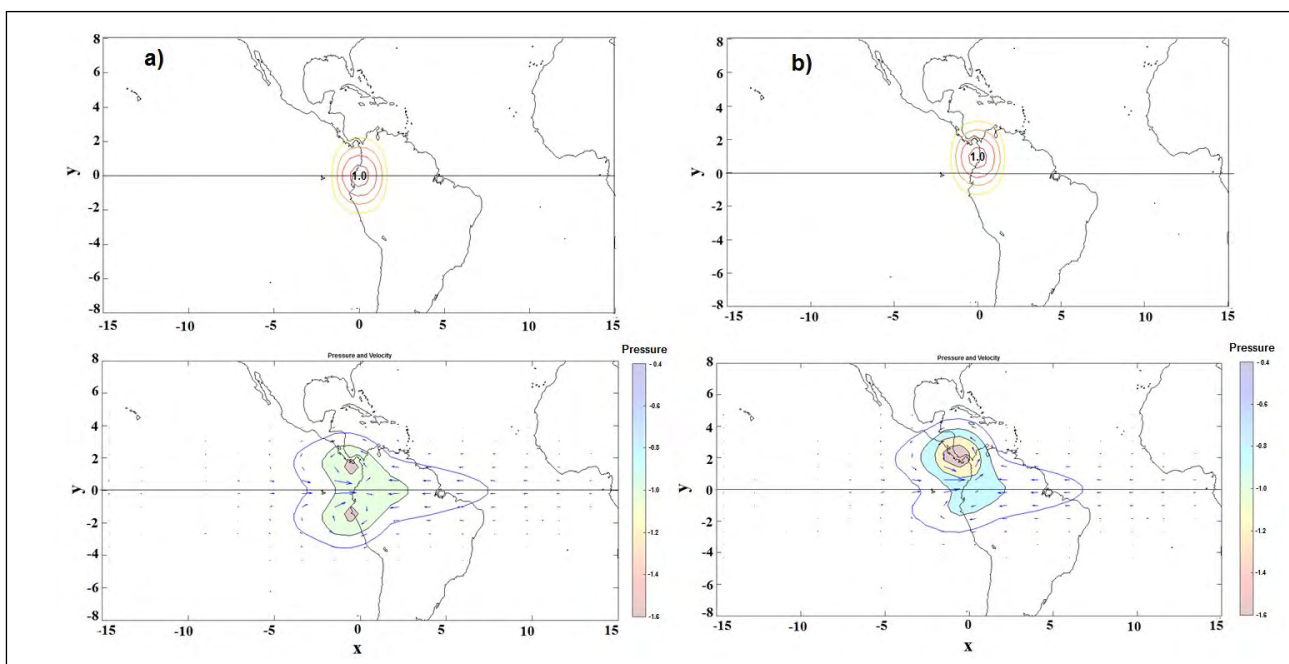


Figure 3. Low-level atmosphere's general circulation over northern South America associated with: **a)** Left panel: A heat source symmetric to the equator located at 78° W using $\varepsilon = 0.1$ and $L = 2$. **b)** Right panel: a heat source located at 4° N using $\varepsilon = 0.1$ and $L = 2$

Scaling a map of the Americas on the numerical solution of the MWG model, it is possible to notice that the intense cyclone located north-west of the heat source should be positioned over Panamá creating the “Panamá Low” while the southwest has its center of action over the equator; both cyclones are responsible for generating strong westerly winds between 4° and 5°N. In the east of the heating zone, there are easterly winds from the tropical Atlantic crossing the north of the Amazon and the Orinoco basin before reaching the Andean mountain range and the diabatic heating source. Another interesting result is that the magnitude of the easterly winds located in the north of the cyclone on Panamá increases by 23%. This intensification would imply that the high velocities in low levels of the atmosphere associated with the Caribbean Jet from April to November could be also associated with the asymmetric location of the heating source above the equator.

Figure 4 shows a conceptual scheme of the general circulation of the atmosphere based on the results obtained for a heat source located north of the equator. The graph omits the existence of weak anticyclones. In contrast with the intense cyclone at a low level (the Panamá Low), there should be a strong anticyclone at high levels of the troposphere by thermal wind compensation (first baroclinic mode). Besides, strong easterly winds in the upper troposphere compensate those from the west in the lower atmosphere. There is a Walker circulation with easterly winds in 850hPa and westerly winds over 300 hPa; also, there is a divergence of the low-level winds from the source of heat present towards the north, which must be compensated in the upper troposphere by winds towards the south.

A review of the general circulation in the low (850hPa) and high (300 hPa) troposphere over northern South America confirms the previous conceptual scheme of the MWG circulation for which we draw the streamlines of the wind fields of the ERA-interim reanalysis. **Figure 5** shows an intense cyclone over Panamá and a slightly weaker one on the equator; together those cyclones generate strong westerly winds on the western flank of the Andes. On the east side of the heating source, easterly winds go from the Atlantic to the eastern flank of the Andes mountains, most of them running parallel to the equator. In the upper troposphere, two anticyclonic circulations are evident, the first over Central America and the second over Bolivia (Bolivia High). The upper tropospheric anticyclone over Central America follows the conceptual scheme described in **figure 4** with strong easterly winds to the west of the heat source and winds from west to east.

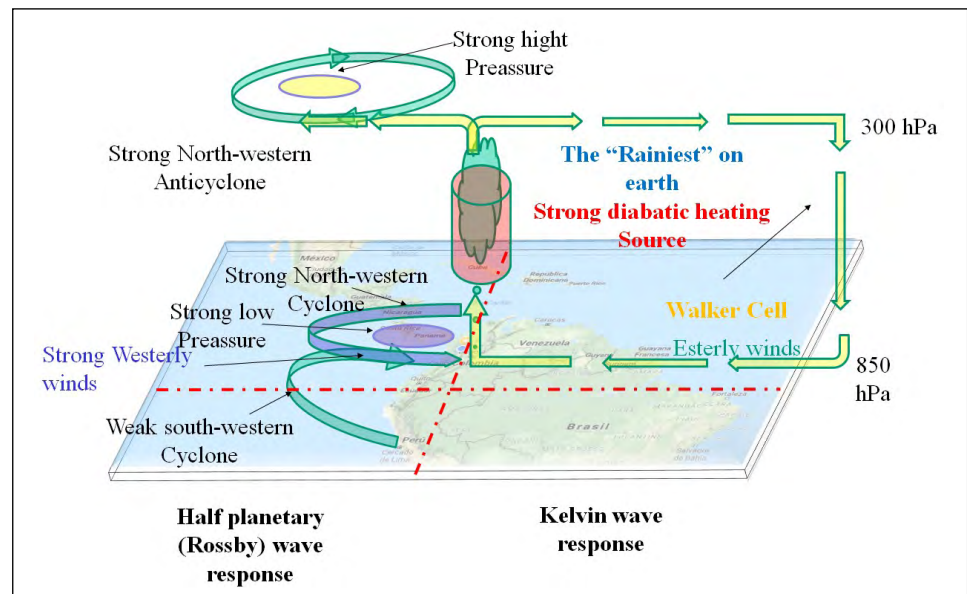


Figure 4. Schematic diagram of the general circulation of the atmosphere in northern South America and Mesoamerica using the heat-induced circulation

The sensitivity of the MWG-type circulation to longitudinal and latitudinal heating or cooling sources

Figure S3, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/899/2839>; presents the annual cycle of the total column-diabatic heating taken from the ERA-40 Atlas. For its estimation, all the components of the energy balance in the residual thermodynamic equation were considered; therefore, its values are higher than those presented by **Cruz (2017)**. The idea was to determine the order of magnitude of diabatic heating (positive) or cooling (negative) sources around Colombia to simulate different scenarios.

Several studies have affirmed that the westerly winds on the Eastern Pacific arise from the sea surface temperature differences between Perú and Colombia's coasts (**Poveda & Mesa, 1999, Poveda, et al., 2006; Poveda, et al., 2014**). This argument follows **Stensrud's (1996)** mechanisms to explain the low-level jet but our analysis suggests the importance of considering the circulation's sensibility to other latitudinal cooling/heating zones.

This problem is similar to one developed by **Gill (1980)** when studying the response of the tropical atmosphere to an asymmetric forcing, i.e., a heat source north of the equator and cooling to the south. This scenario generates cross-equatorial winds that curve towards the heat source, like in the case of the Indian monsoon during the boreal summer. However, this analytical solution implies that there is no flow on the eastern side of the heat source and the response is limited to the west. If these arguments were correct, they would imply that a cold source over Perú with the same magnitude as the Colombian heat source would affect the easterly winds and Walker's cell but not the westerly winds. This question is just a theoretical introduction to a problem that needs further consideration.

We need the main features of the velocity and surface pressure fields to perform some basic numerical experiments. Let us denote $U_{w_{max}}$ as the maximum westerly wind speed; $U_{e_{max}}$ is the maximum easterly wind speed at the east of the heat source; U_{e_2} corresponds to the maximum value of the easterly winds on the cyclone located north-west of the heat source; P_1 and P_2 are minimum values of the pressure of the cyclones located north-west and south-west of the heat source, and W_{max} represents the maximum value of vertical velocity.

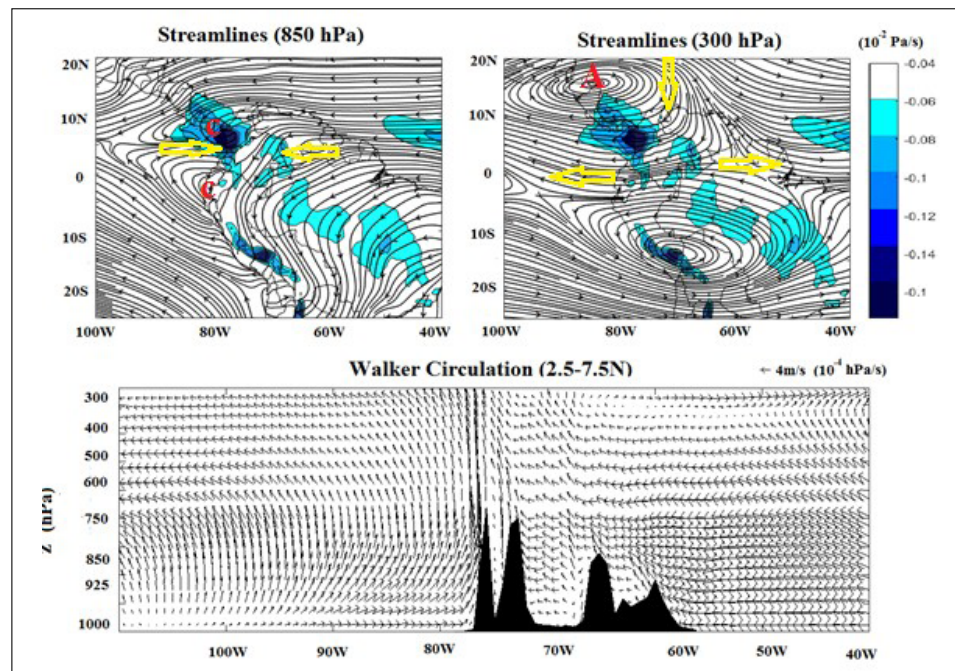


Figure 5. Average multiannual circulation in northern South America using the ERA-interim reanalysis

The diabatic heating fields presented by ERA-40 Atlas (**Figure S3**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/899/2839>) show that the magnitude of the heat source over Colombia is much higher than the cooling on the Peruvian coast with heating values higher than $+800 \text{ W/m}^2$ while the magnitude of the Pacific Ocean cooling in front of Perú is less than -150 W/m^2 . Being generous, the ratio between the two could be 1: -0.2. **Figure 6** shows the results of the simulation of this scenario (case 1), and **table 2** contains the numerical results. The magnitude of the westerly winds does not depend on the gradient of temperatures between the coasts of Colombia and Perú, but the Walker circulation would be a highly sensitive circulation if there were cooling sources near Perú because easterly winds reduce its magnitude in about 17% (from -0.96 to -0.80).

Although the Pacific Ocean in front of Perú is quite cold, this does not imply the existence of a concentrated cooling zone on this region; in fact, the existence of the Southeast Pacific Subtropical Anticyclone off the coast of Chile and close to the Atacama Desert suggest that this area is the correct location of the subsidence zone. Case (2) presents an analysis of sensitivity to the southern location of cold zones in the MWG model according to the magnitude and location along the extratropical anticyclones. The results show that the influence of extratropical cold zones upon the circulation in northern South America is almost nil.

Other analyses (not shown here) explain what happens when there is another heating source in front of the coasts of Perú. In that case, the westerly winds associated with the two anticyclones would be located south of the equator between the two warming zones

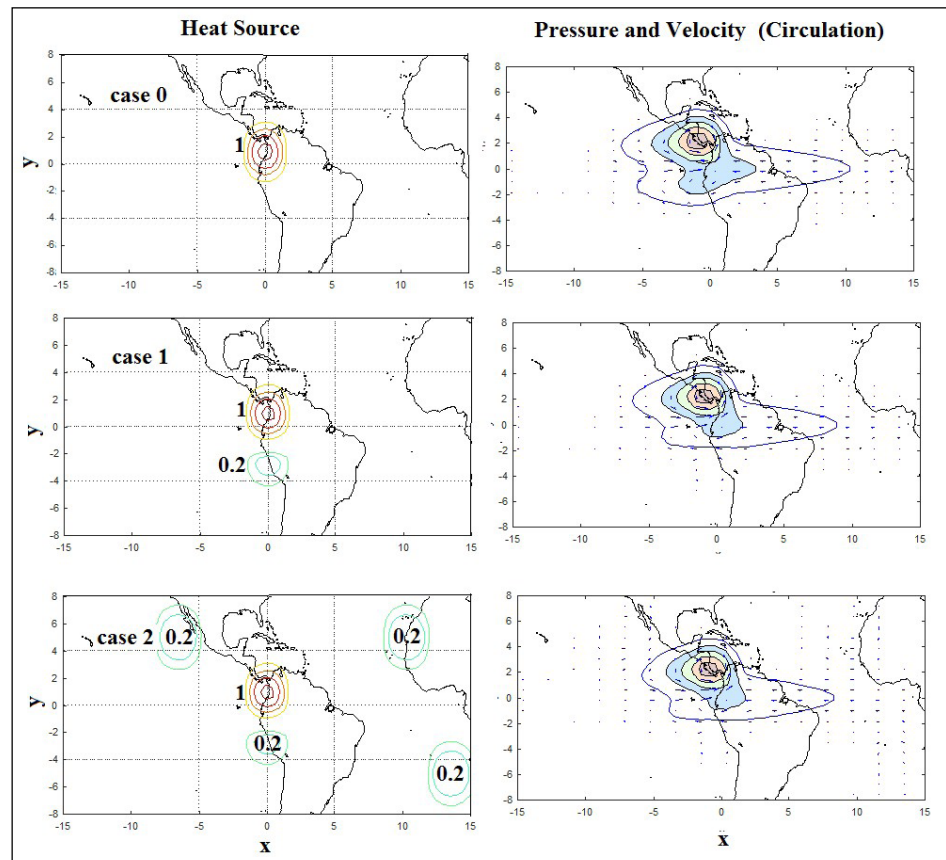


Figure 6. Comparisons of the circulation in northern South America for different cases: Diabatic heating source located at 4°N (Case 0); diabatic heating source located at 4°N and a cooling zone on Perú (12°S) with a 1: -0.2 relation (Case 1); diabatic heating source located at 4°N and cooling zones on the extra-tropical anticyclones (Case 2)

generating intense precipitations on the western side of the Andes close to the Equator and Perú. The result is a decrease in the magnitude of the westerly winds entering Colombia and an increase of the speed of the easterly winds on the eastern flank of the Andes. These anomalies usually occur during a coastal El Niño event (Takahashi & Martínez, 2017).

Different macro-climatic events at different time scales can generate diabatic heating or cooling anomalies over the Pacific. The MWG model also helps to explain the response of the atmosphere to these scenarios. As an exercise, we proposed to locate other heat or cooling sources over the central Pacific in the same way and magnitude as that located over Colombia. These exercises are of particular interest because they resemble what happens during El Niño, La Niña, or other events on the Pacific.

Table 3 and **figure 7** show the main parameters of the numerical experiments. The first observation is that the presence of an additional heating source over the central Pacific (case 3) produces a reduction in westerly winds of 25% from 2.44 to 1.84 while the easterly winds to the east of the original heat source increase by 50%. In this case, there is a weakening of the two anticyclones and a strengthening of the easterly winds on the eastern side of the Andes, which explains rainfall increase during El Niño events in those areas while the rest of Colombia is under dryer conditions. These observations were explained by Wang (2004) who demonstrated how the Walker cell over the Atlantic extends to the eastern Pacific under El Niño conditions due to the increase of easterly winds in the low and medium levels of the troposphere. Over the rest of Colombia, the vertical velocity is reduced by decreasing the buoyancy, facilitating the spatial acceleration of the wind in the middle troposphere levels, and generating a significant reduction in precipitation over the Andean region.

Case 4 corresponds to the location of a cooling zone on the central Pacific Ocean; the effects are contrary to case 3. There is a 20% increase of the westerly winds and a 50% weakening of the easterly winds while the vertical velocity increases significantly creating convergence and precipitation.

Another interesting feature of Central America and northern South America climatology is the existence of the *Veranillo de San Juan* or *Canícula*, also known as summer drought. This reduction of the precipitation during June, July, and August comes from “so far unexplained causes” (Poveda, *et al.*, 2006). One possible explanation is the Eastern Pacific Warm Pool, which reaches maximum temperatures during the boreal summer (Magaña, *et al.*, 1999; Wang, 2004; Xie, *et al.*, 2005). The increment in the magnitude of the wind current in the Caribbean Jet could also play a role.

Table 2. Numerical experiments for cases: 1) Diabatic heating source located at 4 ° N and a cooling zone on Perú (12 ° S) with a 1: -0.2 relation and 2) diabatic heating source located at 4 ° N and cooling zones on the extra-tropical anticyclones

Forcing	Uw_{max}	Ue_{max}	Ue_2	W_{max}	P_1	P_2
Case 0 (Control)	2.44	-0.96	-0.70	0.86	-2.32	-1.09
Case 1	2.40	-0.83	-0.93	0.84	-2.27	-0.90
Case 2	2.41	-0.84	-0.93	0.84	-2.23	-0.89

Table 3. Numerical experiments for another heating (case 3) or cooling (case 4) source over the tropical Pacific Ocean

Case	Uw_{max}	Ue_{max}	Ue_2	W_{max}	P_1	P_2
0	2.44	-0.96	-0.70	0.86	-2.32	-1.09
3	1.84	-1.44	-0.74	0.80	-2.52	-1.55
4	3.04	-0.49	-0.32	0.91	-2.14	-0.63

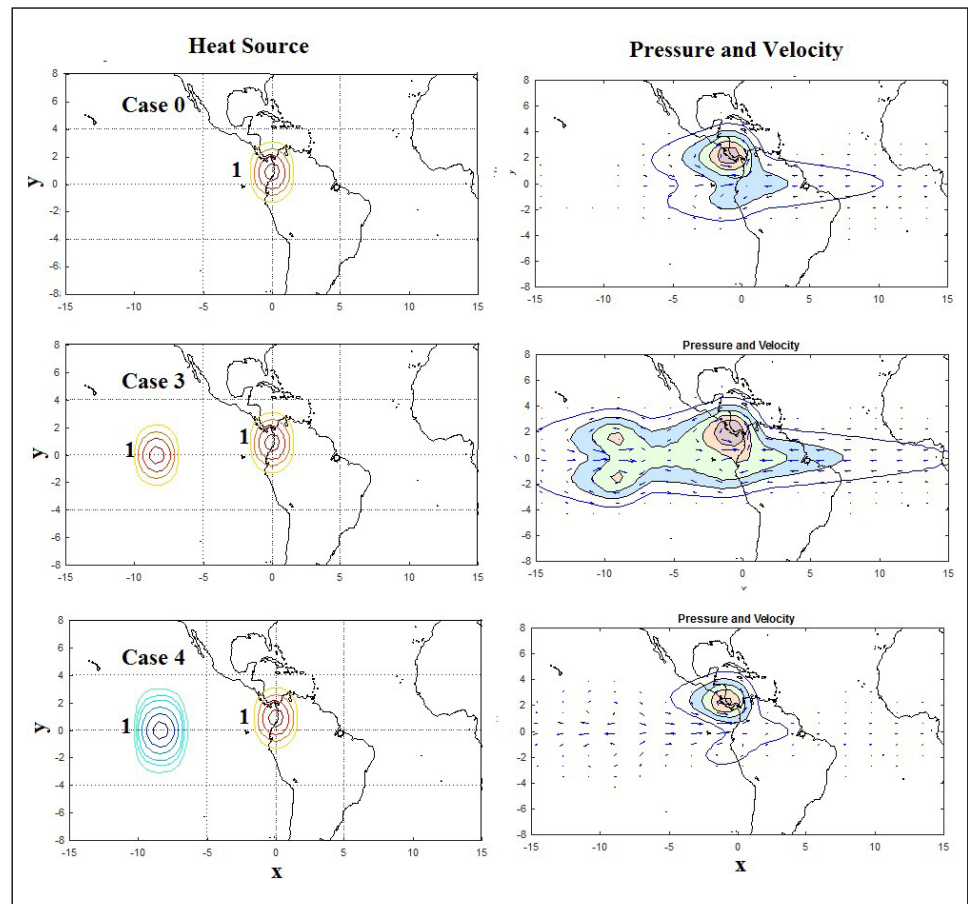


Figure 7. Comparisons of circulation in northern South America considering different scenarios. Case 0: Diabatic heating source located at 4 ° N; Case 3: Diabatic heat source located at 4 ° N and another with the same magnitude on the Central Pacific; Case 4: Diabatic heat source located at 4°N and a cooling zone on the Central Pacific

When analyzing the total vertically-integrated diabatic heating in the ERA 40 Atlas, one notes the development of another heating zone associated with the Eastern Pacific Warm Pool. Indirectly, the location of this additional heat source may have similar effects to those of case 3 in the previous analysis. The consequences are already known: the westerly winds entering Colombia from the Pacific reduce and the in easterly winds from the east increase. In fact, during the Andean summer drought, the eastern flank of the Andes presents the highest rainfall in response to the increase in easterly winds and the heat source could probably move towards the eastern Pacific reducing the ascent of air over Colombia. The strengthening of the easterly winds in the mid-level troposphere produces moisture divergence over the Colombian Andean region thus decreasing precipitation.

Conclusions

The heat-induced tropical circulation model proposed by Matsuno-Webster-Gill represents a physical explanation of the general circulation of the atmosphere in northern South America and Mesoamerica and changes the paradigm for understanding hydroclimatology in Colombia and its surroundings.

This new explanation of Colombia's hydroclimatology is remarkable because the physical principles of a heat-induced circulation could be applied to different time scales of the geophysical fluid dynamics (at daily, intra and inter-annual scales, and to climate

change). On the other hand, the linear approximation is potent: it allows superposition exercises without limit, positive and negative sources, time dependence, and all can be constructed from linear solutions tables. Also, we can deconstruct the circulation to have a better understanding than the one presented here.

The heat source over western Colombia produces a strong low-level westerly inflow because a half planetary wave propagates over Mesoamerica and the far Eastern Pacific generating two cyclonic flows. This wave is an excellent feedback example between westerlies and latent heating on west-facing mountain slopes. According to this explanation, winds from the Caribbean Sea and the Peruvian coast recurve towards Colombia giving rise to the rainiest region on Earth. Since heating sources drive westerlies, this feedback process is inevitable. On the east side of the heating source, a Kelvin wave generates low-level easterly flow from the tropical Atlantic Ocean and the Northern Amazon and Orinoco basins in a Walker type circulation.

The asymmetrical location of the diabatic heating ($4\text{-}5^\circ$ N) increases the magnitude of the north-western cyclone and the low-level pressure over Panamá becomes stronger. For this reason, we can conclude that the asymmetric diabatic heating location forces the “Panama Low.” With the thermal wind compensation and the first baroclinic mode, there is also a strong anticyclone in the upper atmosphere over Central America.

This type of circulation is highly sensitive to the appearance of other latitudinal or longitudinal sources of cooling or heating. In this sense, we can conclude that the magnitude of westerly winds does not depend on the gradient of temperatures between the coasts of Colombia and Perú. However, the Walker circulation is highly sensitive to the presence of a cooling source near Perú.

At seasonal scale, warming in the Pacific Ocean generates an acceleration of easterly winds leading to a reduction in the continental convection and increases the divergence in the easterly winds over some regions, which translates into a dry season with a significant reduction in precipitation. On the eastern flank of the Andes mountain range, the acceleration of the easterly winds implies greater orographic and low-level convergence, increasing the precipitation in the area. From the annual perspective, the position of heating or cooling zones to the west of the heat source, which according to the MWG model generates a response comparable to that of the north winds from South America, explains events such as El Niño or La Niña.

To summarize, the diabatic heating and its anomalies (both negative and positive) associated with the rainiest place on Earth are really the drivers of circulations over Colombia and its neighborhood with a pervasively forced flow (everywhere); the planetary and Kelvin waves are “characteristic” or “caustics” creating information pathways which, in turns, dominate the low level an upper-level winds fields.

Supplementary figures

Figure S1. Shallow water model and coordinates. Source: Matsuno (1966). See the figure S1 en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/899/2837>

Figure S2. Baroclinic response of the heat source placed on the Equator, rotation case (following MWG’s solution). See the figure S2 en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/899/2838>

Figure S3. Column-integrated heating. ERA-40 Atlas. https://software.ecmwf.int/static/ERA-40_Atlas/docs/section_C/parameter_cih.html. See the figure S3 en <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/899/2839>

Authors contribution

Both authors contributed to all aspects of the work: conceiving the problem, the solution, writing, and reviewing. JDRH did the computations and plotted the figures.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

References

- Adler, R., Gu, G., Huffman, G.** (2011). Estimating climatological bias errors for the global precipitation climatology project GPCP. *Journal of Apply Meteorology and Climatology*. **51** (1): 84-99.
- Álvarez-Villa, O. D., Vélez, J. I., Poveda, G.** (2011). Improved long-term mean annual rainfall fields for Colombia. *International Journal of Climatology*. **31** (14): 2194-2212.
- Amador, J. A., Alfaro, E. J., Lizano, O. G., Magaña, V. O.** (2006). Atmospheric forcing of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography*. **69** (2): 101-142.
- Amador, J. A. & Magana, V.** (1999). Dynamics of the low level jet over the Caribbean Sea. In Preprints, Third Conference on Hurricanes and Tropical Meteorology.
- Amador, J. A.** (2008). The intra-Americas sea low-level jet. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1146** (1): 153-188.
- Arias, P. A., Martínez, J. A., Vieira, S. C.** (2015). Moisture sources to the 2010-2012 anomalous wet season in northern South America. *Climate Dynamics*. **45** (9-10): 2861-2884.
- Arnett, A. B. & Steadman, C. R.** (1970). Low-level wind flow over eastern Panama and northwestern Colombia. Technical report, ESSA Technical Memorandum ERLTM-ARL 26, U.S. Department of Commerce, Environmental Science Services Administration Research Laboratories, Air Resources Lab. Silver Spring, Mryland. 73 pp, 1970.
- Chan, S. C. & Nigam, S.** (2009). Residual diagnosis of diabatic heating from ERA-40 and NCEP reanalyses: Intercomparisons with TRMM. *Journal of climate*. **22** (2): 414-428.
- Chelton, D. B., Freilich, M. H., Esbensen, S. K.** (2000). Satellite observations of the wind jets off the Pacific coast of Central America. Part I: Case studies and statistical characteristics. *Monthly Weather Review*. **128** (7): 1993-2018
- Cook, K. H. & Vizy, E. K.** (2010). Hydrodynamics of the Caribbean low-level jet and its relationship to precipitation. *Journal of Climate*. **23** (6): 1477-1494.
- Cruz, C.** (2017). Efectos de la variabilidad de la estructura dinámica y termodinámica del calentamiento atmosférico en la climatología de Colombia. Tesis de Maestría en Ingeniería-Recursos Hidráulicos. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín
- Durán-Quesada, A. M., Reboita, M., Gimeno, L.** (2012). Precipitation in tropical America and the associated sources of moisture: a short review. *Hydrological Sciences Journal*. **57** (4): 612-624.
- Eslava, J. A.** (1993). Climatología y diversidad climática de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. **18** (71): 507-538.
- Gill, A. E. & Clarke, A. J.** (1974). Wind-induced upwelling, coastal currents and sea-level changes. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts*. **21** (5): 325-345.
- Gill, A.** (1980). Some simple solutions for heat-induced tropical circulation. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*. **106** (449): 447-462.
- Holton, J. R. & Hakim, G. J.** (2012). An introduction to dynamic meteorology. 245 (Vol. 88). Academic Press. p. 507.
- Kessler, W. S. & Gourdeau, L.** (2006). Wind-driven zonal jets in the South Pacific Ocean. *Geophysical Research Letters*. **33** (3): L03608. Doi:10.1029/2005GL025084.
- López, M. E.** (1966). Cloud seeding trials in the rainy belt of western Colombia. *Water Resources Research*. **2** (4): 811-823.
- Magaña, V., Amador, J. A., Medina, S.** (1999). The midsummer drought over Mexico and Central America. *Journal of Climate*. **12** (6): 1577-1588.
- Makarieva, A. M. & Gorshkov, V. G.** (2006). Biotic pump of atmospheric moisture as driver of the hydrological cycle on land. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*. **3** (4): 2621-2673.
- Makarieva, A. M. & Gorshkov, V. G.** (2010). The biotic pump: Condensation, atmospheric dynamics and climate. *International Journal of Water*. **5** (4): 365-385.
- Mapes, B. E., Warner, T. T., Xu, M.** (2003). Diurnal patterns of rainfall in northwestern South America. Part III: Diurnal gravity waves and nocturnal convection offshore. *Monthly Weather Review*. **131** (5): 830-844.
- Matsuno, T.** (1966). Quasi-geostrophic motions in the equatorial area. *Journal of the Meteorological Society of Japan. Ser. II*. **44** (1): 25-43.
- Mejía, J. F. & Poveda, G.** (2005). Ambientes atmosféricos de sistemas convectivos de meso-escala

- sobre Colombia durante 1998 según la misión TRMM y el re-analysis NCEP/NCAR. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias*. **29**: 495-514.
- Mesa, O. J., Poveda, G., Carvajal, L. F.** (1997) Introducción al clima de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, 1997. p. 390.
- Mestas-Nuñez, A. M., Enfield, D. B., Zhang, C.** (2007). Water vapor fluxes over the Intra-Americas Sea: seasonal and interannual variability and associations with rainfall. *Journal of Climate*. **20** (9): 1910-1922.
- Nieuwolt, S.** (1977). *Tropical climatology*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 352 p.
- Pabón-Caicedo, J. D., Eslava-Ramírez, J. A., Gómez-Torres, R. E.** (2001) Generalidades de la distribución espacial y temporal de la temperatura del aire y de la precipitación en Colombia. *Meteorología Colombiana*. **4**: 47-59.
- Poveda-Jaramillo, G.** (1998). Retroalimentación dinámica entre el fenómeno el niño-oscilación del sur y la hidrología de Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín).
- Poveda, G. & Mesa, O. J.** (1997). Feedbacks between Hydrological Processes in Tropical South America and Large-Scale Ocean–Atmospheric Phenomena. *Journal of Climate*. **10** (10): 2690-2702.
- Poveda, G. & Mesa, O.** (1999). La corriente de chorro superficial del Oeste (“Del Chocó”) y otras dos corrientes de chorro en Colombia: Climatología y variabilidad durante las fases del ENSO. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. **23** (89): 517-528.
- Poveda, G. & Mesa, O. J.** (2000). On the existence of Lloró (the rainiest locality on Earth): Enhanced ocean-land-atmosphere interaction by a low-level jet. *Geophysical Research Letters*. **27** (11): 1675-1678.
- Poveda, G., Mesa, O., Agudelo, P., Álvarez, J., Arias, P., Moreno, H., et al.** (2002). Influencia de ENSO, oscilación Madden-Julian, ondas del Este, huracanes y fases de la Luna en el ciclo diurno de la precipitación en los Andes Tropicales de Colombia. *Meteorología Colombiana*, **5**: 3–12, 2002.
- Poveda, G., Waylen, P., Pulwarty, R. S.** (2006). Annual and inter-annual variability of the present climate in northern South America and southern Mesoamerica. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. **234** (1): 3-27.
- Poveda, G., Jaramillo, L., Vallejo, L. F.** (2014). Seasonal precipitation patterns along pathways of South American low-level jets and aerial rivers. *Water Resources Research*. **50** (1): 98-118.
- Romero-Centeno, R., Zavala-Hidalgo, J., Raga, G. B.** (2007). Midsummer gap winds and low-level circulation over the eastern tropical Pacific. *Journal of Climate*. **20** (15): 3768-3784.
- Sakamoto, M. S., Ambrizzi, T., Poveda, G.** (2011). Moisture sources and life cycle of convective systems over western Colombia. *Advances in Meteorology*. vol. 2011, Article ID 890759, 11 pages, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/890759>
- Serra, Y. L., Kiladis, G. N., Hodges, K. I.** (2010). Tracking and mean structure of easterly waves over the Intra-Americas Sea. *Journal of Climate*. **23** (18): 4823-4840.
- Snow, J. W.** (1975). *The climates of northern South America*. University of Wisconsin--Madison. p?
- Stensrud, D. J.** (1996). Importance of low-level jets to climate: A review. *Journal of Climate*. **9** (8): 1698-1711.
- Takahashi, K. & Martínez, A. G.** (2017). The very strong coastal El Niño in 1925 in the far-eastern Pacific. *Climate Dynamics*. **52** (12): 7389-7415, 2019.
- Urrea, V., Ochoa, A., Mesa, O.** Seasonality of rain- fall in Colombia. *Water Resources Research*. **55** (5): 2019. Doi: 10.1029/2018WR023316
- Velasco, I. & Fritsch, J. M.** (1987). Mesoscale convective complexes in the Americas. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. **92** (D8): 9591-9613.
- Wang, C.** (2007). Variability of the Caribbean low-level jet and its relations to climate. *Climate Dynamics*. **29** (4): 411-422.
- Wang, C. & Lee, S.** (2007). Atlantic warm pool, Caribbean low-level jet, and their potential impact on Atlantic hurricanes. *Geophysical Research Letters*. **34**, L02703, doi:10.1029/2006GL028579.
- Wang, C.** (2002). Atlantic climate variability and its associated atmospheric circulation cells. *Journal of Climate*. **15** (13): 1516-1536.
- Wang, C.** (2004). ENSO, Atlantic climate variability, and the Walker and Hadley circulations. In *The Hadley circulation: present, past and future* (pp. 173-202). Springer.
- Webster, P. J.** (1972). Response of the tropical atmosphere to local, steady forcing. *Mon. Wea. Rev.*

100 (7): 518-541.

- Whyte, F. S., Taylor, M. A., Stephenson, T. S., Campbell, J. D.** (2008). Features of the Caribbean low level jet. *International Journal of Climatology*. **28** (1): 119-128.
- Xie, S.-P., Xu, H., Kessler, W. S., Nonaka, M.** (2005). Air–sea interaction over the eastern Pacific warm pool: Gap winds, thermocline dome, and atmospheric convection. *Journal of Climate*. **18** (1): 5-20.
- Xie, S. P., Xu, H., Saji, N. H., Wang, Y., Liu, W. T.** (2006). Role of narrow mountains in large-scale organization of Asian monsoon convection. *Journal of climate*. **19** (14): 3420-3429.
- Zhang, K., Randel, W. J., Fu, R.** (2017). Relationships between outgoing longwave radiation and diabatic heating in reanalyses. *Climate Dynamics*. **49** (7-8): 2911-2929.
- Zuluaga, M. D. & Poveda, G.** (2004). Diagnostics of mesoscale convective systems over Colombia and the eastern tropical Pacific during 1998-2002. *Avances en Recursos Hidráulicos*. **11**: 145-160.

Artículo original

Sillimanita en esquistos y cuarcitas de los Esquistos del Silgará en el cerro La Ventana, macizo de Santander, Colombia: implicaciones petrológicas

Sillimanite in schists and quartzites of the Silgará Schists Unit in Cerro La Ventana in the Santander Massif, Colombia: petrological implications

✉ Carlos Alberto García-Ramírez, ✉ María Paula Rey-Roman*, ✉ José Jaime Martínez-Vertel

Escuela de Geología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Resumen

La presencia masiva (18 y 52 %) de sillimanita (Sil) en esquistos y cuarcitas de la unidad Esquistos del Silgará en los sectores del cerro La Ventana y la cuchilla Frailejones es un caso único en el macizo de Santander en la cordillera Oriental de los Andes colombianos. En estas rocas se han reconocido dos tipos de sillimanita: Sil1, de la variedad fibrolita o prismática, y Sil2, de la variedad fibrolita (que se desarrolla en forma radial asociada con cuarzo). La asociación del pico metamórfico consiste en biotita+muscovita+cuarzo+plagioclasa+sillimanita1 con la formación de abundante sillimanita de la variedad fibrolita permitió determinar las siguientes condiciones: $T=650-720\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $P=5,5-6,9\text{ Kb}$. Estas condiciones sugieren que las rocas sufrieron un gradiente metamórfico de cerca de $32\text{ }^{\circ}\text{C/Km}$, típico de un metamorfismo barroviano. La Sil2 se formó en una etapa ligeramente posterior al pico metamórfico en un ambiente menos deformado y posiblemente por el efecto termal debido al emplazamiento de ortoneises del Ordovícico Tardío. Las características geoquímicas evidencian que el protolito de estos esquistos y cuarcitas fueron pelitas asociadas con un margen continental activo.

Palabras clave: Sillimanita; Esquistos; Cuarcitas; Cerro La Ventana; Macizo de Santander; Colombia.

Abstract

The massive occurrence (18 and 52%) of sillimanite (Sil) in schists and quartzites of the Silgará Schists Unit in Cerro La Ventana and La Cuchilla Frailejones sectors is a unique case in the Santander Massif, Eastern Cordillera of the Colombian Andes. Two types of sillimanite were recognized: Sil1 of the fibrolite and/or prismatic variety and Sil2 of the fibrolite variety (which developed in a radial form associated with quartz). The association of the metamorphic peak consists in biotite+muscovite+quartz+plagioclase+sillimanite 1 with the abundant formation of sillimanite of the fibrolite variety allowed determining the following conditions: $T=650-720\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $P=5.5-6.9\text{ Kb}$. These conditions suggest that the rocks suffered a Barrovian metamorphism. Sil 2 was formed in the slightly metamorphic post-peak stage in a weak deformation environment and possibly by the thermal effect produced by the orthogneisses emplacement during the Late Ordovician. The geochemical characteristics evidence a sedimentary pelitic protolith for the schists and quartzites that formed an active continental margin.

Keywords: Sillimanite; Schists; Quartzites; Cerro La Ventana; Santander Massif.

Introducción

La sillimanita es un mineral característico de metapelitas de alto grado de metamorfismo (debido a altas temperaturas), que aparece en la parte alta de la facies anfibolita y es estable en la facies granulita, incluso en condiciones de metamorfismo de temperatura ultra alta (Best, 2003). En este artículo se presentan los resultados de los estudios realizados en rocas

Citación: García-Ramírez CA, Rey-Roman MP, Martínez-Vertel JJ. Sillimanita en esquistos y cuarcitas de los Esquistos del Silgará en el cerro La Ventana, macizo de Santander, Colombia: implicaciones petrológicas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(172):876-891, julio-septiembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1147>

Editor: Carlos Jaramillo

***Correspondencia:**

María Paula Rey-Roman;
maria.reyl@correo.uis.edu.co

Recibido: 27 de enero de 2020

Aceptado: 6 de septiembre de 2020

Publicado: 30 de septiembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

de la unidad Esquistos del Silgará para la detección de la presencia masiva de sillimanita. La aparición inusual de sillimanita (que alcanza un 52 % de contenido modal en algunos litotipos) se registró en la parte central del macizo de Santander (MS), cerca de la localidad de Ranchadero, municipio de Santo Domingo de Silos (Norte de Santander), sector del cerro La Ventana. En esta zona los Esquistos del Silgará se presentan en contacto con la falla de Ventanas y con la unidad Ortoneis.

La sillimanita en la unidad Esquistos del Silgará se ha reportado en los sectores suroeste, central y oriental del macizo de Santander (**Ríos & García, 2001; Ríos, et al., 2003; García, et al., 2005; Castellanos, et al., 2008**). **Ríos & García (2001)** reportaron por primera vez en este macizo la presencia de los tres polimorfos de Al_2SiO_5 (sillimanita, cianita y andalucita) en una metapelita compuesta, además, de cuarzo, plagioclasa, muscovita, biotita y estaurolita como minerales principales, y una cantidad menor de granate y minerales opacos. Los minerales accesorios son la turmalina, el apatito y el circón, en tanto que la clorita y la sericita aparecen como minerales retrógrados. Las relaciones texturales indican la coexistencia de andalucita y cianita, en tanto que la sillimanita se formó en una etapa posterior a expensas del granate. **Ríos, et al. (2003)** definieron en la franja de Pescadero-Aratoca, al suroccidente del macizo, la zona de la sillimanita con la aparición de este mineral en esquistos con cuarzo, estaurolita, granate, muscovita y biotita. La sillimanita está asociada con el cuarzo y la muscovita como agregados de fibrolita. El granate y la estaurolita presentan evidencias de disolución. Otros minerales son la turmalina, el apatito, el circón y los opacos. Las temperaturas (T) obtenidas en estas rocas fueron de 660 a 700 °C y la presión (P), de 5,5 a 7,2 kb.

Hacia el norte y noreste de la cuchilla de Frailejones, **García, et al. (2005)** reportaron la presencia de sillimanita de la variedad fibrolita y prismática. **Castellanos, et al. (2008)** describieron en los esquistos pelíticos aflorantes al suroeste de su área de estudio una asociación mineral de cuarzo, plagioclasa, biotita y muscovita con sillimanita de la variedad fibrolita, la cual se desarrolla a la manera de agregados fibrosos, reemplazando la biotita, la mica blanca y la cianita. También ocurre en reemplazo de los bordes de la estaurolita o como inclusión en el cuarzo, la plagioclasa y las micas.

Ríos y Castellanos (2015) estudiaron una secuencia metamórfica de los Esquistos del Silgará en la región de Hacarí, Norte de Santander, estableciendo un metamorfismo de tipo Buchan por la presencia de andalucita, cordierita y sillimanita como la fase de más alta temperatura. Esta secuencia estaría relacionada con el emplazamiento de plutones del Jurásico-Triásico.

Se puede afirmar, entonces, que la sillimanita es un mineral común en metapelitas de la unidad Esquistos del Silgará en diferentes sectores del macizo de Santander y bajo condiciones de facies anfíbolita. Sin embargo, la presencia masiva de sillimanita, que en algunas rocas alcanza hasta el 52 % de contenido, en el cerro La Ventana y en cuchilla de Frailejones es única; esta presencia masiva también se registra en franjas delgadas de metapelitas bordeadas por cuerpos de ortoneis. Con el propósito de estudiar este mineral, se adelantaron trabajos de campo de exploración petrográfica y geoquímica, análisis con el microscopio electrónico de barrido (SEM) y cálculos termobarométricos mediante pseudosecciones.

Marco geológico

El macizo de Santander está localizado al norte de la cordillera Oriental de los Andes colombianos y forma el margen sureste del Bloque Triangular de Maracaibo. Se caracteriza por ser estructuralmente un bloque levantado, limitado en el margen occidental por el Sistema de Fallas Bucaramanga – Santa Marta con una tendencia norte-norte-occidente (**Van Der Lelij, et al., 2015**), y en el margen oriental por el Sistema de Fallas Pamplona – Cubogón – Mercedes (**García, et al., 2005**). Las foliaciones en el macizo de Santander presentan una tendencia norte-sur, que tiende a ser paralela al eje de la cordillera Oriental (**García, et al., 2005**).

El basamento cristalino del macizo de Santander comprende rocas metamórficas de origen sedimentario e ígneo de edad entre el Precámbrico y Paleozoico, intruidas por rocas ígneas de edad correspondiente al Silúrico, Triásico a Cretácico y Mioceno (**Goldsmith, et al.**, 1971 y **Mantilla, et al.**, 2013). Las unidades metamórficas del macizo son: Neis de Bucaramanga; Esquistos del Silgará (*s.s.*); Esquistos del Chicamocha, nombre asignado por **Mantilla, et al.**, 2016 a los esquistos aflorantes al suroccidente del macizo en la franja Pescadero-Aratoca; Ortoneis, y Filitas de San Pedro (**Ward, et al.**, 1973; **Royero & Clavijo**, 2001; **Mantilla, et al.**, 2016). Otros autores también han reportado rocas de bajo grado de metamorfismo, como las metasedimentitas de Guaca – La Virgen (**Royero & Clavijo**, 2001), la Formación Floresta Metamorfoseado y la Mogotes (**Moreno, et al.**, 2005). La descripción detallada de estas unidades metamórficas se ha abordado en estudios como el de **García, et al.** (2005), **Mantilla, et al.** (2016), **García, et al.** (2017), y **García, et al.** (2019), entre otros.

La zona de estudio está localizada cerca al corregimiento Ranchadero, del departamento de Norte de Santander, en la cuchilla de Frailejones y el cerro La Ventana (**Figura 1**). En este sector afloran rocas de la unidad Esquistos del Silgará a manera de dos franjas alargadas en dirección noreste (NE). Estas rocas están en contacto fallado cubierto (dos fallas inferidas y la falla de Ventanas) con la unidad Ortoneis siguiendo la dirección noreste de las franjas alargadas.

Metodología

El trabajo de campo consistió en la descripción de la presencia de la sillimanita en rocas de los Esquistos del Silgará. Se estudiaron, asimismo, las características estructurales, texturales y mineralógicas y la relación de campo con la unidad Ortoneis. Los estudios incluyeron muestreos (**Figura 1**).

Los estudios petrográficos se adelantaron en el laboratorio de petrografía de la Universidad Industrial de Santander con el microscopio triocular Leica DM750POL. Las abreviaturas usadas en la descripción de los minerales son las propuestas por la subcomisión en rocas metamórficas (SCMR 2007) de la Unión Internacional de Geociencias (**Siivola, et al.**, 2007). Los análisis geoquímicos se hicieron en los laboratorios de Bureau Veritas en Canadá. Los elementos mayores se determinaron por fluorescencia de rayos X. Las trazas y tierras raras se analizaron mediante espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El límite de detección para los elementos mayores se fijó en 0,01 % de peso y 0,1 y 0,01 ppm para las trazas y tierras raras. El laboratorio usó las muestras estándar STD OREAS45E, STD OREAS25A-4A, STD OREAS184, STD SY-4(D), STD OREAS45E, STD OREAS25A-4A, y QUARTZ_MDE, QUARTZ_MDE, como blancos. Los datos obtenidos se procesaron con el programa Geochemical Data Toolkit (GCDkit), versión 6.0 (**Janoušek, et al.**, 2019) de descarga gratuita en <http://www.gcdkit.org/download>.

Los análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) se realizaron en un equipo Field Emission Gun (FEG) (Quanta™ EG 650) en el Parque Tecnológico de Guatiguará-UIS. Las imágenes se tomaron en alto vacío y voltaje de aceleración de 20 kV. Las imágenes de electrones secundarios se obtuvieron con el detector Everhart Thornley (ETD) para observar la morfología, y las de electrones retrodispersados con un detector de tipo SSD para observar variaciones de composición. Los datos químicos semicuantitativos se analizaron con un voltaje de aceleración de 20Kv y un detector Edax Apollo X con una resolución de 126.1 eV (en. Mn K α) para los análisis de espectroscopía por energía de dispersión con el programa EDX Genesis.

Los cálculos termobarométricos se hicieron con el método de pseudosección mediante el programa Theriak-Domino, v. 04/02/2017 (**Capitani & Petrakakis**, 2010) y la base de datos termodinámica JUN92d.bs de **Berman** (1988). Se construyeron los diagramas para el sistema TiMnNKFCMASH (TiO₂, MnO, Na₂O, K₂O, FeO, CaO, MgO, Al₂O₃, SiO₂ y H₂O).

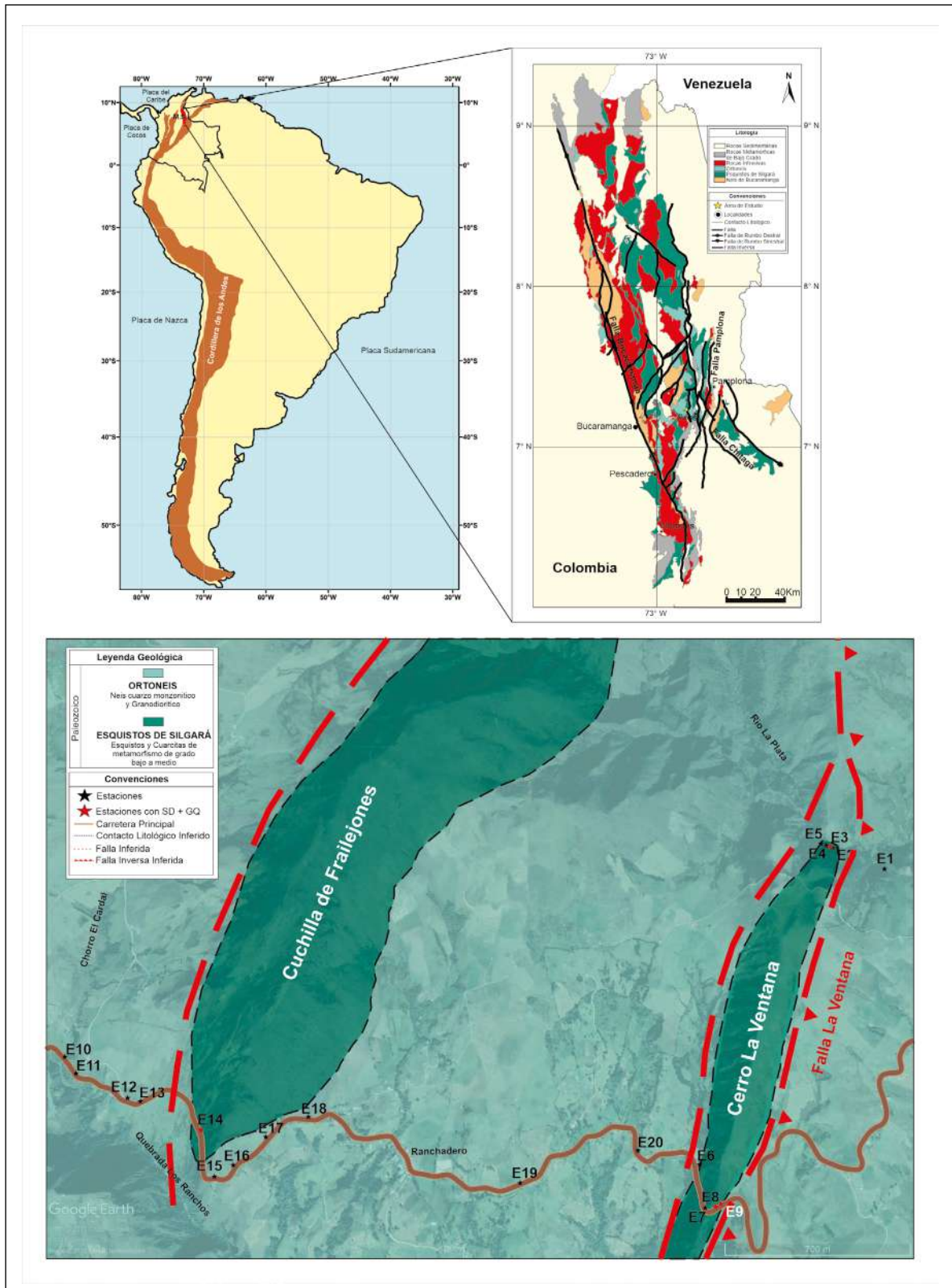


Figura 1. a) Localización geográfica del macizo de Santander en los Andes colombianos. b) Mapa geológico simplificado del macizo de Santander indicando la zona de estudio (modificado de **García, et al., 2019**). c) Mapa geológico de la zona de estudio (base topográfica modificada de **Google Earth, 2019**).

Petrografía

Los Esquistos del Silgará están constituidos por rocas metapelíticas que afloran en los denominados cerro La Ventana y cuchilla de Frailejones. En las márgenes del río La Plata, en el cerro La Ventana, afloran cuarcitas muscovíticas con sillimanita, esquistos sillimaníticos y esquistos muscovíticos cuarzosos con cianita y sillimanita, y en la cuchilla de Frailejones predominan esquistos cuarzo-micáceos con sillimanita. La presencia de sillimanita en esta unidad ha sido reportada por **García, et al.** (2005) en las muestras PCM-965 y PCM-972 al norte de la cuchilla de Frailejones. En este estudio se diferencian dos (2) tipos de sillimanita: Sil1, de la variedad fibrolita o prismática (resultado del reemplazo de la biotita) y Sil2, de la variedad fibrolita (que se desarrolla en forma radial desde el núcleo de cuarzo).

Las cuarcitas muscovíticas con sillimanita (muestra E3-M1) son de color gris a blanco con tonalidades amarillas y grano de tamaño medio. Se caracterizan por exhibir Sil2 en el núcleo de individuos de cuarzo, son débilmente foliadas y su asociación mineral es: cuarzo+muscovita+biotita+sillimanita2; textura principal lepidogranoblástica.

Los esquistos muscovítico-cuarzosos con cianita y sillimanita (muestra E8-M1) son de color gris con tonalidades amarillas y tamaño de grano fino a medio. Se caracterizan por la coexistencia de cianita y sillimanita asociadas con muscovita que define la foliación de la roca. La textura principal es lepidogranoblástica y su asociación mineral es: cianita+sillimanita1+cuarzo+muscovita, y posteriormente sillimanita2 (tardía).

Los esquistos sillimaníticos (muestra E9-M1) son de color marrón claro con bandas grises y blancas de sillimanita (fibrolita que reemplaza biotita), y tamaño de grano muy fino. Su foliación S_n está definida por los agregados de biotita y sillimanita. La textura principal de estas rocas es granolepidoblástica y su asociación mineral es: biotita+muscovita+cuarzo+plagioclasa+sillimanita1.

Los esquistos cuarzo-micáceos con sillimanita (muestra E14-M1) son de color gris oscuro con bandas blancas de sillimanita (fibrolita que reemplaza la biotita) y tamaño de grano muy fino a fino. Presenta evidencias de disolución en granate y biotita. La textura principal es granolepidoblástica y la textura local es poiquiloblástica. La asociación mineral es: cuarzo+biotita+muscovita+plagioclasa+granate+sillimanita1.

Litológicamente, el ortoneis está compuesto principalmente por rocas cuarzo-feldespáticas y rocas metapelíticas. En el flanco oeste de la cuchilla de Frailejones predominan ortoneises cuarzo-feldespáticos con biotita y ortoneises biotíticos con hornblenda, en tanto que en el flanco este los ortoneises son muscovíticos; la zona entre la cuchilla de Frailejones y el cerro La Ventana está constituida por ortoneises biotíticos.

Los ortoneises cuarzo-feldespáticos con biotita son de color rosado con tonalidades de grisáceas a marrón claro y tamaño de grano medio a grueso; se caracterizan por estar débilmente foliados y su asociación mineral es: cuarzo+ortoclasa+plagioclasa+biotita; la textura principal de estas rocas es lepidogranoblástica y localmente tiene texturas peritítica y mirmequítica.

Los ortoneises cuarzo-feldespáticos con hornblenda son de color rosado con porfiroblastos de color negro a verde oscuro, y el tamaño de grano varía de medio a grueso; son débilmente foliados y su asociación mineral es: ortoclasa+cuarzo+plagioclasa+hornblenda+biotita; es común encontrar los cristales de hornblenda acompañados de titanita y rodeados por biotita. La textura principal de esta roca es lepidogranoblástica y localmente son de textura nematogranoblástica.

Los ortoneises muscovíticos son de color rosado con tonalidades grisáceas y porfiroblastos negros, tamaño de grano variable de medio a grueso y localmente exhibe tamaño de grano fino. A diferencia de los ortoneises cuarzo-feldespáticos, estos se caracterizan por presentar una foliación S_n bien desarrollada. Su asociación mineral es: cuarzo+muscovita+biotita±plagioclasa. La presencia de muscovita en estas rocas genera tonalidades grisáceas en los ejemplares y su desarrollo puede asociarse con la intrusión de un cuerpo diferente de características más básicas (enriquecido en Al y K).

Geoquímica

La geoquímica de roca total en la unidad Esquistos del Silgará se determinó en tres muestras: esquisto muscovítico cuarzoso con cianita y sillimanita (E8-M1), esquisto sillimanítico (E9-M1) y esquisto cuarzo-micáceo con sillimanita (E14-M1). La composición geoquímica de estas rocas se presenta en la **tabla 1**. Los esquistos de las muestras E9-M1 y E14-M1 corresponden a metapelitas muy enriquecidas en Al_2O_3 (22,39 y 20,01 wt.%) con cantidades muy similares de SiO_2 . La muestra E14-M1 está más enriquecida con Fe_2O_3 total, MgO y K_2O (11,52, 3,25 y 5,02 wt.%, respectivamente) como resultado de los mayores contenidos de biotita, muscovita y granate (**Tabla 2**). El esquisto muscovítico cuarzoso con cianita y sillimanita de la muestra E8-M1 es más cuarzoso y presenta contenidos altos (83,39 wt.%) de SiO_2 y bajos (6,38 wt.%) de Al_2O_3 .

Las características geoquímicas de las rocas metasedimentarias pueden emplearse para conocer el grado de meteorización de la roca parental y la proveniencia y el ambiente tectónico de formación. Para conocer la paleometeorización se usó el índice químico de alteración (CIA= $[Al_2O_3/(Al_2O_3+CaO+Na_2O+K_2O)] \times 100$) de **Nesbitt & Young** (1982). Los esquistos estudiados evidencian un intemperismo alto del protolito con índice de alteración de 77,23 (muestra E14-M1), 79,85 (muestra E8-M1) y 84,91 (muestra E9-M1), valores con tendencias similares (CIA=75,30) al promedio de las rocas sedimentarias posarqueanas de Australia (*Post-Archaean Average Australian Shale*, PAAS) (**Taylor & McLennan**, 1985), pero muy superiores al de la corteza superior continental (*Upper Continental Crust*, UCC) de **Taylor & McLennan**, 1981 (CIA=56,93) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición química de los Esquistos del Silgará. Los mayores se expresan en porcentaje de peso de óxidos (%) y los trazas en partes por millón (ppm).

Muestra	E8-M1	E9-M1	E14-M1	PAAS	UCC
Litología	Esquisto muscovítico cuarzoso con cianita y sillimanita	Esquisto sillimanítico	Esquisto cuarzo-micáceo con sillimanita		
SiO₂	83,39	58,73	56,00	62,80	66,00
TiO₂	0,50	0,90	1,47	1,00	0,50
Al₂O₃	6,38	22,39	20,01	18,90	15,20
Fe₂O₃	6,12	8,17	11,52	7,22	4,50
MnO	0,02	0,08	0,21	0,11	0,08
MgO	0,13	2,37	3,25	2,20	2,20
CaO	0,02	0,03	0,22	1,30	4,20
Na₂O	0,17	0,12	0,66	1,20	3,90
K₂O	1,42	3,83	5,02	3,70	3,40
P₂O₅	0,02	0,13	0,08	0,16	0,17
Loi	0,8	2,9	1,6	6,00	
Cr₂O₃	0,01	0,01	0,01		
Total	98,98	99,66	100,05	104,59	100,15
Mo	0,06	0,17	0,36		
Ni	13,6	39,8	53,3	55,00	44,00
Zn	5,1	98,4	122,3	85,00	71,00
Cu	1,6	37,0	20,9	50,00	25,00
As	3,6	2,3	1,5		1,50
Cd	<0,02	0,10	0,11		
Sb	0,04	<0,02	<0,02		0,20
Bi	0,06	0,18	0,34		

Ag	<20	30	<20		
Tl	0,37	1,23	1,27		
Se	<0,3	<0,3	<0,3		
Ga	6,94	22,05	25,77		
Sc	5,2	16,2	23,4	16,00	13,60
V	35	127	158	150,00	107,00
W	0,8	0,4	2,0		
Co	2,0	14,0	26,9	23,00	17,00
Cs	3,4	17,7	7,9	15,00	4,60
Ba	175	530	682	650,00	550,00
Be	<1	5	1		
Rb	74,5	149,2	200,9	160,00	112,00
Sn	0,9	2,5	4,2		
Th	7,4	11,1	17,6	14,60	10,70
Nb	6,13	12,01	24,23	19,00	12,00
Ta	0,3	0,9	1,7		1,00
Sr	73	46	32	200,00	350,00
Zr	1,7	0,8	1,7	210,00	190,00
Hf	0,06	0,04	0,07	5,00	5,80
Y	6,2	6,4	12,8	27,00	22,00
Pb	10,61	43,70	14,72		17,00
U	1,4	6,1	3,7	3,10	2,80
La	19,2	18,6	42,0	38,20	30,00
Ce	39,84	43,85	91,10	80,00	64,00
Pr	5,2	5,8	11,8	8,80	7,10
Nd	18,0	20,7	40,5	32,00	26,00
Sm	4,3	4,7	8,2	5,60	4,50
Eu	0,8	1,1	1,5	1,10	0,88
Gd	2,9	3,8	6,4	4,70	3,80
Tb	0,3	0,5	0,7	0,77	0,64
Dy	2,0	2,5	3,6	4,68	3,50
Ho	0,3	0,4	0,6	0,99	0,80
Er	0,6	0,9	1,2	2,85	2,30
Tm	<0,1	0,1	0,2	0,40	0,33
Yb	0,4	0,8	1,4	2,80	2,20
Lu	<0,1	0,1	0,2	0,43	0,32
Sum REE	93,84	103,85	209,4	183,32	146,37
CIA	79,85	84,91	77,23	75,30	56,93
LaN/YbN	32,00	15,50	20,00	910	9,09
LaN/SmN	2,75	2,43	3,15	4,20	4,10
CeN/YbN	25,33	13,94	16,55	7,27	7,40
CeN/SmN	2,17	2,19	2,61	3,35	3,34
EuN/YbN	5,71	3,93	3,06	1,12	1,14

CIA = $[\text{Al}_2\text{O}_3 / (\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{CaO} + \text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O})] \times 100$; PAAS: promedio de rocas posarqueanas de Australia; UCC: corteza superior continental. Los valores que aparecen con signo < están por debajo del límite de detección.

Tabla 2. Localización y composición mineralógica de las rocas representativas de la unidad Esquistos del Silgará

Coordenadas*		Nombre de la roca	N° de muestra	Composición mineral (%)											
Latitud	Longitud			Qtz	Pl	Bt	Ms	Sil	Ky	Ttn	Tur	Grt	Ox	Op	Zrn
7° 15' 08,6"	72° 47' 49,9"	Cuarcita muscovítica con sillimanita	E3-M1	76		0,6	14	6				0,2	3	0,2	
7° 14' 19,9"	72° 48' 09,8"	Esquisto muscovítico cuarzoso con cianita y sillimanita	E8-M1	61		2	15	5	8	1	2		5	1	
7° 14' 20,2"	72° 48' 09,2"	Esquisto sillimanítico	E9-M1	12	5 (ser)	26	1	52				4		1	
7° 14' 29,1"	72° 49' 15,1"	Esquisto cuarzo micáceo con sillimanita	E14-M1	20	0,6	35	16	18				6	0,4	3	1

Qtz: cuarzo; Pl: plagioclasa; Bt: biotita; Ms: muscovita; Ttn: titanita; Tur: turmalina; Grt: granate; Ox: óxidos; Op: opacos; Zrn: zircón.

*Coordenadas del sistema Gauss, Datum Bogotá Observatory, Origen Bogotá

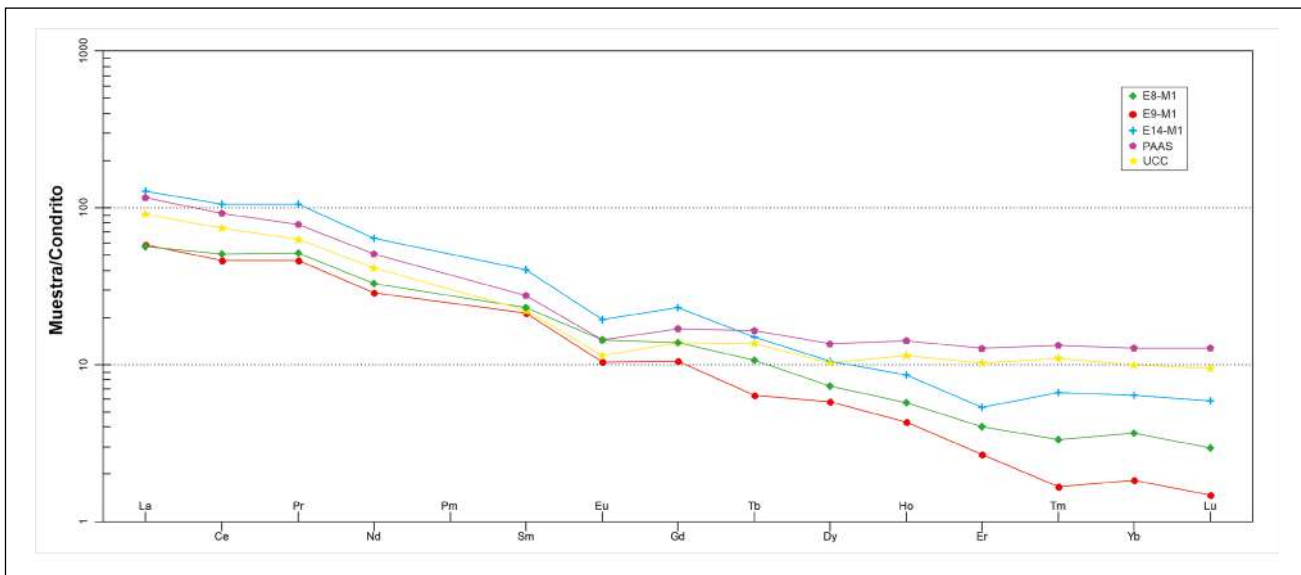


Figura 2. Diagrama REE de las muestras analizadas normalizado al condrito de Nakamura (1974)

Los elementos de las tierras (REE) presentan un comportamiento inmóvil durante los procesos de metamorfismo, razón por la cual guardan la signatura isotópica de la roca fuente. Los contenidos de REE analizados se normalizaron al condrito de Nakamura (1974) (Figura 2). También se presentan los patrones de referencia usados en rocas meta-sedimentarias como son el contenido de la UCC de Taylor & McLennan (1981) y el contenido promedio de las rocas PAAS de McLennan (1989). Las muestras analizadas evidenciaron un empobrecimiento en REE con respecto a las PAAS y la UCC. Solo la muestra E14-M1 presentó contenidos más altos en REE ligeras que las de PAAS y UCC. Las rocas estudiadas muestran una anomalía negativa de Eu con una relación Eu/Eu^* de 3,06-5,71 (Tabla 1). El contenido total de REE en las metapelitas (muestras E8-M1 y E9-M1) es, respectivamente, de 93,84 ppm y 103,85 ppm, inferior a la corteza superior ($\Sigma REE = 146,37$ ppm) y el PAAS ($\Sigma REE = 183,32$ ppm). La muestra E14-M1 presenta valores de $\Sigma REE = 209$ ppm superiores a la UCC y el PAAS.

Las relaciones Ta/Yb y Th/Yb (muestra E8-M1= 0,75 y 18,5; muestra E9-M1= 1,12 y 13,87, y muestra E14-M1= 1,21 y 12,57) indican que el ambiente tectónico del protolito de los esquistos estudiados corresponde a un margen continental activo.

Presencia de la sillimanita

La sillimanita ocurre de dos formas: 1) agregados fibrosos o individuos prismáticos siguiendo la dirección de la foliación (Sil1), y 2) agregados fibroso-radiales (Sil2).

Sillimanita1. Ocurre como variedad de la fibrolita (agregados fibrosos alargados) o individuos prismáticos que forman bandas y están orientados según la dirección de la foliación principal de la roca. Normalmente, la Sil1 (**Figura 3a-d**) está presente en esquistos muscovítico-cuarzosos con cianita y sillimanita (muestra E8-M1), en esquistos sillimaníticos (muestra E9-M1) y en esquistos cuarzo-micáceos con sillimanita (muestra E14-M1).

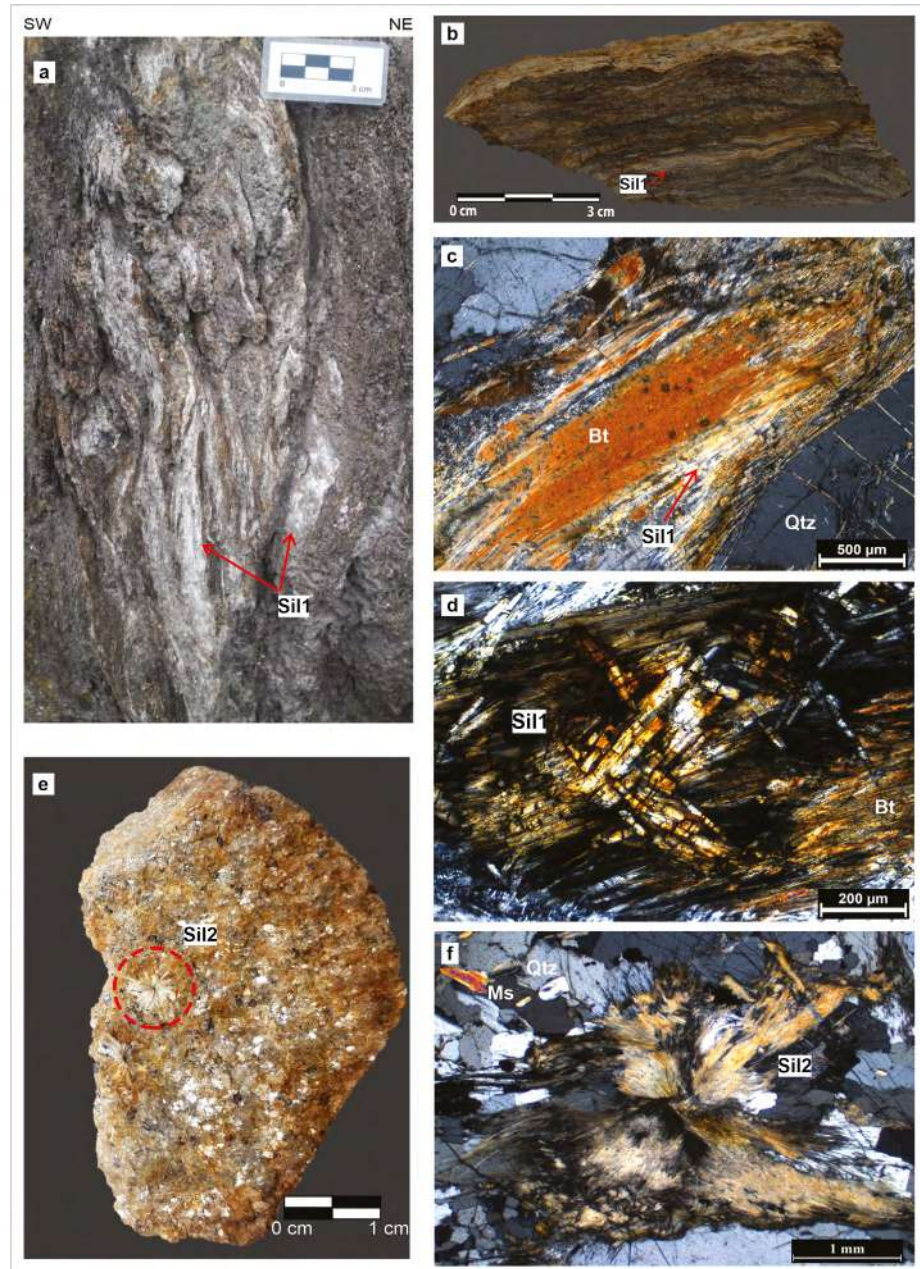


Figura 3. Presencia de sillimanita. **a-b)** Sillimanita1 en afloramiento y muestra de mano; **c)** fibrolita en reemplazo de biotita; **d)** sillimanita1 de variedad prismática corta; **e-f)** sillimanita2 en muestra de mano y bajo el microscopio

La Sill1 ocurre en reemplazo de biotita; este reemplazo es más intenso en los planos de exfoliación o en los bordes de la biotita (**Figura 3c**); cuando el reemplazo es completo, la sillimanita de variedad prismática corta tiene un tamaño de grano muy fino (20-40 μm), en tanto que la prismática alargada tiene un tamaño de grano muy fino a medio (10-80 μm y 40-86 μm de ancho y largo, respectivamente) (**Figura 3d**). La asociación inicial de cianita+biotita+muscovita+cuarzo indica condiciones del pico bórico de metamorfismo. El aumento de la temperatura facilita el reemplazo de biotita por sillimanita y, como resultado, la nueva asociación estable es de cianita+sillimanita+muscovita+cuarzo, la cual representa condiciones del pico térmico. En estas rocas también se puede presentar la sillimanita2 en forma de agregados fibrosos radiales sin orientación, asociados espacialmente con el cuarzo (ver la descripción de la sillimanita2)

Sillimanita2. Se presenta de forma radial con tonalidades blancas y amarillas asociada con cuarzo. Se puede observar esta variedad en rocas metapelíticas del cerro La Ventana: cuarcitas muscovíticas con sillimanita (muestra E3-M1), esquistos muscovíticos cuarzosos con cianita y sillimanita (muestra E8-M1).

La sillimanita2 ocurre en forma de agregados fibroso-radiales en cuarzo o zonas alejadas a este (**Figura 3f**). La disposición de estos agregados no concuerda con la foliación existente en la roca, incluso si la roca contiene también sillimanita1 (muestras E8-M1, E9-M1 y E14-M1). Por ello, la presencia de la sillimanita2 indicaría un evento termal superpuesto al metamorfismo barroviense.

En la **figura 4** se presentan imágenes de electrones retrodispersados y espectros EDS de variedades morfológicas de sillimanita.

Condiciones de presión y temperatura del metamorfismo

Las condiciones de presión y temperatura (P-T) de las rocas estudiadas se determinaron mediante el programa Theriak-Domino, v. 04/02/2017 (**Capitani & Petrakakis, 2010**) usando la base termodinámica JUN92d.bs de **Berman (1988)**. Se construyó el diagrama isoquímico (pseudosección) de la muestra E9-M1 para el sistema TiMnNKFCMASH (TiO_2 , MnO, Na_2O , K_2O , FeO, CaO, MgO, Al_2O_3 , SiO_2 y H_2O).

La muestra E9-M1 es un esquistos sillimanítico con asociación del pico metamórfico consistente en biotita+muscovita+cuarzo+plagioclasa+sillimanita1, con una formación de abundante sillimanita de la variedad fibrolita, lo que indica el pico térmico. La pseudosección obtenida (**Figura 5**) muestra un campo equivalente con la descripción petrográfica, lo que sugiere unas condiciones de $T=650\text{-}720^\circ\text{C}$ y $P=5,5\text{-}6,9\text{Kb}$.

Discusión

La presencia de abundante de sillimanita con variada morfología en esquistos y cuarcitas de la unidad Esquistos del Silgará en forma de franjas delgadas, bordeadas por ortoneis plantea interrogantes acerca del metamorfismo, sus condiciones de presión y temperatura y las posibles reacciones que formaron la sillimanita. La presencia de dos tipos de sillimanita, sillimanita1 (variedad de fibrolita o prismática) y sillimanita2 (fibroso-radial) indicaría dos posibles eventos metamórficos: (i) un metamorfismo regional barroviense (presiones intermedias, altas temperaturas), que ha sido reportado en la zona de estudio (**García, et al., 2005; Castellanos, et al., 2008**), y (ii) un metamorfismo regional o posiblemente de contacto (presiones bajas, altas temperaturas).

En el macizo de Santander la presencia de la sillimanita1 en los Esquistos del Silgará ha sido reportada en el sector suroccidental por **Ríos & García (2001)** y **Ríos, et al. (2003)** y en el central y el nororiental por **García, et al. (2005)** y **Castellanos, et al. (2008)**. En este tipo de sillimanita es clara la relación con el metamorfismo barroviense, que ha sido definido como el principal evento metamórfico de esta zona durante el Ordovícico Temprano, 471 y 479 Ma (**Mantilla, et al., 2012; Van der Lelij, et al., 2013; García, et al., 2017**). Esta sillimanita ocurre en equilibrio con la cianita como es el caso de la muestra E8-M1. La sillimanita2 se presenta algunas veces en rocas donde aparece también la sillimanita1; sin embargo, las relaciones texturales evidencian un origen diferente al metamorfismo barroviense para la sillimanita2.

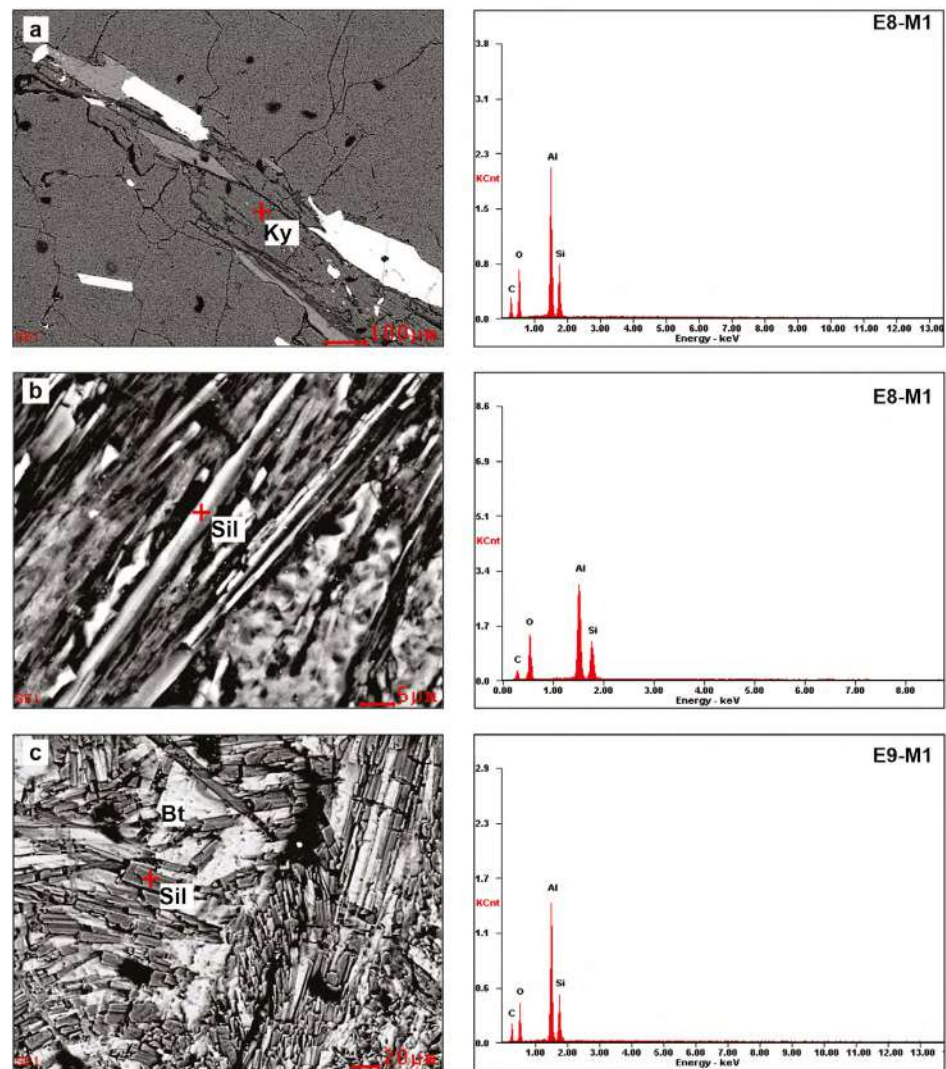


Figura 4. Imágenes de electrones retrodispersados de cianita (a) y su espectro EDS a la derecha y sillimanita fibrolítica (b) y prismática (c).

La formación de sillimanita1 podría haberse dado mediante las siguientes reacciones:

1) Granate+muscovita = sillimanita+biotita+cuarzo (Zhao & Cawood, 1999). Las evidencias petrográficas que respaldan este planteamiento son la presencia de relictos de granate con evidencias de disolución (bordes corroídos), inclusiones de cuarzo y coronas de reacción compuestas por biotita2 (Figura 6a-b) en esquistos de cuarzo micáceos con sillimanita (muestra E14-M1).

2) Reacción polimórfica con cianita, aunque no de forma directa, tal como lo indican Chinner (1961), Kerrick (1990) y Foster (1991). Estos autores mencionan que la nucleación y crecimiento de la sillimanita comúnmente se asocia con la biotita, que es un mineral catalizador que acelera la reacción formadora de sillimanita en metapelitas de alto grado.

Evidencias como el reemplazo de cianita por muscovita y de sillimanita por biotita en un esquistos muscovítico cuarzoso con cianita y sillimanita (muestra E8-M1), podrían respaldar la formación de la sillimanita a partir de cianita con biotita y muscovita como fases intermedias de la reacción (Foster, 1991). Las evidencias petrográficas se muestran en la figura 6c-d y su interpretación según Foster (1991) en la figura 7. La desestabilización de cianita con formación de sillimanita1 forma parte de la secuencia progradada del

metamorfismo barroviense. Las condiciones de este pico metamórfico fueron $T=650-720^{\circ}\text{C}$ y $P=5,5-6,9\text{Kb}$ para la muestra E9-M1 (Figura 5), que en buena parte coinciden con las reportadas por **García, et al.** (2005) para este sector del macizo de Santander.

Resulta más problemático explicar la presencia de la sillimanita de morfología fibroso radial sin orientación preferencial asociada solo con cuarzo. La presencia de este tipo de sillimanita no ha sido reportada en estudios anteriores en otros sectores del macizo de Santander.

A nivel mundial la presencia de sillimanita con características muy similares ha sido relacionada con eventos termales, ya sea por metamorfismo de contacto (**Smith, 1945; Hash, et al., 1951; Douglass & Brew, 1985; Kerrick, 1987; Dusel-Bacon, et al., 1996; Stowell & Crawford, 2000; Stowell & Tinkham, 2003; Homam & Ghaemi, 2008**) o metamorfismo regional de tipo Buchan (**Miyashiro, 1994; Best, 2003; Wang, et al., 2013**). Según **Best (2003)**, en el metamorfismo regional de tipo Buchan hay una clara similitud con las asociaciones de minerales pelíticos en aureolas metamórficas de contacto desarrolladas alrededor de intrusiones magmáticas en la corteza superficial (<10 km).

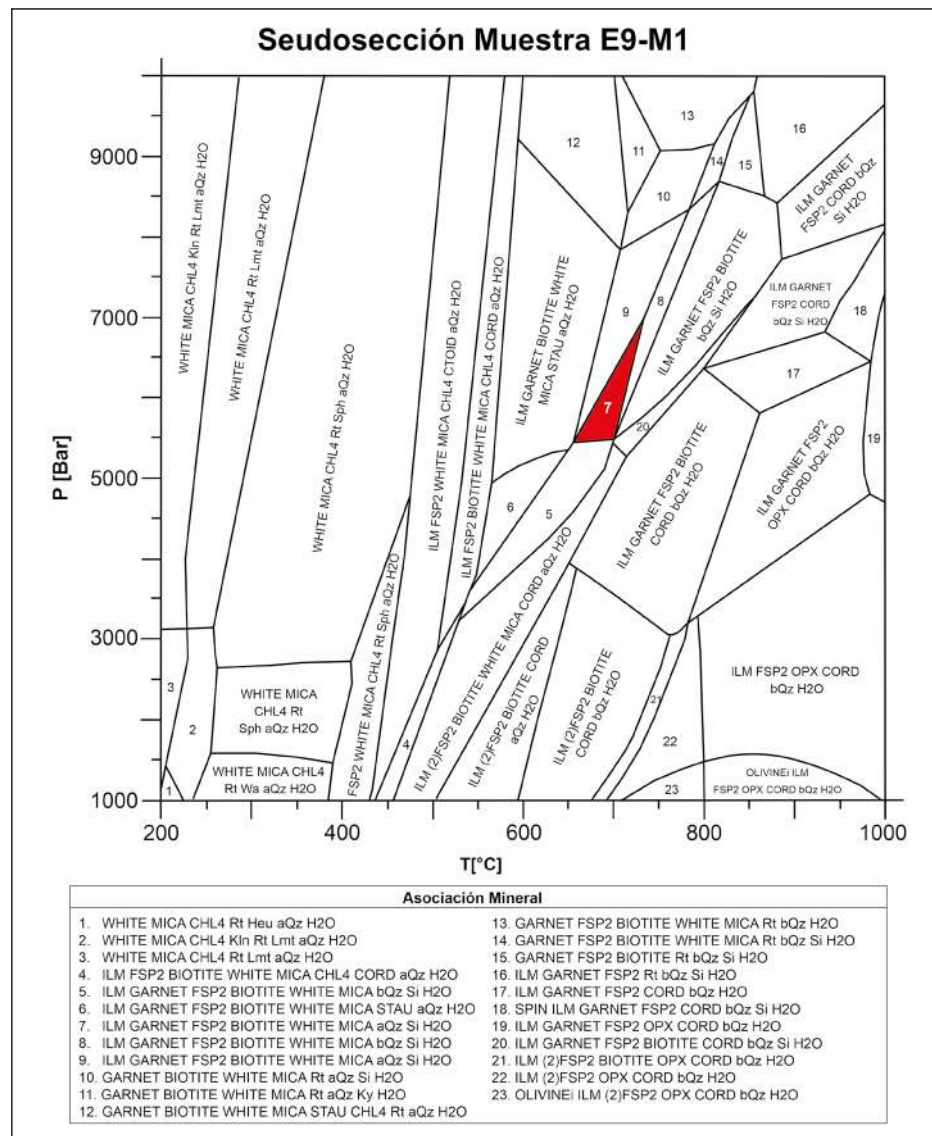


Figura 5. Pseudosección del esquistillo sillimanítico (muestra E9-M1)

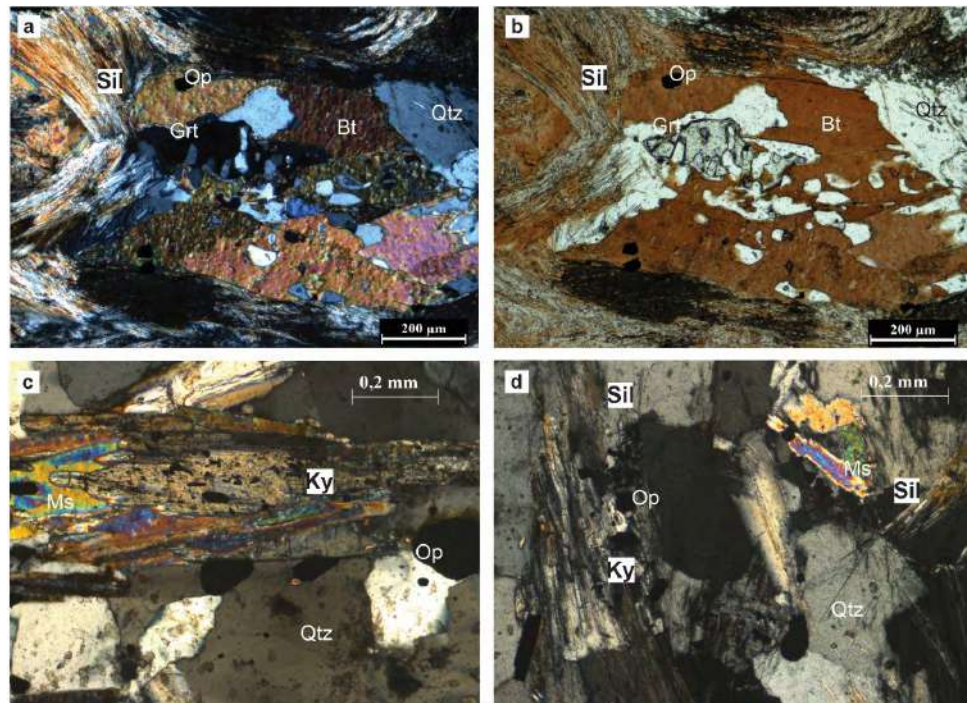


Figura 6. a-b) Evidencias de disolución de granate y resultados de la posible reacción en esquistos de cuarzo micáceo con sillimanita (muestra E14-M1); microfotografía en nicols cruzados y paralelos. **c-d)** Evidencias texturales de reacciones locales de la reacción polimórfica cianita=sillimanita en esquistos muscovíticos cuarzosos con cianita y sillimanita (muestra E8-M1); microfotografía en nicols cruzados

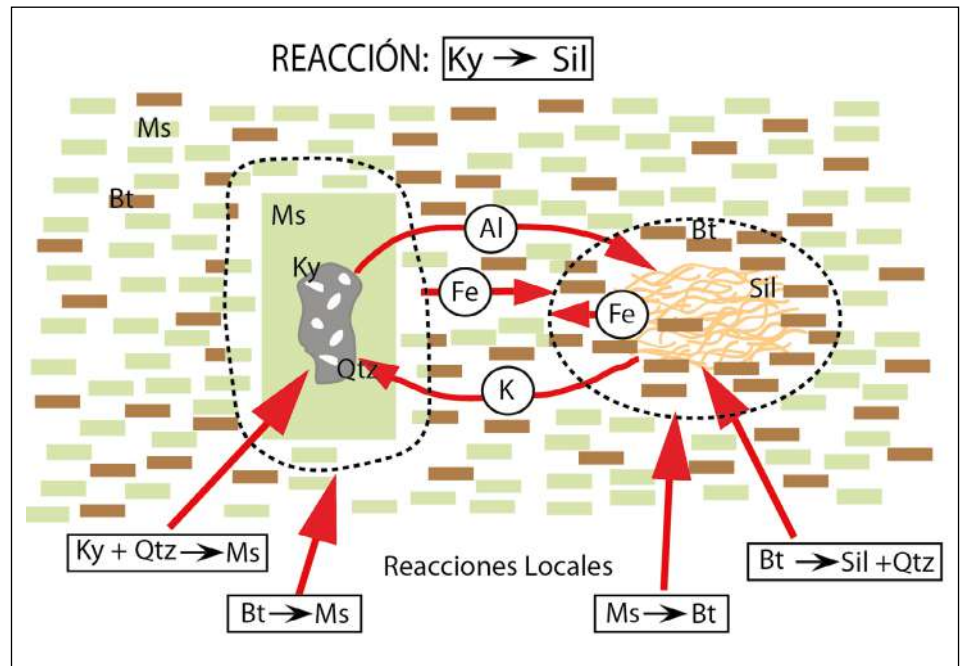


Figura 7. Mecanismos de reacción usando mica como catalizador de la reacción cianita = sillimanita. El material transportado de Fe, Al y K se muestra con las flechas entre las dos reacciones locales. Modificado de Foster (1991)

La hipótesis de un evento termal a bajas presiones se soporta también en las variaciones en el tamaño de grano del cuarzo. Los resultados de esta medición en cuarcita muscovítica con sillimanita (muestra E3-M1), esquistos muscovíticos cuarzosos con cianita y sillimanita (muestra E8-M1) y esquistos cuarzo micáceos con sillimanita (muestra E14-M1) evidencian dos poblaciones: la primera varía entre 0,08-2,05 mm y la segunda, entre 1,83-4,45 mm. La población de mayor tamaño de cuarzo evidencia un posible proceso de recristalización como reflejo de un evento termal.

Como se mencionó en el marco geológico, las franjas de Esquistos del Silgará se encuentran rodeadas de cuerpos de ortoneis. El cuerpo de ortoneis localizado al oeste se caracteriza por presentar una foliación débil en comparación con los ortoneis situados más al este. En el macizo de Santander se han reportado ortoneis del Ordovícico Temprano con edades entre 471 y 479 Ma (Mantilla, *et al.*, 2012; Van der Lelij, *et al.*, 2013; García, *et al.*, 2017), emplazados de forma sintectónica durante el pico metamórfico de los Esquistos del Silgará y otros más jóvenes, de 451,5 Ma, del Ordovícico Tardío, reportados por Van der Lelij (2013). Las características de estos últimos no se han descrito. Se considera que corresponden a ortoneis con foliación débil y estructura masiva que afloran en el contacto oeste con los Esquistos del Silgará del presente estudio.

Estas relaciones de campo, las variedades de sillimanita y su presencia apuntan a un evento termal ocasionado por el emplazamiento de un ortoneis más joven (Ordovícico Tardío) en la etapa ligeramente posterior al pico en un ambiente con deformación menos intensa.

Conclusiones

Las rocas de la unidad Esquistos del Silgará en los sectores del cerro La Ventana y la cuchilla Frailejones presentó cantidades considerables de sillimanita, entre 18 y 52 %. Según la textura y la asociación mineralógica se encontraron dos tipos de sillimanita en la zona de estudio. La sillimanita1 en forma de agregados fibrosos o prismáticos asociada con biotita, granate, muscovita, cianita y plagioclasa, en tanto que la sillimanita2 aparece en forma de agregados fibroso-radiales asociados con cuarzo.

El pico de metamorfismo barroviense se evidencia por la asociación $Bt+Ms+Pl+Qtz+Sill$ en condiciones de temperatura entre 650 y 720°C y presiones entre 5,5 y 6,9Kb. El reemplazo de cianita por muscovita y de sillimanita por biotita en un esquistos muscovítico cuarzoso con cianita y sillimanita (muestra E8-M1) podría aportar evidencias a favor de la formación de la sillimanita a partir de cianita, siendo la biotita y la muscovita catalizadores de esta reacción.

La sillimanita2 se formó después del pico barroviense durante un evento termal, posiblemente facilitado por el emplazamiento ligeramente posterior "sintectónico" de ortoneis del Ordovícico Superior.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al laboratorio de microscopía electrónica del Parque Tecnológico de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander por la colaboración brindada en el uso del microscopio electrónico de barrido.

Contribución de los autores

CAGR realizó el análisis geoquímico, revisión petrográfica y estudios termobarométricos; MPRR y JJMV realizaron la recolección de muestras y datos en campo, la caracterización y descripción de la sillimanita

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con respecto a la información presentada en este trabajo.

Referencias

- Berman, R. G.** (1988). Internally-consistent thermodynamic data for minerals in the system Na₂O-K₂O-CaO-MgO-FeO-Fe₂O₃-Al₂O₃-SiO₂-TiO₂-H₂O-CO₂. *Journal of petrology*. **29** (2): 445-522.
- Best, M. G.** (2003). *Igneous and Metamorphic Petrology*. Malden, USA: Blackwell Science Ltd. 752p.
- Capitani, C. & Petrakakis, K.** (2010). THERIAK-DOMINO Software. *Mineralogy and Petrography*. Fecha de consulta: septiembre a octubre, 2019. Disponible en: <https://titan.minpet.unibas.ch/minpet/theriak/theruser.html>
- Castellanos, O. M., Ríos, C. A., Takasu, A.** (2008). A new approach on the tectonometamorphic mechanisms associated with P-T paths of the Barrovian-type Silgará Formation at the Central Santander Massif, Colombian Andes. *Earth Sciences Research Journal*. **12** (2): 125-155.
- Chinner, G. A.** (1961). The origin of sillimanite in Glen Clova, Angus. *Journal of Petrology*. **2** (3): 312-323.
- Douglass, S.L. & Brew, D.A.** (1985). Polymetamorphism in the eastern part of the Petersburg map area, southeastern Alaska, in Bartsch-Winkler. U.S. Geological Survey. **967**: 89-92.
- Dusel-Bacon, C., Brew, D. A., Douglass, S. L.** (1996). *Metamorphic Facies Map of Southeastern Alaska: Distribution, Facies, and Ages of Regionally Metamorphosed Rocks*. U.S. GEOLOGICAL SURVEY PROFESSIONAL PAPER 1497-D. 42p.
- Foster, C. T.** (1991). The role of biotite as a catalyst in reaction mechanisms that form sillimanite. *Canadian Mineralogist*. **29**: 943-963.
- García, C. A., Ríos, C. A., & Castellanos, O.** (2005). Medium- pressure metamorphism in the Central Santander Massif, Eastern Cordillera, Colombian Andes. *Boletín de Geología*. **27** (2): 44-68.
- García, C. A., Rey, V., Valencia, V.** (2017). Ortoncises en la Franja Silos-Babega, Macizo de Santander, Colombia: evidencias de la orogenia famatiniana en los Andes del norte. *Andean Geology*. **44** (3): 307-327.
- García-Ramírez, C. A., Casadiegos-Agudelo, L., Castellanos-Meléndez, M. P.** (2019). Petrology and geochemistry of the Silgara Schists in the Silos area, Santander Massif, Colombia. *DYNA*. **86** (209): 271-280.
- Goldsmith, R., Marvin, R.F., Mehnert, H.H.** (1971). Radiometric ages in the Santander Massif, Eastern Cordillera, Colombian Andes. *Geological Survey Research*. **750**: D44-D49.
- Hash, L. J., Van Horn, E. C., Teague, K. H.** (1951). *Sillimanite deposits in North Carolina*. Department of conservation and development. Vol 61. 51p.
- Homam, S. M. & Ghaemi, F.** (2008). The mechanism of fibrolite formation in the contact aureole of Mashhad granite. *Iranian Journal of Crystallography and Mineralogy*. **16** (1): 10.
- Janoušek, V., Farrow, C. M., Erban, V.** (2019). Programa "Geochemical Data Toolkit (GCDkit)" versión 6.0. Fecha de consulta: noviembre a diciembre, 2019. Disponible en: <http://www.gcdkit.org/download>
- Kerrick, D. M.** (1987). Fibrolite in contact aureoles of Donegal, Ireland. *American Mineralogist*. **72** (3-4): 240-254.
- Kerrick, D. M.** (1990). The Al₂SiO₅ Polymorphs. *Reviews in Mineralogy*. Mineralogical Society of America: *Reviews in Mineralogy*, Vol. **22**, 1990. xii + 406 pp.
- McLennan, S. M.** (1989). Rare earth elements in sedimentary rocks: influence of provenance and sedimentary processes. *Geochemistry and Mineralogy of Rare Earth Elements*, *Reviews in Mineralogy*. **21**: 169-200.
- Mantilla, L., Bissig, T., Cottle, J.M., Hart, C.** (2012). Remains of early Ordovician mantle-derived magmatism in the Santander Massif (Colombian Eastern Cordillera). *Journal of South American Earth Sciences*. **38**: 1-12.
- Mantilla, L., Bissig, T., Valencia, V., Hart, C.** (2013). The magmatic history of the Vetás-California mining district; Santander Massif, Eastern Cordillera, Colombia. *Journal of South American Earth Sciences*. **45**: 235-249.
- Mantilla, L. C., García, C. A., Valencia, V. A.** (2016). Propuesta de escisión de la denominada "Formación Silgará" (Macizo de Santander, Colombia), a partir de edades U-Pb en circones detriticos. *Boletín de Geología*. **38** (1): 33-50.
- Mantilla, L. C., García, C. A., Valencia, V. A.** (2016). Nuevas evidencias que soportan la escisión de la Formación Silgará y propuesta de un nuevo marco estratigráfico para el basamento metamórfico del Macizo de Santander (Cordillera Oriental de Colombia). *Ciencias de la Tierra*. **40** (155): 320-336.

- McLennan, S.M.** (1989). Rare earth elements in sedimentary rocks: influence of provenance and sedimentary processes. *Reviews in Mineralogy*. **21**: 169-200.
- Miyashiro, A.** (1994). Evolution of Metamorphic Belts. *Journal of Petrology*. **2** (3): 277-311.
- Moreno, M., Gómez, A., Castillo, H.** (2005) La "Formación Floresta Metamorfoseada" (sensu Ward *et al.*, 1973) no es la Formación Floresta sin metamorfosar. X Congreso Colombiano de Geología, Bogotá, Memorias, CD, 1-7.
- Nakamura, N.** (1974). Determination of REE, Ba, Fe, Mg, Na and K in carbonaceous and ordinary chondrites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **38** (5): 757-775.
- Nesbitt, H. & Young, G. M.** (1982). Early Proterozoic climates and plate motions inferred from major element chemistry of lutites. *Nature*. **299** (5885): 715-717.
- Ríos, C. A. & García, C. A.** (2001). Primera ocurrencia de los tres polimorfos de Al₂SiO₅ en las rocas metapelíticas de la Formación Silgará, región Suroccidental del Macizo de Santander. *Boletín de Geología*. **23** (38): 51-59.
- Ríos, C. A., García, C. A., Takasu, A.** (2003). Tectono-metamorphic evolution of the Silgará Formation Metamorphic rocks in the southwestern Santander Massif, Colombian Andes. *Journal of South American Earth Sciences*. **16**: 133-154.
- Ríos, C. A. & Castellanos, O. M.** (2015). A case of regional metamorphism of Buchan type (andalusite-cordierite) in the Northern Santander Massif, Eastern Cordillera (Colombia). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. **9** (152): 416-429.
- Royero, J. & Clavijo, J.** (2001). Memoria Explicativa del Departamento de Santander. Mapa geológico generalizado del Departamento de Santander. Escala 1:400.000. Ingeominas.
- Siivola, J. & Schmid, R.** (2007). List of Mineral Abbreviations. Subcommission on the Systematics of Metamorphic Rocks (SCMR). Fecha de consulta: noviembre a diciembre, 2019. Disponible en: https://www.bgs.ac.uk/scmr/docs/papers/paper_12.pdf
- Smith, L.** (1945). Sillimanite in South Carolina. *Economic Geology*. **40**: 298-304.
- Stowell, H. H. & Crawford, M. L.** (2000). Metamorphic history of the Coast Mountains orogen, western British Columbia and southeastern Alaska. *Geological Society of America Special Paper*. **343**: 257-278.
- Stowell, H. H. & Tinkham, D. K.** (2003). Integration of phase equilibria modelling and garnet Sm-Nd chronology for construction of P-T-t paths: examples from the Cordilleran Coast Plutonic Complex, USA. *Geological Society, London, Special Publications*. **220** (1): 119-145.
- Taylor, S.R. & McLennan, S.M.** (1985). *The Continental Crust: Its Composition and Evolution*. Blackwell, Oxford, 312 p.
- Taylor, S.R. & McLennan, S.M.** (1981). The composition and evolution of the continental crust: rare element evidence from sedimentary rocks. *Philos Trans R. Soc Lond A*. **301**: 381-399.
- Van Der Lelij, R., Spikings, R., Ulianov, A., Chiaradia, M., Mora, A.** (2015). Palaeozoic to Early Jurassic history of the northwestern corner of Gondwana, and implications for the evolution of the Iapetus, Rheic and Pacific Oceans. *Gondwana Research*. **31**: 271-294.
- Van Der Lelij, R.** (2013). Reconstructing north-western Gondwana with implications for the evolution of the Iapetus and Rheic Oceans: a geochronological, thermochronological and geochemical study (Tesis de doctorado). Université de Genève, Suiza.
- Wang, W., Wei, C., Zhang, Y., Chu, H., Zhao, Y., Liu, X.** (2013). Age and origin of sillimanite schist from the Chinese Altai metamorphic belt: implications for late Palaeozoic tectonic evolution of the Central Asian Orogenic Belt. *International Geology Review*. **56** (2): 224-236.
- Ward, D. E., Goldsmith, R., Jimeno, R., Cruz, A., Restrepo, J., Gómez, E.** (1973). Memoria explicativa: Mapa Geológico de Colombia, Plancha 109 y 110. *Boletín Geológico*. **21**: 1-132.
- Zhao, G. & Cawood, P. A.** (1999). Tectonothermal evolution of the Mayuan Assemblage in the Cathaysia Block; implications for Neoproterozoic collision-related assembly of the South China Craton. *American Journal of Science*. **299** (4): 309-339.

A nuestros lectores y autores

Enfoque y alcance

La Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales es una publicación periódica trimestral, multidisciplinaria, que tiene como objetivo dar a conocer artículos inéditos de investigación de alta calidad.

La Revista publica artículos científicos en las áreas de ciencias biomédicas, ciencias del comportamiento (filosofía, psicología, antropología, sociología), ciencias físicas, ciencias naturales (biología, microbiología, botánica, zoología, ecología) ciencias químicas, ciencias de la tierra (geología, medio ambiente) y matemáticas.

Está reseñada en varios índices nacionales e internacionales tales como Actualidad Iberoamericana, Agris, CIRS (*International Center for Scientific Research*), *Current Mathematical Publications*, EBSCO, Dialnet, Historia Mathematica, Index Kewensis, Latindex, Mathematical Reviews, MathSciNet (on line data base), PERIODICA, SciELO Colombia, Online Computer Library Center – OCLC, *Zentralblatt für Mathematik*, *Zoological Record*. Nacionalmente se encuentra reseñada en la base de datos Publindex de Colciencias.

El primer número se publicó en diciembre de 1936, año de creación oficial de la Academia, bajo la dirección del doctor Jorge Álvarez Lleras y hasta el momento se han editado 41 volúmenes.

Proceso de evaluación por pares

Se recibirán solo los manuscritos que cumplan con todos los requisitos que se mencionan en las indicaciones a los autores. Los manuscritos serán evaluados en primera instancia por el editor y los editores asociados de la disciplina correspondiente.

Cada manuscrito será enviado a dos especialistas en el tema, quienes evaluarán y enviarán sus recomendaciones. Este proceso de revisión tendrá una duración aproximada de 90 días.

Los pares académicos pueden adoptar alguna de las siguientes tres opciones: a) aceptación sin modificaciones; b) aceptación con correcciones; c) no aceptación. En caso de desacuerdo de los pares, el original será enviado a un tercer evaluador.

En cualquiera de los casos, el autor será informado y deberá realizar las modificaciones correspondientes en el manuscrito y enviarlo dentro de las cuatro semanas siguientes. Además, deberá enviar un documento en el que responderá, una a una, todas las observaciones señaladas por los evaluadores.

Cuando el autor demore más de 30 días en responder a las sugerencias de los evaluadores, se entenderá que los autores han retirado el manuscrito en su forma actual y, si se remitiera de nuevo, el Comité Editorial de la Revista lo considerará como un nuevo trabajo.

Los trabajos que sean aceptados se considerarán como propiedad de la **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales** y podrán ser reproducidos total o parcialmente por la Revista.

La Revista no se hace responsable de los contenidos científicos ni de las implicaciones legales de los artículos publicados.

Ética de la publicación

La Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (RACCEFYN), acoge la normatividad internacional definida por el *Committee on Publication Ethics* (COPE). Algunas normas se pueden consultar en:

COPE guidelines on good publication practice: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1753164/>

COPE code of conduct: <https://publicationethics.org/resources/code-conduct>

Ver documento pdf (anexo)

Política de acceso abierto

La página web de la Revista (www.raccefyn.co) permite el acceso libre y abierto a los artículos con el fin de contribuir a la visibilidad, el acceso y la difusión de la producción científica.

Directrices para autores

Tipología de los artículos publicados en la Revista

Artículos originales o artículos de investigación científica y tecnológica: documento que presenta, de manera detallada, los resultados originales de proyectos de investigación. La estructura generalmente utilizada contiene los siguientes apartes importantes: introducción, metodología, resultados, discusión, conclusiones y referencias.

Artículos cortos: documentos breves que presenta resultados originales preliminares o parciales de una investigación científica o tecnológica y, que, por lo general, requieren de una pronta difusión.

Artículos de posesión o artículos de revisión de tema: documentos resultantes de una investigación donde se analizan crítica y sistemáticamente, a la par que se integran los resultados de investigaciones publicadas o no publicadas, centradas en un campo de la ciencia o la tecnología, con el fin de dar cuenta de sus avances y sus tendencias de desarrollo. Presentar un artículo de revisión constituye un requisito para que un Académico pueda posesionarse como miembro correspondiente o de número.

Cartas al editor: posiciones críticas, analíticas o interpretativas sobre los documentos publicados en la revista que, a juicio del Comité Editorial, constituyen un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia.

Comentarios bibliográficos: son escritos críticos breves sobre libros recientes publicados en las disciplinas de interés de la Revista.

Corrección de los autores

Fe de erratas

Indicaciones a los autores

Los autores deben tener en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Los trabajos presentados deberán ser originales y de alto nivel, escritos en inglés o español, y que traten sobre aspectos relacionadas con las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Todos los trabajos aceptados quedarán como propiedad permanente de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de manera que la misma podrá publicarlos en formato físico y electrónico, incluyendo la internet. (Ver transferencia derechos de autor).
2. El autor de la correspondencia aceptará mediante comunicación escrita firmada que el manuscrito es un trabajo original, que no ha sido publicado por ningún medio, ni está siendo evaluado para aparecer en otra publicación impresa o electrónica y que, además, ha sido aceptado por todos los autores para su publicación en la Revista. Igualmente, que los derechos de autor no han sido cedidos a nadie con anterioridad. (Ver formatos declaración originalidad, conflicto de intereses y sesión de derechos de autor en la página web de la Revista: <http://www.raccefyn.co>).
3. La participación de los autores en el trabajo deberá ser suficiente como para aceptar públicamente la responsabilidad por los aportes de cada cual. El orden de los autores en la publicación deberá ser una decisión compartida de los coautores, quienes deberán ser capaces de explicar el orden en el que aparecen sus nombres. Finalmente, el manuscrito debe contener un párrafo en el que se detallará la contribución de cada uno de los autores.
4. De acuerdo con el ICMJE, todos los colaboradores que no cumplan con los criterios de autoría o hayan realizado contribuciones menores deberán aparecer en la sección de *Agradecimientos*, pero no serán citados como autores. Las ayudas económicas y materiales deberán aparecer en los *Agradecimientos*.
5. La terminología debe regirse por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica. La terminología física, química o bioquímica, deberá seguir las normas del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC). Deberán usarse las abreviaturas internacionales convencionales y las unidades del Sistema Internacional (SI). Los nombres científicos deberán ser escritos en la forma recomendada por el *Internacional Code of Botanical Nomenclature* y por el *International Committee on Systematics of Prokaryotes* o ICSP.

Envío y presentación del manuscrito

Los artículos deberán ser enviados a través de <http://www.raccefyn.co>

El manuscrito incluirá además de la página correspondiente al título, el resumen, las referencias, las tablas y sus títulos, las leyendas de las figuras, todos los cuales deberán estar escritos en procesador de palabras Word a doble espacio, usando la fuente Arial de tamaño 12, sin justificar el texto. No debe olvidarse el usar la numeración en todo el manuscrito. Extensión máxima de 30 páginas, entre 5.000 a 8.000 palabras.

Los manuscritos deben incluir la siguiente información:

1. Una hoja de presentación, página en Word con los nombres y apellidos (si desea poner el segundo apellido, debe ir separado por un guion) de todos los autores (sin cargos, ni grado académico), filiaciones y correos electrónicos. Agregar aquí un párrafo en el que los autores declaren su aporte personal al manuscrito bajo consideración.
2. Título completo del manuscrito en español e inglés (máximo 30 palabras, 165 caracteres)
3. Título corto (máximo 10 palabras, 50 caracteres)
4. Resumen en español e inglés que no supere 250 palabras.
5. Palabras clave en español y en inglés que no superen en número a seis, separadas por punto y coma.
6. Nombre del autor responsable de la correspondencia con su dirección completa, número telefónico, dirección electrónica y código ORCID. *Open Researcher and Contributor ID* (Identificación del Investigador y del colaborador abierto)
7. Direcciones electrónicas de todos los coautores y códigos ORCID *Open Researcher and Contributor ID*.
8. Texto, referencias y tablas en un mismo archivo en conjunto con las leyendas de las figuras en formato jpg o tiff en archivos individuales y con una resolución mayor a 300 dpi (*dots per inch*).
9. El número máximo de tablas y figuras es de 7. Para enviar información adicional se puede emplear la sección de *Información suplementaria* debidamente referenciada en el texto: tabla 1S, 2S, etc.; figura 1S, 2S, etc.

Estructura del manuscrito

Introducción: se debe mostrar el marco teórico en el cual se inscribe el tema de la investigación, propósito del artículo y justificación del estudio indicando, además, la delimitación de la pregunta problema.

Materiales y métodos: se describirán los sujetos de observación o experimentación, aparatos o dispositivos y metodologías empleadas en el estudio. La descripción de la metodología debe tener referencias de los métodos usados.

Análisis estadístico: señalar los métodos estadísticos utilizados y la manera de analizar los datos.

Resultados: deben presentarse en secuencia lógica, con las tablas y las figuras acompañadas de una explicación y análisis de las mismas.

Discusión: debe hacerse énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio, contrastando los resultados con la información pertinente disponible en literatura actualizada y relacionar las conclusiones con los objetivos propuestos. Se deben incluir las implicaciones y limitaciones de los hallazgos y comparar las observaciones relevantes con las de otros estudios.

Los resultados y la discusión pueden presentarse también en forma combinada, en cuyo caso la sección se denominará *Resultados y Discusión*.

Conclusiones: deberán responder al objetivo de la investigación reportada e incluir el planteamiento de objetivos futuros a seguir en la línea de investigación.

Referencias: todas las referencias bibliográficas se insertarán en el texto y deberán llevar siempre entre paréntesis el apellido del primer autor y el año de publicación. Si el apellido del autor o autores forma parte de la estructura formal de la frase, sólo se pondrá entre paréntesis la fecha; por ejemplo: Pérez y Ribas (1996). Si no forma parte de la estructura formal del texto, por ejemplo: ... como indica Barbudo (2003). Si son solo dos autores se pondrán los dos apellidos, si son más de dos sólo se pondrá el apellido del primero añadiendo “*et al.*”

La Revista ACCEFYN utiliza las normas del Manual APA, estas emplean un sistema de citación de autor-fecha.

Lista de referencias. Se organizan alfabéticamente y se citan de la siguiente manera:

Artículo de revista

Apellido, A. A., Apellido, B. B., Apellido, C. C. (Año). Título del artículo. Nombre de la revista, volumen: pp-pp.

Ejemplo

Kay, M.A., Glorioso, J.C., Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.*, 7: 33-40.

Libro

Apellido, A. A. (Año). Título. Ciudad, País: Editorial

Ejemplo

Salisbury, F. B., Ross, C. M. (1994). Fisiología Vegetal. Guadalajara, México: Grupo editorial Iberoamérica.

Capítulo de libro

Apellido, A. A., Apellido, B. B. (Año). Título del capítulo o la entrada. En A. A. Apellido. (Ed.), Título del libro (pp. xx-xx). Ciudad, País: Editorial.

Ejemplo

Guba, E.G. (1983). Criterios de credibilidad en la investigación naturalista. En J. Jimeno Sacristán y A. Pérez Gómez. La enseñanza: Su teoría y su práctica (148-165). Madrid, España: Akal.

Revista en línea

Apellido, A. A. (Año). Título del artículo. Nombre de la revista, **volumen** (número): pp-pp. Disponible en: <http://www...>

Ejemplo

Cintrón, G., Lugo, A. E., Pool, D. J., Morris, G. (1978). Mangroves of arid environments in Puerto Rico and adjacent islands. *Biotropica*, **10** (2): 110-121. Disponible en: <http://www.jstor.org/pss/2388013>.

Gutiérrez-Vargas, J.A., Moreno, H., Cardona-Gómez, G.P. (2016). Targeting CDK5 post-stroke provides long-term neuroprotection and rescues synaptic plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab.* doi: 10.1177/0271678X16662476

Citas páginas web

Anotar la fecha de la consulta

Ejemplo

Guiry, M.D., Guiry, G.M. (2015). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponible en <http://www.algaebase.org>., accedida entre enero y junio de 2015.

Tablas y figuras: las tablas y cuadros se denominarán tablas y llevarán numeración arábiga de acuerdo con el orden de aparición. El título correspondiente se coloca en la parte superior de la tabla y las notas en la inferior. Los símbolos para unidades deben aparecer en el encabezamiento de las columnas. Si es necesario exponer alguna información, utilizar las letras minúsculas del alfabeto según orden de aparición en la respectiva tabla: a, b, c, d, e, etc.

Las fotografías, gráficos, dibujos y esquemas se denominan todos como Figuras, las cuales se enumeran según el orden de aparición y sus leyendas se describen en hoja separada. Si se trata de micro-fotografías debe indicarse el aumento utilizado. Las personas, o sus nombres, no deben ser identificables en las fotografías pero se requiere permiso escrito para su publicación.

Cuando las tablas y figuras hayan sido tomadas de revistas o libros, sean impresos o electrónicos, se debe especificar la fuente y adjuntar autorización de la respectiva publicación para su reproducción.

Agradecimientos: podrán ser expresados a personas o entidades que hayan ayudado en la realización del trabajo. Se mencionarán las personas y el tipo de ayuda aportada, así como las entidades, instituciones o fundaciones que hayan financiado o suministrado materiales. En caso de proyectos de investigación financiados será suficiente con mencionar el código de registro y la entidad, institución o fundación que lo apoyó económicamente.

Consideraciones

Los trabajos aceptados son propiedad de la Revista ACCEFYN y podrán ser reproducidos total o parcialmente por la Revista.

La Revista no se hace responsable de los contenidos científicos ni de las implicaciones legales de los artículos publicados.

Corrección de estilo y publicación del manuscrito

Una vez aceptados los artículos, éstos se enviarán a corrección orto-tipográfica. Se usará la herramienta de control de cambios de Word, en la cual quedará el registro de cada una de las sugerencias llevadas a cabo y los comentarios o dudas para que el autor o los autores aprueben y contesten apropiadamente.

La versión corregida deberá ser enviada nuevamente para su aprobación definitiva en un plazo mínimo de 48 horas. El manuscrito deberá ir con una carta al editor, informando cuales correcciones fueron procesadas. El editor le informará al autor la fecha aproximada y el número del volumen en el que el trabajo será publicado.

Rectificaciones y correcciones de errores

Las rectificaciones sobre la información suministrada por parte de los autores, se harán en el número inmediatamente posterior al anuncio de las mismas y serán responsabilidad de los mismos autores. La Revista se encargará de publicar una nota aclaratoria a manera de erratas. En el caso que sean necesarias mejoras y corrección de errores orto-tipográficos, de manejo visual de la información o de imprecisiones involuntarias, el o los autores podrán comunicarse al correo de la Revista para que puedan efectuarse en las versiones electrónicas de la Revista.

Falsificación de artículos

Si en el proceso editorial se encuentra falsificación, omisión de datos, duplicidad del artículo o plagio, se devolverá el original al autor con la debida notificación a su institución patrocinadora, centro de investigación o universidad.

Conflicto de intereses

Si los autores o coautores, editores o revisores (evaluadores) tienen algún conflicto de intereses que pueda de alguna manera influir en la transparencia u objetividad en el proceso de revisión por pares y publicación, tal conflicto debe ser declarado.

Los conflictos de interés más evidentes son los llamados conflictos financieros, resultado de relaciones entre empleador-empleado, financiaciones y patentes, así como también honorarios, consultorías, investigación pagada por compañías que dependen de los resultados investigativos, entre otros.

También existen los conflictos personales resultado de amistades o animadversiones, competencias académicas y pasiones en el campo intelectual o moral (por ej. parientes en una compañía que se beneficiaría de los resultados que se van a publicar, el uso de los resultados publicados para promoción inmediata basada en el artículo publicado, creencias religiosas que estén en conflicto directo con la investigación que se va a publicar, entre otros).

Transferencia de derechos de autor

En caso de que el artículo enviado sea aprobado para publicación, el autor principal en nombre propio y en el de los coautores o el autor principal y los coautores deben ceder los derechos de autor del artículo mencionado a la revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCEFYN), excepto en los siguientes casos:

- a) Los autores y coautores retienen el derecho de revisar, adaptar, preparar trabajos derivados, presentaciones orales y distribuir a algunos colegas impresos de su propio trabajo publicado, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente a la revista de ACCEFYN. También pueden publicarse el título del trabajo, resumen, tablas y figuras del trabajo en los correspondientes sitios web de autores o de sus empleadores, también dando el crédito correspondiente a la revista de ACCEFYN.
- b) Si el trabajo ha sido realizado por contrato, el empleador del autor tiene el derecho de revisar, adaptar, preparar trabajos derivados, reproducir o distribuir en formato impreso el trabajo publicado, de una manera segura y para el uso exclusivo de sus empleados.
- c) Si a la revista de ACCEFYN se le solicitara permiso individual por terceras personas para usar, imprimir o publicar específicamente artículos ya publicados, deberá obtenerse el permiso expreso del autor y coautores del trabajo o del empleador con excepción del uso en salones de clase, bibliotecas o reimpresos en un trabajo colectivo.
- d) La revista ACCEFYN se reserva el posible uso en la portada de la revista, de figuras sometidas con los manuscritos.
- e) Ningún otro derecho, además del de derechos de autor, debe ser reclamado por la revista de ACCEFYN.

Aviso de derechos de autor

Los autores certifican que son los creadores originales del trabajo y declaran que:

- a) Los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y,

en los casos que así lo requieran, se cuenta con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales.

- b) Todos los materiales que se presentan están totalmente libres de derecho de autor y, por lo tanto, el autor de la correspondencia se hace responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de responsabilidad a la **Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**.
- c) El trabajo es inédito y no será enviado a otras revistas mientras se espera la decisión de los editores de tal revista. El primer autor declara que no existe un posible conflicto de intereses en este manuscrito.
- d) En caso de ser publicado, los autores del artículo transfieren todos los derechos de autor a la Revista ACCEFYN, sin cuyo permiso expreso no podrá reproducirse ninguno de los materiales publicados en la misma.
- e) A través de este documento, y si el trabajo es aceptado para su publicación, la Revista ACCEFYN asume los derechos para editar y publicar los artículos en índices nacionales, e internacionales o bases de datos con fines académicos y científicos no comerciales en medios impresos, electrónicos, Internet en texto completo o cualquier otro medio conocido o por conocer con respeto de los derechos de autoría.

Transferencia de derechos de autor

En caso de que el artículo enviado sea aprobado para publicación, el autor principal en nombre propio y en el de los coautores o el autor principal y los coautores deben ceder los derechos de autor del artículo mencionado a la revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCEFYN), excepto en los siguientes casos:

- a) Los autores y coautores retienen el derecho de revisar, adaptar, preparar trabajos derivados, presentaciones orales y distribuir a algunos colegas impresos de su propio trabajo publicado, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente a la revista de ACCEFYN. También se pueden publicar el título del trabajo, el resumen, las tablas y las figuras del trabajo en los correspondientes sitios web de autores o de sus empleadores, dando también el crédito a la revista de ACCEFYN.
- b) Si el trabajo ha sido realizado por contrato, el empleador del autor tiene el derecho de revisar, adaptar, preparar trabajos derivados, reproducir o distribuir en formato impreso el trabajo publicado, de una manera segura y para el uso exclusivo de sus empleados.
- c) Si a la revista de ACCEFYN se le solicitara permiso individual por terceras personas para usar, imprimir o publicar específicamente artículos ya publicados, deberá obtenerse el permiso expreso del autor y de los coautores del trabajo o del empleador con excepción del uso en salones de clase, bibliotecas o reimpresos en un trabajo colectivo.
- d) La revista ACCEFYN se reserva el posible uso en la portada de la revista, de figuras sometidas con los manuscritos.
- e) Ningún otro derecho, además del de derechos de autor, debe ser reclamado por la revista de ACCEFYN.

Declaración de privacidad

Los nombres y las direcciones de correo electrónico incluidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros ni serán usados con otros fines.

Lista de comprobación para la preparación de envíos

Como parte del proceso de envíos, los autores están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

1. Carta de sometimiento del artículo, donde informa que todos los autores han leído, aprueban y declaran que:

- Están de acuerdo con el manuscrito remitido, en su contenido, organización y presentación.
- El trabajo es original, el cual no ha sido publicado previamente y, de igual forma, no se someterá a otra revista hasta conocer la respuesta del Comité Editorial.
- En caso de ser aceptado el manuscrito, se autoriza su publicación bajo las normas establecidas por la revista.

- El documento no cuenta con texto o figuras que tengan reserva de derechos y si los tuviere se cuenta con la autorización escrita para su reproducción.
- El documento no contiene citas o transcripciones de obras que carezcan de referencias bibliográficas debidamente citadas.
- Se incluye un párrafo donde los autores declaran cuál fue el aporte de cada uno de ellos al documento.
- Esta carta firmada debe ser adjuntada en el paso 4 del presente proceso de envío en formato PDF.

2. Presentación

- Una página en Word con los nombres y apellidos (nombre completo, apellido y segundo apellido separado por un guion) de todos los autores (sin cargos, ni grados académicos), filiaciones y correos electrónicos.
- Título completo del manuscrito en español e inglés y título corto.
- Nombre del autor responsable de la correspondencia con su dirección completa, número telefónico y dirección electrónica.
- Direcciones electrónicas de todos los coautores.
- Texto, referencias y tablas en un mismo archivo junto con las leyendas de las figuras. Figuras en formato jpg o tiff en archivos individuales.

3. Estructura del artículo. Se incluyen

- El resumen en español e inglés (Abstract).
- Las palabras clave (máximo 6) en español e inglés (Keywords).
- Introducción.
- Materiales y métodos.
- Resultados y Discusión para comunicaciones cortas.
- Discusión.
- Agradecimientos a colaboradores y/o instituciones u organizaciones que financiaron la investigación.
- Referencias.
- Declaración de conflicto de interés.

4 Información adicional: figuras

- Se incluyen como archivo independiente, cada figura en página aparte.
- Se incluyen las leyendas correspondientes al final del original. Estas figuras deberán ser cargadas en el paso 4 del presente proceso de envío en formato JPG o TIF.

5. Información adicional: tablas

- Se incluyen al final del original, elaborados en el modelo más sencillo de tablas del programa Word.
- Se ordenan secuencialmente.
- Se incluye el título correspondiente.

6. Referencias

- Se han seguido las normas de la revista de ACCEFYN en las instrucciones a los autores.

7. Abreviaturas:

- Se introducen entre paréntesis la primera vez que se usan.

8. Nomenclatura:

- Los nombres de género y especie están en letra cursiva.
- Los nombres de microorganismos, plantas y animales se escriben completos la primera vez que se citan, en el título y en el resumen.

9. Ética

- Todos los autores conocen y aprueban la presentación del manuscrito, su contenido, la autoría y el orden de la autoría.
- El manuscrito ha sido postulado solo a la Revista ACCEFYN y no se encuentra postulado ni ha sido publicado en otra revista.
- Si el artículo incluye la investigación en humanos o con animales se han seguido las directrices de la Declaración de Helsinki y el uso de primates no humanos en la investigación.
- Se incluye los agradecimientos a las instituciones u organizaciones que financiaron la investigación.

10. Revisores

Se suministran indicaciones sobre tres o cuatro posibles revisores con sus nombres completos, formación académica y direcciones de correos electrónicos.

To our readers and authors

Focus and Scope

The Journal of the Colombian Academy of Exact, Physical and Natural Sciences (ACCEFYN) is a multidisciplinary quarterly journal that publishes high quality original research articles.

The journal publishes scientific articles in the disciplines of Biomedical Sciences, Behavioral Sciences (philosophy, psychology, anthropology, and sociology), Natural Sciences (Biology, Botany, Microbiology, Zoology, Ecology), Physical Sciences, Chemical Sciences, Earth Sciences (Geology, Environmental Sciences) and Mathematics. It is included in several national and international directories and indexing services like Actualidad Iberoamericana, Agris, CIRS (International Center for Scientific Research), Current Mathematical Publications, EBSCO, Dialnet, Historia Mathematica, Index Kewensis, Latindex, Mathematical Reviews, MathSciNet (on line data base), PERIODICA, SciELO Colombia, On-line Computer Library Center – OCLC, Zentralblatt für Mathematik, Zoological Record, RLG. Within the Colombian citation system, the journal is register in Publindex (The Journal index Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias).

The journal's website (www.racefyn.co) allows free and open access to full-text articles with the purpose of contributing to the visibility, access and dissemination of Colombian scientific production.

The first issue was published in December 1936, year of the official creation of the National Academy, led by Jorge Álvarez Lleras. The journal has been edited 41 volumes since then.

Peer Review Process

Manuscripts that meet the author guidelines are welcomed. Manuscripts will be assessed by the editor in chief and associate editors' expert in the topic of the manuscript.

If the editors see fit, the manuscript will be sent to, at least, two peers knowledgeable in the topic of the manuscript. It is estimated the peer reviewing process will take around 90 days.

The reviewers can decide to a) accept the article without any modification, b) accept it if some recommendations are addressed, or c) reject the manuscript. If peers exhibit contradicting assessments, an extra reviewer will be approached to settle disparities and reach a final decision.

The corresponding author will be notified of the results of the peer review process. The author should return an amended version, along with a documenting reporting the response to the reviewers, four weeks after receiving the results of the reviewers.

If the author does not send these documents past the suggested time, the journal will assume the manuscript has been withdrawn. If the author send these documents past the suggested time, the journal takes the manuscript as a new submission and the reviewing process starts anew.

Accepted manuscripts are considered property of the journal. Thus, the journal is free to reproduce an entire manuscript or parts of it.

The journal is not responsible of the contents of the published manuscripts and related legal implications.

Publication Ethics and Publication Malpractice Statement

The journal abides by the *Committee on Publication Ethics* (COPE) standards. These guidelines can be consulted in the following links:

COPE guidelines on good publication practice: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1753164/>

COPE code of conduct: <https://publicationethics.org/resources/code-conduct>

See document pdf (annex)

Open access policy

The journal enables open access to published articles via its website (www.racefyn.co) to contribute to the dissemination, accessibility, and visibility of scientific work.

Author Guidelines

Research articles. A manuscript documenting the results of at least one experiment/study by following the following structure: introductions, methodology, results, discussion, conclusions, and references. Extra material can be reported as an appendix.

Brief articles. Manuscripts reporting the results of novel experiments/study in a succinct manner and that require prompt diffusion.

Inaugural articles or Review articles. Manuscripts reporting literature reviews on a topic. It is one requirement for the Academics to be admitted to the Academy

Letters to the editor. Manuscripts proposing critical comments, novel analysis or re-interpretations of published work.

Book reviews. Short manuscripts reporting a review of a book recently published within an area of interest to the journal.

Authors correction

Errata

Information for Authors

Authors should bear in mind the following

1. Submitted manuscripts must be original and of outstanding quality. They can be written in Spanish or English in an area related to the **Exact, Physical or Natural Sciences**. All works accepted will remain permanent property of the Colombian Academy of Exact, Physical and Natural Sciences so that such work can be published in hard copy or in electronic format, including web posting. (See transference of authors' rights).
2. The corresponding author will be required to state that the work is original, has not been published elsewhere, is not under review elsewhere and that co-authors agree as to the version submitted. Equally important, the corresponding author will be asked to state whether copyrights have been passed on to other parties. (See form for declaration of originality, conflicts of interest, and authors' rights).
3. It is assumed all listed authors have contributed substantially to the manuscript. Their order in the manuscript should be reached by agreement. Finally, each author's contribution should be explicitly stated. Collaborators whose contribution was not substantial (see above) should be mentioned in the 'acknowledgments' section (see <http://www.icmje.org/> for a reference). Financial supports and grants should also be mentioned in this section.
4. The terminology used in the manuscript should follow that used in specific areas (we therefore recommend authors to consult specialised references in this regards as to their own fields of research). Scientific names should follow recommendations such as those stated, for example, by the International Code of Botanical Nomenclature and the International Committee on Systematics of Prokaryotes.

Submission and Presentation of manuscript

The manuscripts should be submitted using the website of the Academy: <http://www.acefyn.co>

The manuscript, including the title page, the abstract, tables with titles, graphics with descriptive legends, must be prepared in Microsoft WORD processor in double space. Use Arial font size 12 without justification. Do not forget to number the entire manuscript. Maximum extension 30 pages, 5,000 to 8,000 words.

The manuscripts must contain the following information:

1. A page in Microsoft Word with the names and surnames (complete name, first and second family name separated by a hyphen) of all the authors (without positions, and without academic degrees), academic affiliations and email addresses.
2. Complete manuscript title in Spanish and English.
3. Short Title
4. Abstract in Spanish and English using 250 or less words
5. Key words in Spanish and English not containing more than 6 words.
6. Name of the author responsible for all correspondence, including his complete address, telephone number and email address.
7. Electronic addresses of all the co-authors.
8. Text, bibliographical references, and tables in the same file together with the legends for all the figures.
9. Figures must be in jpg or TIF format.

Manuscript Structure

Introduction: there must be a clear description of the theoretical framework of the theme of the investigation, purpose of the article and justification of the study, indicating the limitation of the problem question.

Materials and methods: a description of the object of observation or experimentation, instruments or devices and the methodology employed in the study.

Statistical analysis: indicate the statistical methods used and the data analysis employed.

Results: these must be presented in a logical sequence, with the accompanying tables and figures with their respective explanations and analysis.

Discussion: emphasis must be given to those aspects of the study which are new and important, contrasting the results with the relevant information available in the recent literature and relate the conclusions with the proposed objectives. Mention must be made of the implications and limitations of the results found and a comparison of the relevant observations with that of other studies. The results and the discussion may also be presented in a combined form.

Conclusions: an up to date survey of the investigation. Mention can be made here of future objectives of the same line of investigation.

References: these citations must be verifiable. When a citation is made, indicate in the text the author, the year and page in the following way: last name of the first author and year of publication Pérez (1996). If there are only two authors use both last names Perez and Ribas (1996). If there are more than two authors use only the first last name followed by *et al.*

Reference list: alphabetically and following the examples

Journal article

Last name, A. A., Last name, B. B., Last name, C. C. (Year). Title. Journal name, **volume:** pp-pp.

Example

Kay, M.A., Glorioso, J.C., Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.*, **7:** 33-40.

Book

Last name, A. A. (year). Title, City, Country: Publisher

Example

Salisbury, F. B., Ross, C. M. (1994). *Fisiología Vegetal*. Guadalajara, México: Grupo editorial Iberoamérica.

Book chapter

Last name, A. A., Last name, B. B. (Year). Chapter title. In A. A. Last name. (Ed.), Book title (pp. xx-xx). City, Country: Publisher.

Example

Guba, E.G. (1983). Criterios de credibilidad en la investigación naturalista. En J. Jimeno Sacristán y A. Pérez Gómez. *La enseñanza: Su teoría y su práctica* (148-165). Madrid, España: Akal.

Journal on line

Last name, A. A. (Year). Article title. Journal, **volume** (issue): pp-pp. Available in <http://www...or DOI>

Examples

Cintrón, G., Lugo, A. E., Pool, D. J., Morris, G. (1978). Mangroves of arid environments in Puerto Rico and adjacent islands. *Biotropica*, **10** (2): 110-121. Available in: <http://www.jstor.org/pss/2388013>

Gutiérrez-Vargas, J.A., Moreno, H., Cardona-Gómez, G.P. (2016). Targeting CDK5 post-stroke provides long-term neuroprotection and rescues synaptic plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab.* doi: 10.1177/0271678X16662476

References web pages

Date of the access

Example

Guiry, M.D., Guiry, G.M. (2015). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available in <http://www.algaebase.org>., accessed in June 2015.

Tables and graphics: The tables and frames are called tables and carry an Arabic numeration in accordance with the order in which they appear. The corresponding title is placed on the upper part of the table and notes are placed in the lower part. Symbols for unit measures must appear in the column

headings. If it is necessary to display some information, use lower case letters from the alphabet according to the appearance of the table: a, b, c, d, e, etc.

Photographs, graphics, pictures, or sketches are named figures, are enumerated in order of appearance, and their legends must be written in a separate page. With respect to microfiches, indicate the size of the augmentation used. People or their names should not be identifiable in photographs, unless written permission for their publication has been obtained.

When tables and figures have been taken from magazines or books, published in hard copy or electronically, specify the source and include the authorization for its reproduction from the respective publication.

Acknowledgments: These can be expressed to persons or entities who have aided in the realization of the work. Mention is made of persons and their type of aid provided, as well as to entities or institutions which have provided financial and material assistance. In case of investigative projects with financial support it suffices to mention the registry code and the entity, institution or foundation which provided the economic support.

Considerations

They will be published in the following issue to the announcement of the correction. They are responsibility of the authors. Errata are responsibility of the Journal.

Fabrication of evidence, data omission, duplicity of data or plagiarism will be penalized. The authors and their institutions, research center or university and sponsors will be notified.

Once the article has been accepted, it will undergo a style and format revision which will bring it to its definitive version. The authors will receive the galley proofs in PDF format for the correction of errors before its printing. The corrected version must be returned for final approval within a period of 48 hours. The manuscript must be accompanied with a letter to the editor informing him of the corrections that were carried out. The editor will inform the author of the date and volume number in which the publication will appear.

If the authors or co-authors, the editors or reviewers (evaluators) have some conflict of interest which may in any way influence the transparency and objectivity of the peer review process and publication, it must be so declared.

The most obvious conflicts of interest are those referred to as financial conflicts, which result between, employer-employee, investments, and patents, as well as honoraria, consulting, paid investigation by companies which depend on the investigative results, etc.

There also exist personal conflicts arising from friendships, animosity, academic competencies and passions in the moral or intellectual field (for example relatives in a company which will benefit from the results to be published, the use of the results for immediate promotion based on the published article, religious beliefs which are in direct conflict with the investigation that will be published, etc.).

Copyright Notice

Declaration of originality and transfer author's rights

The authors declare:

The published data and reference materials have been duly identified with their respective credits and have been included in the bibliographic notes and citations that have been so identified and that should it be required, I have all releases and permissions from any copyrighted material.

All material presented is free from any copyright and that I accept full legal responsibility for any legal claims relating to copyrighted intellectual property, fully exonerating from responsibility the **Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**.

This work is unpublished and will not be sent to any other journal while waiting for the editorial decision of this journal. I declare that there is no conflict of interest in this manuscript.

In case of publication of this article, all author's rights are transferred to the **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, and so cannot be reproduced in any form without the express permission of it.

By means of this document, if the article is accepted for publication by the **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, the Revista assumes the right to edit and publish the articles in national and international indices or data bases for academic and scientific use in paper, electronic, CD-ROM, internet form either of the complete text or any other known form known or to be known and non-commercial, respecting the rights of the authors.

Transfer of author rights

In case the article is approved for publication, the main author in representation of himself and his co-authors or the main author and his co-authors must cede the author rights of the corresponding article to the **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, except in the following cases:

The authors and co-authors will retain the right to revise, adapt, prepare derived works, oral presentations, and distribution to some colleagues of reprints of their own published work, if the corresponding credit is given to the **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**. It is also permissible to publish the title of the work, summary, tables, and figures of the work in the corresponding web sites of the authors or their employers, also giving credit to the Revista.

If the work has been realized under contract, the author's employer has the right to revise, adapt, prepare derivative works, reproduce, or distribute in hard copy the published work, in a secure manner and for the exclusive use of his employees.

If the **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales** were approached for permission by a third party for using, printing, or publishing specifically articles already published, the Revista must obtain the express permission of the author and co-authors of the work or of the employer except for use in classrooms, libraries, or reprinted in a collective work. The **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales** reserves the possible use in its front cover of figures submitted with the manuscripts.

No other right, other than the author's right, can be claimed by the **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**.

Privacy Statement

The names and e-mail addresses appearing in the journal will be used solely for the purposes explicitly therein expressed and by no means will they be supplied to third parties.

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. Letter of submission, where it is stated that all authors have read and approved that:

- The submitted manuscript conforms in content, organization and presentation with established norms.
- The original article has not been previously published in any form nor has it been submitted to another journal nor will it be until an answer is received from the Editorial Committee.
- In the case the manuscript is accepted, it is then authorized to be published under the journal's norms.
- The document may not be published without authorization of all copyrighted texts and figures.
- The document is fully cited in a list of references.

2. Appearance

- The first page written in Word with names and surnames (complete name, first and second surnames separated by a hyphen) of all authors (without job titles or academic titles), affiliations and e-mail address.
- Complete title of the manuscript in Spanish and English. Short title.
- Name of person responsible for correspondence with their complete address, telephone number and electronic address.
- E-mail of all coauthors.
- Text, references and tables in the same file together with legends of the figures. Figures in jpg or TIF format.

3. Structure of the article

The following sections are to be included:

- An abstract should be included in both Spanish and English.
- Key words (no more than 6) should be included in both Spanish and English.
- Introduction.
- Materials and methods.

- Results and Discussion for short communications.
- Discussion.
- Acknowledgments to collaborators and institutions and organizations which financed the research.
- Declaration of conflict of interest.

4. Additional information: Figures

- Each figure is included in a separate page in jpg or TIF format
- Corresponding legends are included in a separate page
- Figures should be charged in JPG o TIF format

5. Additional information: Tables

- Tables are included on a separate page and are presented in a simple manner as a Word table
- Tables are ordered sequentially

6. References

Citations must follow the journal ACCEFYN's norms found in the authors' instructions

7. Abbreviations

The first use is introduced in parentheses

8. Nomenclature

- The generic and specific names are written in italics
- Names of micro-organisms, plants and animals are written out completely the first time that they are cited in the title and in the abstract.

9. Ethics and malpractice considerations

- All authors must know and approve of the form, content, authors, and the order of the authors
- An article that has been submitted to the journal ACCEFYN has not be submitted or published in any other journal.
- If the article includes research on human or animals have all authors read and followed the guiding principles of the Declaration of Helsinki and the use of non-human primates in the research?

10. Reviewers

List 3 or 4 possible reviewers with their complete names, academic background and e-mails.

