

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

LA ACADEMIA ES ÓRGANO CONSULTIVO DEL GOBIERNO NACIONAL

VOLUMEN XXXVII

DICIEMBRE DE 2013

NÚMERO 145

DIRECTOR DE PUBLICACIONES : JHON DOUGLAS LYNCH



CONTENIDO - CONTENTS

Pág.	Pág.
Ciencias Biomédicas (Biomedical Sciences)	
Preacondicionamiento isquémico en cardiomiocitos ventriculares aislados. Identificación y expresión de algunos microRNAs asociados [Ischemic preconditioning in isolated ventricular cardiomyocytes. Identification and expression of some Associated microRNAs] <i>Luis Alberto Gómez-Grosso</i>	433
Ciencias Físicas (Physical Sciences)	
Estudio preliminar de la colocación de un satélite artificial mediante un cohete lanzado desde territorio colombiano [A preliminary study of the placement of an artificial satellite by a rocket launched from colombian territory] <i>Jhonathan Orlando Murcia Piñeros, José Gregorio Portilla</i> ...	449
Las nuevas fronteras de la física de la materia condensada [The new frontiers of condensed matter physics] <i>Jon A. Schuller, Samuel A. Hevia, Iván K. Schuller</i>	463
Ciencias Naturales (Natural Sciences)	
Bioprospección de plantas nativas para su uso en procesos de biorremediación: Caso <i>Heliconia psittacorum</i> (Heliconiaceae) [Bioprospecting of native plants for their use in bioremediation process: <i>Heliconia psittacorum</i> case (Heliconiaceae)] <i>Peña-Salamanca Enrique J., Madera-Parra Carlos A., Sánchez, Jesús M., Medina-Vásquez Javier</i>	469
Caracterización morfológica de las ascosporas de micrólíquenes corticícolas del Caribe colombiano	[Morphological characterization of corticolous lichen ascospores in the Colombian Caribbean] <i>Angélica Rincón-Espitia</i>
	483
	Eonator coellensis nov. sp. (Squamata: Mosasauridae), nueva especie del Cretácico Superior de Colombia [Eonator coellensis nov. sp. (Squamata: Mosasauridae), a new species from the Upper Cretaceous of Colombia] <i>María Eurídice Páramo-Fonseca</i>
	499
	La protección del banano contra la Sigatoka Negra por métodos no biocidas [The protection of banana against Black Sigatoka disease through non biocidal methods] <i>Fernando Echeverri</i>
	519
Geología (Geology)	
	Bioestratigrafía de la formación Cansona en la quebrada Peñitas, cinturón de San Jacinto. Implicaciones paleogeográficas [Biostratigraphy of the Cansona Formation at quebrada Peñitas, San Jacinto belt. Paleogeographic implications] <i>Hernando Dueñas Jiménez, Clemencia Gómez González</i>
	527
Matemáticas (Mathematics)	
	A code to calculate high order Legendre polynomials and functions Un código para el cálculo de polinomios y funciones de Legendre de alto orden <i>I. A. Selezneva, Yu. L. Ratis, E. Hernández, J. Pérez-Quiles and P. Fernández de Córdoba</i>
	541
	Índice general del volumen XXXVII, año 2013
	545
	Índice de autores
	548
	Lista de evaluadores.....
	549

PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES AISLADOS. IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE ALGUNOS microRNAs ASOCIADOS

ISCHEMIC PRECONDITIONING IN ISOLATED VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES. IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF SOME ASSOCIATED microRNAs

Luis Alberto Gómez-Grosso*

RESUMEN

Gómez-Grosso L.A.: Preacondicionamiento isquémico en cardiomiocitos ventriculares aislados. Identificación y expresión de algunos microRNAs asociados. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 433-447, 2013. ISSN 0370-3908.

El objetivo de este estudio fue evaluar el preacondicionamiento isquémico, PCI, en cardiomiocitos ventriculares de cobayo adultos individuales y evaluar el perfil de expresión diferencial de microRNAs en estas células. Una supervisión de la morfología, de la actividad metabólica de las células cardíacas individuales aisladas en tiempo real, permite una evaluación de los cambios en la viabilidad de los cardiomiocitos y proporciona evidencia experimental de que el PCI tiene acción citoprotectora directa mediante la promoción de la supervivencia *in vitro*. La protección cardíaca por PCI asociada con la expresión diferencial de microRNAs específicos en cardiomiocitos adultos aislados sugiere que algunos miRNAs están involucrados en lesión y cardioprotección.

Palabras clave: cardioprotección, preacondicionamiento, ensayo de MTT, tiempo real, cardiomiocitos, viabilidad, isquemia, Dinitrofenol, Adenosina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the ischemic preconditioning, PCI, in single quiescent adult guinea-pig ventricular myocytes and assess the differential expression of microRNAs in these cells. Monitoring of the morphology of the metabolic activity of individual cardiac cells isolated in real time, allows evaluation of changes in the viability of the cardiomyocytes and provides experimental evidence that PCI has direct cytoprotective action by promoting survival *in vitro*. PCI cardiac protection associated with the differential expression of specific microRNAs in isolated adult cardiomyocytes suggests that miRNAs are involved in some injury and cardioprotection.

Key words: cardioprotection, preconditioning, MTT assay, real-time, cardiomyocyte, viability, injury, Dinitrophenol, Adenosine.

* Profesor Titular, Catedrático. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Investigador, Grupo de Fisiología Molecular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica. Instituto Nacional de Salud. Email: lgomez@ins.gov.co

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo occidental. Estas enfermedades representan un gran espectro de entidades, que incluyen la enfermedad hipertensiva, la enfermedad cerebro-vascular, las cardiomiopatías y la enfermedad cardíaca isquémica, entre otras. Por lo tanto, una de las acciones necesarias es la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas lo cual requiere el descubrimiento y caracterización de dianas esenciales para promover la sobrevivencia y la homeóstasis metabólica de células cardíacas, entre otras acciones (**World Health Organization**, 2011, **Gomez**, 2011).

La isquemia miocárdica es el desbalance que ocurre entre la suplencia y la demanda de oxígeno en el tejido miocárdico. Su causa más frecuente es la arteriosclerosis de las arterias coronarias; sin embargo, existen otros factores que disminuyan el flujo coronario como los trombos, émbolos, espasmos coronarios, la hipertrofia ventricular secundaria a hipertensión arterial y la anemia grave. Durante la oxigenación normal, el miocardio metaboliza ácidos grasos y glucosa a CO_2 y agua. Cuando el tejido cardíaco es expuesto a hipoxia, los ácidos grasos no pueden ser oxidados y la glucosa es metabolizada a lactato, por lo cual se produce disminución del pH, de los fosfatos de alta energía y del fosfato de creatina. La función de la membrana celular se altera, lo cual lleva a liberación de potasio, captación de sodio y cambios en las concentraciones de calcio libre por los cardiomiocitos. La severidad y duración de la hipoxia determinan si los cambios celulares son transitorios o permanentes, en cuyo caso la célula muere (**Buerke et al.**, 1994; **Gomez et al.**, 1997).

Durante las dos últimas décadas, se ha producido un renacimiento del estudio de la biología celular y molecular de las células cardíacas en la investigación cardiovascular básica, impulsado en primer lugar por la necesidad de entender las funciones fundamentales de las células cardíacas y sus cambios por la acción de nuevos fármacos para mantener o reponer un número funcional de células cardíacas, un reto de la medicina regenerativa, y en segundo lugar, principalmente por el desarrollo de tecnologías que incluyen las estaciones de trabajo de aislamiento de células cardíacas individuales, estaciones de imágenes de microscopía, de micro-matrices de ácidos nucleicos y nuevos reactivos y herramientas diseñados para monitorear cambios en la actividad y localización de moléculas a nivel celular y subcelular (**Taylor**, 2001; **Klauke**, 2003).

Una de las áreas de mayor investigación en el área de la cardiología molecular está orientada a definir los determinantes moleculares involucrados en la hipoxia cardíaca, en la supervivencia y funcionalidad de los cardiomiocitos y en los me-

canismos moleculares de un fenómeno de cardioprotección conservado, que protege al corazón de la hipoxia y estrés metabólico y físico, conocido como precondicionamiento isquémico cardíaco (PCI) (**Murray**, 1986; **Gomez**, 1997; **Marber**, 2000; **Amstrong**, 2004, **Gross**, 2013). No obstante, la mayoría de las investigaciones en PCI se han realizado en corazones completos y pocas en células cardíacas aisladas.

El cultivo primario de cardiomiocitos adultos aislados proporciona un modelo experimental útil para las investigaciones de los mecanismos de regulación implicados en la lesión cardíaca y en las respuestas citoprotectoras a diversas condiciones experimentales (**Haworth**, 1980; **Jacobson**, 1986, **Buerke**, 1994; **Gómez**, 1997, **Marber**, 2000). Sin embargo, el estudio de la viabilidad y la biología molecular de los cardiomiocitos primarios adultos aislados y los efectos directos de condiciones que pueden inducir la protección, así como de agentes con potencial efecto cardioprotector o cardiotoxico sobre la supervivencia celular son limitados, en parte por la dificultad de obtener y mantener en cultivo cardiomiocitos primarios (**Gómez**, 1997; **Ladilov**, 1998; **Arstall**, 1998).

La viabilidad celular es uno de los indicadores finales estándar que se ha utilizado como una medida del efecto de la lesión celular de la isquemia y la toxicidad cardíaca, así como de la acción protectora de agentes exógenos (**Vander Heide**, 1990; **Ohata**, 1994; **Armstrong**, 1997). Varios ensayos de viabilidad de cardiomiocitos se han utilizado para determinar la supervivencia de los cardiomiocitos adultos. En general, se encuentra concordancia entre los diferentes ensayos; sin embargo, sólo unos pocos sistemas de evaluación de la viabilidad cubren varios aspectos de la lesión cardíaca, tales como cambios metabólicos y morfológicos, que se pueden lograr con el examen simultáneo de la integridad de la membrana y del citoplasma, en el transcurso del tiempo (**Vidal**, 1996; **Gómez**, 1997; **Zarvazyan N**, 1998; **Andersson**, BS, 1999).

Por otra parte, recientemente se ha encontrado que un número de microRNAs (miRNAs) funcionan en el corazón. Los miRNAs son moléculas de RNA endógenos de ~21-25 nucleótidos que regulan la expresión a nivel postranscripcional por hibridación en regiones 3' de mRNA diana. Su expresión es específica de tejidos y regulan la expresión de genes que participan en viabilidad, proliferación y diferenciación celular, entre otros, por medio de un mecanismo de interferencia de miRNAs que representa una de las más recientes adiciones a la complejidad que caracteriza el procesamiento de la información entre el núcleo y el citoplasma en la regulación de la transcripción y de la traducción (**Ambros**, 2004, **van Rooij**, 2007).

Investigaciones recientes en miRNAs han proporcionado un mejor conocimiento sobre el circuito genético integrado, que

define procesos celulares básicos como la diferenciación, la viabilidad, la proliferación, la apoptosis, que cuando son alterados pueden asociarse con la patogénesis de enfermedades como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (**van Rooij**, 2007, **Hofsli**, 2013). La amplia distribución de este novedoso mecanismo, el cual controla la expresión genética y el paradigma aceptado de que las enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, son entidades multifactoriales, que resultan de una compleja interacción entre genes y ambiente sugieren un ligamiento entre procesos dependientes de miRNAs y enfermedades crónicas. De hecho, ya se ha demostrado la expresión alterada de miRNAs en el proceso tumorigénico (**Babashah**, 2011, **Hofsli**, 2013).

En contraste con el cáncer, muy poco se ha explorado sobre los perfiles de expresión de miRNAs en enfermedades cardiovasculares para descubrir si están alterados y puedan constituirse en moléculas que estén involucradas en estas enfermedades. Recientemente se encontró que los microRNAs *miR-1* y *miR-133* regulan la expresión de los genes *KCNJ2* y *GJA1* que codifican para la subunidad Kir2.1 de un canal de potasio y la conexina 43 respectivamente y participan en la homeostasis eléctrica del miocardio y en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (**Jang**, 2007, **van Rooij**, 2007). Sin embargo, actualmente no se sabe de manera suficiente cuales miRNAs son expresados en células cardíacas aisladas y menos aun si participan en la viabilidad y protección contra la isquemia.

Nuestra hipótesis de trabajo, es que las células cardíacas responden y se adaptan a condiciones de lesión y se pueden proteger contra la isquemia por preacondicionamiento isquémico y que éste fenómeno puede estar regulado por RNA no codificante, tal como el RNA corto, incluyendo a los miRNAs reguladores de la expresión y estabilidad de genes específicos.

El objetivo de este trabajo fue examinar la viabilidad de cardiomiocitos aislados individuales en tiempo real, en células cardíacas adultas aisladas individuales sometidas a condiciones de lesión por isquemia simulada o exposición a dinitrofenol y a protección por preacondicionamiento isquémico o adenosina y comparar perfiles de expresión de miRNAs asociados con el preacondicionamiento de las células cardíacas aisladas.

Una evaluación simultánea de cambios en la morfología, en la actividad metabólica de los cardiomiocitos, en tiempo real, así como la identificación y cambios en expresión miRNAs asociados en cardiomiocitos preacondicionados, tienen el potencial para ser utilizados como una herramienta de investigación y bioprospección de nuevos medicamentos y de terapias con potenciales propiedades cardioprotectoras.

Materiales y Métodos

Aislamiento de los cardiomiocitos adultos

Células cardíacas ventriculares tolerantes al calcio fueron aisladas mediante disociación enzimática (**Gómez**, 1997). En breve, cobayos adultos (200-300 g) se anestesiaron con pentobarbital (12 mg/100 g de peso, vía intraperitoneal). Tras la cardiectomía, el corazón fue perfundido retrógradamente / a 37 °C) con: medio 199 (Sigma, St Louis MO, EE.UU.) durante 2 a 3 minutos para eliminar la sangre, seguido de perfusión con Ca^{2+} + EGTA-buffer "medio bajo en Ca^{2+} " (Potencial de calcio 7) por 180-240 s, que contenía (en mM): NaCl 100, KCl 10, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 5, glucosa 20, taurina 50, 10 HEPES (pH 7.2 hasta 7.4) y finalmente con medio bajo en Ca^{2+} que contenía (en P / v) pronasa E (0,8%, Sigma), proteinasa K (1,7%, Promega, Madison WI, EE.UU.) albúmina bovina (0,1%, fracción V, Sigma) y 200 mM de CaCl_2 . Los ventrículos se separaron de las aurículas y se cortaron en pequeños fragmentos (6-10 mm³) en el medio bajo en Ca^{2+} . Por último, las células individuales fueron aisladas por agitación del tejido (a 37 °C) en la misma solución suplementada con colagenasa (0.025mg/ml, Sigma). Después de 20 min, las células se filtraron a través de un filtro de nylon, se centrifugaron (a 35xg) y se lavaron dos veces con la solución baja en Ca^{2+} . Fragmentos de tejidos restantes fueron re-expuestos a la colagenasa y el aislamiento se continuó durante tres ciclos. Para obtener una preparación enriquecida de miocitos ventriculares en reposo, con forma de bastón, las células de forma redonda y los desechos fueron separados mediante centrifugación diferencial y decantación (Jacobson, 1989). Los cardiomiocitos aislados se almacenaron en una solución de Tyrode (en mM) Glucosa 5,5, NaCl 136,5, KCl 5,4, MgCl_2 0,53, HEPES 5,5 y CaCl_2 1,8 y luego se visualizaron usando un microscopio invertido (Nikon) y se tomaron microfotografías (Nikon Digital Sight DG U3). Los experimentos se realizaron con la aprobación del Comité Institucional para el empleo y cuidado de animales del Instituto Nacional de Salud de Colombia.

Isquemia simulada y preacondicionamiento isquémico

Se empleó un modelo de isquemia simulada letal (**Armstrong**, 1994) que se logra por la superposición de los cardiomiocitos (n=2.000) adultos aislados de cobayo (*Cavia porcellus*) compactados en un precipitado celular y cubiertos con aceite mineral, para reducir el intercambio gaseoso a 37 °C. El preacondicionamiento se logró exponiendo las células cardíacas aisladas del mismo grupo (n=2.000) a periodos breves de lesión por hipoxia (1% de O_2) alternada con periodos cortos de suspensión en condiciones de normoxia (21% de O_2) en una secuencia y tiempos previamente estan-

darizados (10 min en hipoxia, 1 min en reoxigenación, 10 min hipoxia, 9 min de reoxigenación), como se indica en la Figura 3.

Evaluación de la viabilidad de las células cardíacas

Morfología y exclusión del Tripán azul

El número células se estimó usando un hemocitómetro y el ensayo de la exclusión del Tripán azul fue utilizado para correlacionar la morfología con la viabilidad cuando se indique. La viabilidad celular de cardiomiocitos aislados individuales se evaluó mediante el recuento de las células que excluían el Tripán azul (0,25%) (Gomez, 1997). Las células individuales se clasificaron en uno de los siguientes tres grupos fenotípicos: (1) Células en forma de bastón con clara forma alargada con estriado de sarcómeras definidas, membrana celular lisa y regular, que excluían el Tripán azul; (2) Células de forma redonda sin estrías claras y contractura aparente, que incluían el azul tripán, y (3) Células de forma rectangular, con estrías y superficie regular, que excluyeron el azul tripán. Estas distinciones fueron hechas porque los cardiomiocitos maduros típicos poseen un sarcolema intacto, tienen forma de bastón y son de aspecto rectangular, y se consideran viables, mientras que cuando los cardiomiocitos se dañan, se acortan y luego se hiper-contraen, dando la apariencia de células en forma redondeada y no se consideran viables (Hayashi, 1995, Gomez, 1997, Sarvazyan, 1998).

Reducción del MTT

La viabilidad de células cardíacas individuales también se cuantificó por medición de la formación de un producto de formazán de color morado, resultado de la reducción, de la sal de metil tiazol tetrazolio (MTT, Bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium]) de color amarillo, por reductasas celulares (Mosmann, 1983; Carmichael, 1987). El ensayo se basó en el método descrito en cardiomiocitos ventriculares adultos con pequeñas modificaciones (Gómez, 1997). En breve, un número conocido de células cardíacas aisladas fue distribuido al azar y se dispersó homogéneamente en cubreobjetos de vidrio y se sembró en un sistema de perfusión de bajo volumen (20X20x1mm³) diseñados especialmente para aplicar el MTT y los compuestos para diferentes protocolos experimentales. Los cardiomiocitos aislados se visualizaron utilizando un microscopio (Nikon Digital Sight DG U3) y el MTT se añadió a diferentes concentraciones. La morfología celular y el desarrollo del color morado, asociado con la formación del producto formazán, fue seguido en tiempo real durante 60 minutos. Este período de incubación se utilizó para el posterior análisis morfométrico y de intensidad del color de cada cardiomiocito, mediante microscopía de luz, procesamiento y

análisis digital de las imágenes. El ensayo de producción de formazán también se llevó a cabo mediante la medición de la cantidad de producto de reacción disuelto en DMSO (15% V / V) por el cambio de absorbancia a 540 nm de longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU64. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21 ± 2 °C). De esta manera, el diseño experimental utilizó la actividad de MTT reductasa, presente y cuantificable en las células viables, pero ausente en las células no viables (Gómez, 1997).

Procesamiento y análisis digital de imágenes

El procesamiento de imágenes consistió en la comparación de las imágenes de la misma célula en condiciones distintas en el tiempo. La actividad de MTT reductasa y la morfología se midieron en los cardiomiocitos individuales intactos expuestos a diversas condiciones experimentales y los cambios se visualizaron y se siguieron en el tiempo durante 45-60 min. Después de la adquisición de las imágenes digitales de los cardiomiocitos individuales se procesaron para realizar el análisis morfométrico y describir la distribución espacial de la producción de formazán. La actividad MTT reductasa y la morfometría se expresaron con referencia a los valores registrados en las condiciones de partida del control y con el mismo grupo de células.

El diseño experimental se planeó de manera que la misma población de células sirvió como su propio control interno. La lesión química de los cardiomiocitos fue inducida por la exposición de las células cardíacas aisladas puras en solución de Tyrode suplementada con 2,4-dinitrofenol (DNP, 0-500 µM), que fue empleado como control de lesión celular. Las soluciones se prepararon con base en la solución de Tyrode que contenía (en mM) NaCl 136,5, KCl 5,4, MgCl₂ 0,53, HEPES-NaOH 5,5 (pH 7,4), suplementado con CaCl₂ 1,8 mM y glucosa 5,5 mM, el pH se ajustó a 7,4. El DNP se disolvió en DMSO, de tal manera que la concentración final de DMSO no excedió 0,1%, una concentración que no afecta a la integridad de los cardiomiocitos (Gómez, 1997). La isquemia simulada se indujo por incubación de los cardiomiocitos en 5% de CO₂ (37 °C, 60 min). Como otro control del efecto cardioprotector, el mismo grupo de células cardíacas se expuso a una solución de Tyrode que contenía 1 mM de adenosina (Gómez et al 1997). Placas de cultivo de tejidos se obtuvieron de Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania). Todos los productos químicos para el cultivo de los cardiomiocitos fueron de grados analíticos y adquiridos de Sigma (St Louis, MO, EE.UU.) a menos que se indique lo contrario. Todas las sustancias se prepararon como soluciones madre concentradas y diluidas a concentraciones finales, antes de realizar los experimentos.

Perfil de expresión diferencial de *microRNAs*

El análisis de hibridación diferencial de miRNAs se realizó empleando el estuche de microarreglos (micromatrices) de miRNAs (miRCURY LNATM microRNA Array, EXIQON, Vedbaek-Dinamarca) que contiene 3100 sondas de captura, complementarias a humano, ratón y rata y sus secuencias virales relacionadas. En breve: Primero se realizó la purificación y marcaje de los RNA pequeños. Para esto, el RNA total se obtuvo de las células cardiacas aisladas, en condiciones de lesión y protección por preacondicionamiento isquémico, como se describió arriba. De acuerdo con protocolos proporcionados por el fabricante, $2 \cdot 10^6$ células se lavaron con solución tyrode y el RNA total fue extraído por medio del reactivo Trizol (Life -Technologies). El DNA genómico, potencialmente contaminante de la fracción de ARN, se eliminó usando DNasa I libre de RNasa (Ambion, Austin, TX).

El RNA obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro midiendo la densidad óptica a 260 nm de longitud de onda. Se utilizó el RNA con base en su integridad y si la relación A260 / A280 fue de 1,8-2,0 como criterios de alta calidad de preparación de ARN. La integridad del ARN se evaluó mediante visualización en gel de agarosa (1%) de bandas intactas de 28S y 18S ARN ribosomal (ARNr) que migró a aproximadamente 5 y 1,9 kb, respectivamente (datos no mostrados). Debido a las características del RNA de bajo peso molecular (sRNA) y su baja abundancia, los protocolos estándar para aislamiento de ARN total y ARNm no son óptimos para recuperación de moléculas sRNA y pueden conducir a la pérdida importante de miRNAs y otros sRNAs. Por lo tanto, el enriquecimiento de sRNA fue un paso importante para la medición de la expresión relativa de los miRNAs. Para esto se usó el estuche de aislamiento de miRNAs (Cat # 1560, Ambion, Austin, TX) que facilitó el enriquecimiento de especies de RNA de bajo peso molecular (200 nt y más pequeños).

Las reacciones de marcación de ARN se realizaron con el estuche de marcación de miRNAs (Cat # AM-1562, Ambion, Austin, TX). En breve, la reacción de marcación contenía 500 ng de RNA (de bajo peso molecular < 200 nt) o 500 ng sRNA (< 40nt), 0,5 mM de ATP, 50 mM de Hepes (pH 7,8), DTT 5 mM, 20 mM de $MgCl_2$, 150 mg / ml de PEG, 10 mg / ml de BSA, 10 % DMSO y 1.000 ng de 50 -Biotina con 3 unidades Weiss de T4 ARN ligasa. La reacción de marcaje se incubó a 37 °C durante 2 h. La eficiencia de la marcación fue similar (70%±5% y 69% ±6%) y el RNA marcado se usó para hibridar dos matrices de miRCURY LNA^{MT} microRNAs (micro-matriz 7th generación, humano, ratón y rata de Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) que contenía sondas de captura para 3100 diferentes especies de miARN.

La hibridación de las micro-matrices de miRNAs se realizó en una solución que contenía (5x · SSC, 1 % de BSA, 0,2 % de SDS, 15 % formamida y 1 % solución de Denhardt y desnaturalizado por calentamiento durante 3 min a 95 °C, y enfriado en hielo (2 min) antes de la hibridación. Después de colocar las matrices en la estación de hibridación (HS 400 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz), 30 µL de la mezcla de hibridación se inyectó en la cámara de hibridación que permite una separación de las micro-matrices y la dispersión del solución de hibridación entre las matrices de miRNAs. Con control de temperatura y agitación con el fin de facilitar el flujo de la solución entre el chip de miRNAs. El tiempo total para la hibridación fue de 16 horas.

Cuando se terminó la hibridación, las micro-matrices se lavaron una vez en 2X SSC, 0,2 % SDS y tres veces en 0,2X SSC a 42 °C. La detección de las sondas de hibridación marcadas con biotina se realizó con un complejo Streptavidina-Isotiocianato de fluoresceína (dilución 1:500 en solución de bloqueo (3 % BSA/PBS con previo bloqueo de las micro-matrices (3 % BSA/PBS por una hora). Después de tres lavados con PBS a 21 °C las matrices se secaron y se protegieron de la luz. Inmediatamente, las matrices fueron leídas en un escaner de fluorescencia (PowerScannerTM, Tecan Männedorf, Schweiz) para obtener las señales de fluorescencia. Después de realizar la adquisición de las imágenes de las micro-matrices en archivos digitales con el programa Array-Pro® Analyzer se determinaron los niveles de expresión relativos de 15.840 miRNAs, previa normalización de los datos. En breve, a cada una de las intensidades de las señales se les sustrajo el ruido de fondo y se calculó el valor medio de cuatro replicas de cada miRNA en la misma matriz. Los datos se normalizaron con respecto a controles internos y externos (RNA pequeño U3 y los *Spike-in* miRNA Kit V2, Exiqon). El nivel de expresión de cada especie miRNA se informó como el \log_2 de la relación de las intensidades de fluorescencia con respecto a los controles.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias ± SEM, con **n** que se refieren al número de experimentos. El análisis de regresión lineal se realizó mediante el OriginPro Software 7.0 (OriginLab Corp. Northampton, MA, EE.UU). La significancia estadística de las diferencias entre los dos promedios se determinó con la prueba de la t de Student para observaciones pareadas o no pareadas según el caso y el análisis de la varianza (prueba de ANOVA de una vía) cuando se compararon más de dos grupos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Para el análisis de la expresión diferencial de los miRNAs y para otorgar igual valor a los miRNAs que aumentaron o disminuyeron los niveles re-

lativos de expresión, se comparó el logaritmo en base 2 de la proporción entre los promedios de las intensidades de fluorescencia de cada miRNA en cada grupo experimental. Se usó el programa TIGR MeV (<http://www.tigr.org/software/tm4>). miRNAs expresados que cambiaron significativamente en respuesta a cada condición experimental (n=4) fueron determinados basados en la T-test. Se consideró como valor crítico de $P < 0.05$, según la distribución-F y un 95% de intervalo de confianza.

Resultados

Actividad MTT reductasa de cardiomiocitos medida en células individuales por el procesamiento de imágenes de células individuales y por la densidad óptica por espectrofotometría

Para determinar que el preconditionamiento isquémico se podía obtener y evaluar en cardiomiocitos aislados e individuales, fue necesario evaluar si la reducción de la sal de tetrazolio, MTT se podía detectar y medir en una sola célula cardíaca individual. Para esto, células cardíacas ventriculares aisladas en forma de bastón y en reposo, se expusieron a diferentes concentraciones de MTT en solución Tyrode (concentraciones finales desde 0.025 a 4 mM) y se monitorearon los cambios de color asociados a la producción de formazán durante 45 minutos por microscopía de luz y procesamiento de imágenes digitales en tiempo real. La reducción de la sal de tetrazolio se asoció consistentemente (n = 30) con el desarrollo de cristales microscópicos de un color azul oscuro dentro de 1-2 min. Los cardiomiocitos ventriculares experimentaron con el tiempo, un aumento progresivo de formazán azul derivado de la actividad MTT-reductasa intracelular [Figura. 1 (a)]. Este aumento fue significativo cuando se compararon los valores de formazán obtenidos a los 5, 10, 20, 30, y 45 minutos ($226,9 \pm 9,52$; $188,2 \pm 13,5$ y $14,4 \pm 15,0$ unidades de intensidad, medida en escala de grises de 0-255) [Fig. 1 (b).] La intensidad de grises, IG, también fue una función de la concentración del MTT ($112,0 \pm 19,4$; $120,7 \pm 21,2$; $122,1 \pm 17,4$; $123,5 \pm 17,6$; $120,7 \pm 13,9$ y $113,0 \pm 19,3$ unidades de densidad óptica cuando los cardiomiocitos fueron expuestos a 0.025; 0,5; 1,0; 2,0; y 4,0 mM, de MTT respectivamente (datos no ilustrados).

La reducción de MTT se llevó a cabo selectivamente por los cardiomiocitos en forma de bastón y bajo nuestras condiciones experimentales, el nivel formazán intracelular más alto se produjo dentro de 30 min (n = 50) de inicio de la exposición al MTT. Más de 99% de los cardiomiocitos de forma redonda no desarrollaron los cristales de formazán detectables al microscopio de luz y se observó menos pronunciada la coloración azul oscuro asociada a la producción de formazán en menos del 1% de las células de forma redonda ($220 \pm 19,4$, n = 45).

El ensayo MTT clásico evalúa la actividad de reducción del MTT medida por densidad óptica del formazán producido por grupos de células y es un método confiable para evaluar la viabilidad de las células cardíacas (Gómez, 1997). Basándose en las propiedades colorimétricas de la reducción de MTT, se investigó la relación entre las medidas espectrofotométricas de la formación de formazán de células viables con forma de bastón, expresada en densidad óptica (DO a 540 nm) y las mediciones de la intensidad de color de la actividad MTT reductasa de una sola célula. Los valores obtenidos después del procesamiento de imágenes se expresaron en niveles de intensidad de grises, en una escala de 0-255 niveles). Las diluciones de las células se realizaron en medios incoloros utilizando varias preparaciones de cardiomiocitos; cada una derivada de diferentes corazones adultos de cobayos. Las reacciones de formación de formazán se llevaron a cabo en experimentos separados con un número de células conocido (3000) por cuadruplicados; la incubación de los cardiomiocitos se realizó en una solución con MTT (2 mM). El color azul oscuro cuantificable se desarrolló durante 45 min y se cuantificaron usando un espectrofotómetro y el procesamiento de imágenes [Fig. 1 (b)]. Se detectó un aumento de la absorbancia de $0,2 \pm 0,0038$ a $0,591 \pm 0,0358$ unidades de densidad óptica cuando 3,000 cardiomiocitos en forma de bastón se evaluaron en el intervalo de 5 a 45 minutos [Fig. 1 (b), los cuadrados], y un cambio en los valores de niveles de grises de $220,3 \pm 7,7$ a $150,4 \pm 14,4$ niveles cuando se evaluó la actividad de una única célula en forma de bastón en el mismo período de tiempo [Fig. 1 (b), diamantes llenos]. Las densidades ópticas y los valores de grises para el producto formazán mostraron una relación similar. Para definir los valores de intensidad de grises, medidos por el análisis de imágenes, en relación con el cambio en las unidades de densidad óptica, medidas por espectrofotometría, se utilizó el análisis de regresión lineal para ajustar los datos y este análisis mostró una alta correlación lineal ($r^2 = 0,99$; $p = 0,001$) [Fig. 1 (c)], lo cual es esencial para la estimación confiable de la viabilidad de una única célula por el procesamiento de imágenes en tiempo real.

La relación entre OD por espectrofotometría y los valores de intensidad de grises del formazán obtenido en todas las poblaciones de células en 30 corazones probados, se mantuvo lineal. El valor más bajo detectable para la producción de formazán fue de alrededor de 0.011 unidades de DO (n = 30), producto de 50-70 células después de 90 minutos de exposición al MTT, mientras que el valor mínimo detectable para la producción de formazán fue $220,3 \pm 7,7$ niveles de intensidad de grises (n = 45) producto de una única célula después de 5 minutos de exposición al MTT.

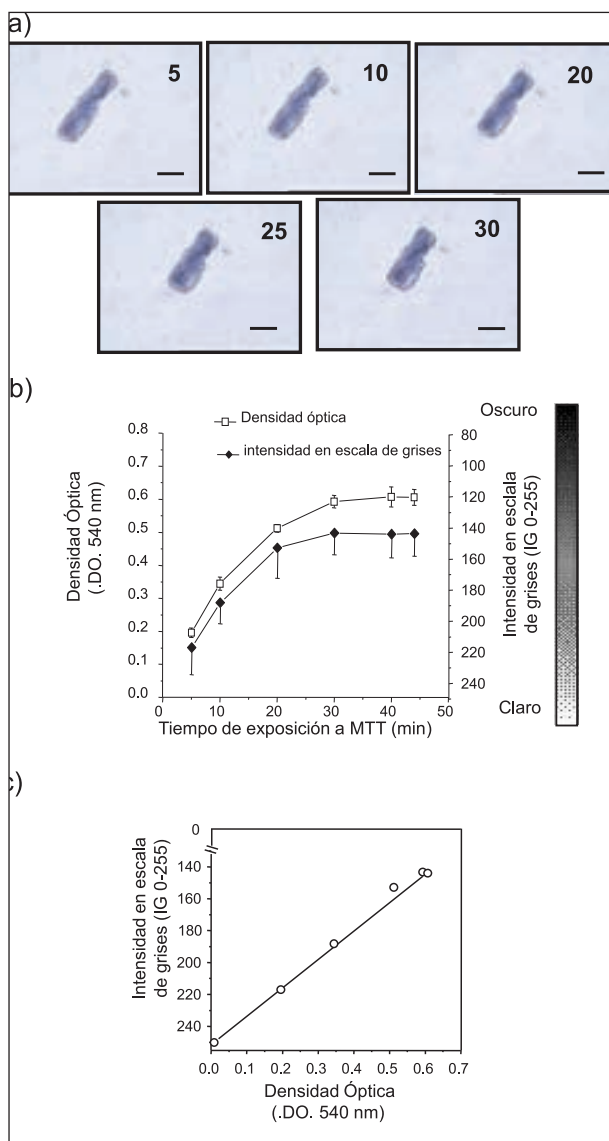


Figura 1. Actividad de MTT reductasa y patrón temporal de la producción de formazán, lo que refleja la reducción intracelular de MTT. La actividad MTT reductasa fue visualizado en los miocitos ventriculares de cobayo en una estación de trabajo de análisis de imágenes ópticas durante 45 min. (A). imágenes representativas de la secuencia de imágenes obtenidas por microscopio de luz de un cardiomiocito aislado individual a los 5, 10, 20, 25 y 30 min de exposición al MTT. Las barras horizontales representan 30 micras. (B). Actividad de MTT reductasa de cardiomiocitos medida con espectrofotómetro y con el análisis de imágenes ópticas digitales. Relación entre el tiempo de exposición MTT y la densidad óptica (DO absorbancia a 540 nm) (cuadrados) (n = 4). (C) Una relación similar se obtuvo con el análisis y procesamiento de imágenes digitales (intensidad de grises en una escala 0 a 255 siendo 255, el nivel más claro y 0, el nivel más oscuro) (línea recta) (n = 45), coeficiente de correlación lineal ($R^2 = 0.9869$).

Efecto del DNP y la Adenosina sobre la viabilidad, la actividad MTT reductasa y la longitud de células cardíacas individuales

Como controles experimentales para evaluar el efecto de lesión o la protección celular, se evaluó el efecto del DNP y la Adenosina sobre la viabilidad de cardiomiocitos aislados empleando el ensayo de Tripán azul y el procesamiento de imágenes en tiempo real para monitorear los cambios en la morfología y en la actividad MTT reductasa de en una célula cardíaca individual durante 50 min. Células ventriculares individuales en reposo expuestas a DNP (50-500 μM) experimentaron cambios en la longitud de la célula afectada. También se observaron cambios en la actividad MTT reductasa intracelular (Fig. 2). Después de la adición de DNP (100, 200, 300, 400 y 500 μM), el acortamiento celular aumentó alrededor de $42,1 \pm 7,1\%$, n = 5; $45,6 \pm 5,8\%$, n = 10; $47,1 \pm 10,75\%$, n = 6; $48,6 \pm 11,07\%$, n = 11 y $56,2 \pm 8,2\%$, n = 11, respectivamente. Sin embargo, cuando los cardiomiocitos fueron expuestos a bajas concentraciones de DNP (12,5 y 50 μM) no se observaron cambios significativos ($p < 0,05$, n = 15) en la longitud ($2,9 \pm 2,2$ y $2,0 \pm 0,8\%$, respectivamente) y en la morfología celular, incluso después de 50 min de exposición y toma de imágenes en tiempo real, de una manera similar a los cardiomiocitos no expuestos [Fig. 2 (a)], paneles de 0 y 50 μM). Aunque el acortamiento alcanzó una meseta relativamente constante ($60 \pm 4,6\%$) en $20 \pm 4,7$ min, las concentraciones más altas de DNP promovieron el más rápido grado de acortamiento celular, es decir, en 100 μM de DNP se observó una disminución detectable en la longitud de la célula, que se inició a $6,5 \pm 4,7$ min, en comparación con $7,3 \pm 3,7$ min; $10,9 \pm 4,6$ min y $11,6 \pm 3,1$ min a concentraciones de 200 [(Fig. 2 (b)), 300 y 500 μM DNP, respectivamente (n = 10 en cada caso).

La producción de formazán estimada y evaluada por el procesamiento de imágenes fue significativamente menor en los cardiomiocitos expuestos a DNP 10 min ($158,8 \pm 17,6$ niveles de intensidad de color n = 9) en comparación con los no expuestos ($136,9 \pm 16,8$ n = 45, $p < 0,01$). La intensidad del color disminuyó progresivamente a medida que el tiempo de exposición al DNP se incrementó en cada uno de los 40 cardiomiocitos analizados. Después de 45 minutos de exposición al MTT, las intensidades del color expresadas en niveles de grises fueron $158,8 \pm 17,6$; $172,7 \pm 20,3$; $192,2 \pm 23$ y $189,3 \pm 23$ para cardiomiocitos expuestos a DNP 200 μM durante 10, 30, 60 y 120 min, respectivamente [Fig. 2 (c) y 2 (d)]. El perfil de la viabilidad celular, derivada de la morfología y la actividad de la reductasa de MTT, usando el sistema de procesamiento de imágenes en tiempo real, fue similar a la obtenida usando el ensayo de exclusión del tripán azul [Fig. 3 (e)].

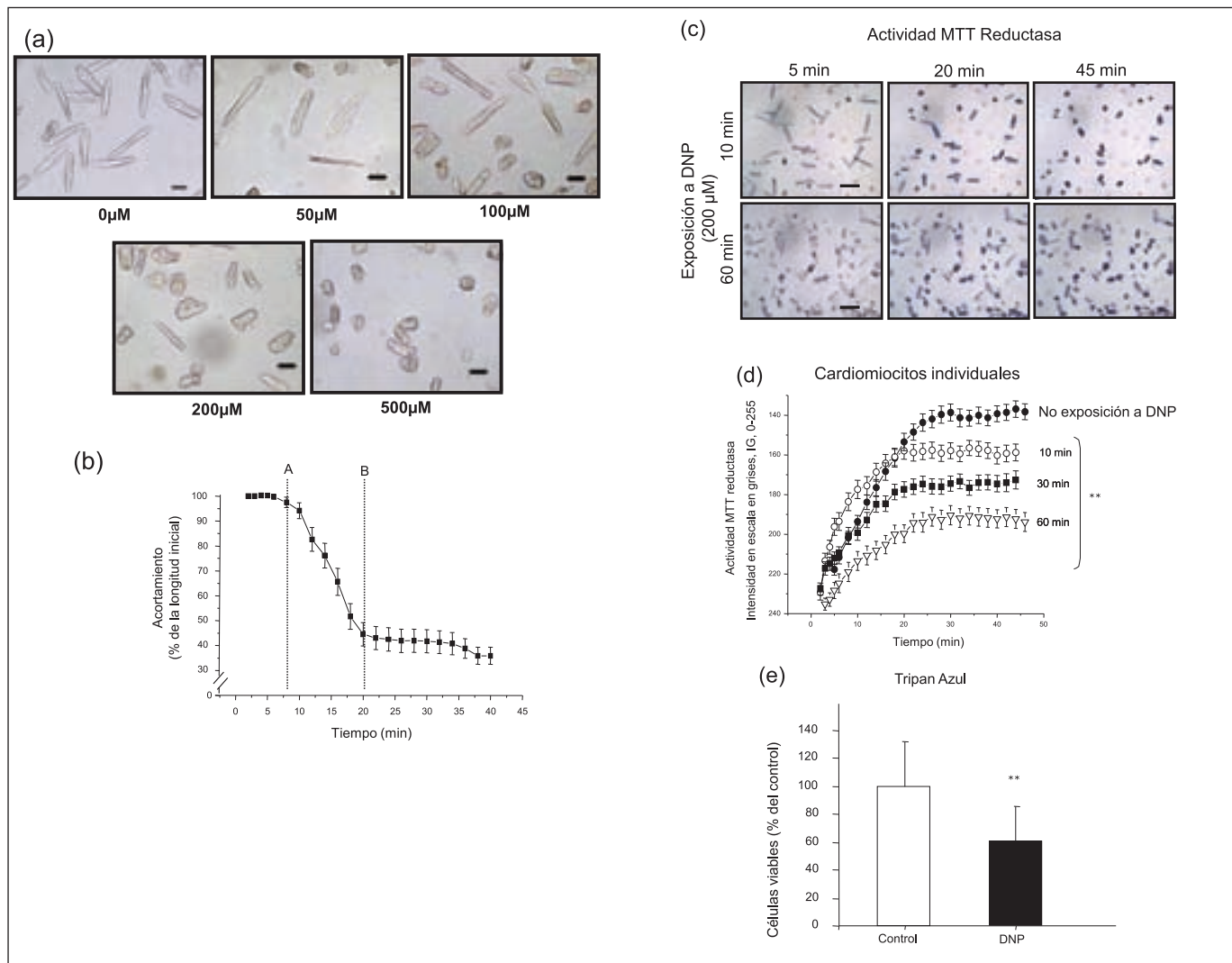


Figura 2. Efecto de DNP en la supervivencia de los cardiomiocitos. Cardiomiocitos, en Tyrode (con calcio y glucosa) sin ningún agente (0 μM) y con el Dinitrofenol, DNP. (A). La morfología celular como una función de las concentraciones de DNP (0-500 μM). Las barras horizontales representan 30 micras. (B). La morfología celular como una función de tiempo (5-45 min, DNP 200 μM). Las barras horizontales representan 30 micras. (B). Acortamiento celular cuantificado de forma paralela por el procesamiento de las imágenes digitales, longitud medida cada 2 min durante el tratamiento con DNP que promovió el acortamiento celular. Los datos de cada punto representan la media ± SEM (n = 11). (C). Este panel muestra la actividad MTT- reductasa de cardiomiocitos individuales con DNP 200 μM durante 10 y 60 min. Las barras horizontales representan 30 micras. (D) Este panel muestra la actividad MTT - reductasa celular en función del tiempo DNP (200 μM) se promueve la muerte celular y la disminución en la producción de formazán 2-45 min de observación en tiempo real, siendo significativa desde los 10 min (** n = 9, p < 0,01). (E). Evaluación de la viabilidad por el ensayo de tripán azul, de los cardiomiocitos sin exposición (Control) y expuestos a DNP (200 μM) durante 45 minutos. Los datos representan la media ± SEM (n = 10), ** diferencias significativas, p < 0,01).

Como control experimental para evaluar el efecto de protección celular, se evaluó el efecto de la Adenosina (1 mM) sobre la viabilidad de cardiomiocitos aislados y los resultados fueron similares a los ya informados (Gómez, 1997; Jova-

novic, 1998; Vinten-Johansen, 1999), específicamente que la adenosina proporciona una protección de los cardiomiocitos contra la hipoxia [Fig. 3 (b)].

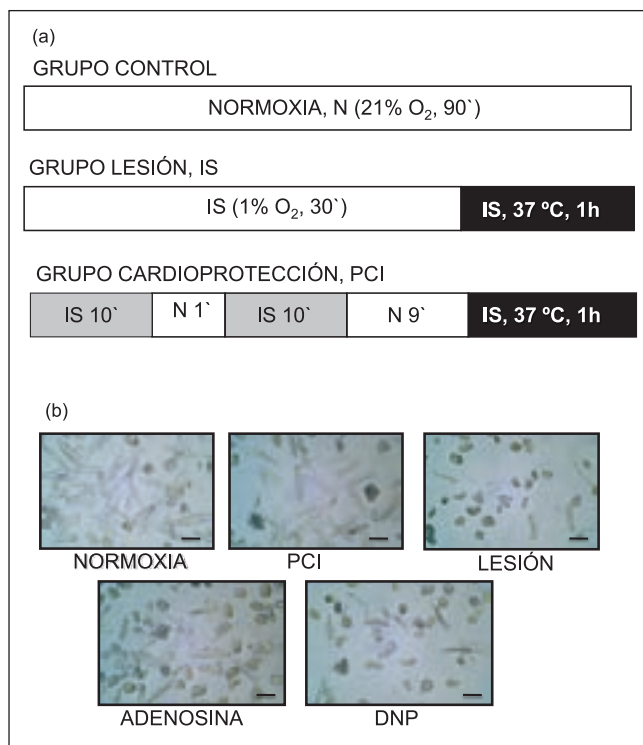


Figura 3. Protocolo de inducción del preacondicionamiento isquémico en cardiomiocitos ventriculares aislados. (A). Grupo Control. Cardiomiocitos expuestos a una atmósfera de oxígeno gaseoso O₂, indicado en %. Grupo Lesión, IS: Cardiomiocitos expuestos a isquemia simulada inducida por precipitación celular e interrupción del intercambio gaseoso con aceite a una temperatura de 21 o 37 °C, en donde se indique. N: Resuspensión celular y reanudación del intercambio gaseoso en condiciones de normoxia (21% de oxígeno) y a temperatura ambiente (21 °C). Grupo Cardioprotección: Cardiomiocitos expuestos a periodos intermitentes de isquemia simulada, IS por 10 minutos, normoxia un minuto, IS por 10 minutos y Normoxia durante 9 minutos. El apóstrofe significa tiempo en minutos h= tiempo en horas. El tiempo total de exposición a las diferentes condiciones fue de una hora y treinta minutos. (B) Fotografía de cardiomiocitos ventriculares aislados obtenidas por microscopía de luz. Fotos representativas de cardiomiocitos expuestos durante 45 minutos en condiciones de normoxia, PCI, lesión por isquemia simulada, exposición a Adenosina (1 mM) y a DNP (200 uM). Barras representan 50 micras.

Efecto de la isquemia simulada y del preacondicionamiento sobre la viabilidad de cardiomiocitos aislados

El preacondicionamiento isquémico proporciona una protección de los cardiomiocitos obtenidos de diferentes especies (Gomez, 1997; Jovanovic, 1998; Vinten-Johansen, 1999). Para investigar el efecto de la lesión por isquemia simulada (IS) y preacondicionamiento isquémico (PCI) sobre la viabilidad

de las células cardiacas, miocitos ventriculares individuales fueron expuestos a IS y PCI [Fig. 3] y a continuación, la lesión se indujo por incubación de los cardiomiocitos en 5% de CO₂, 37 °C; 60 min. La condición de PCI afectó significativamente ($p < 0,01$) la actividad MTT reductasa unicelular medida como la intensidad del color en escala de grises, es decir, ($150,5 \pm 10,8$, $n = 40$) en ausencia vs ($113,0 \pm 10,7$, $n = 25$) después del PCI [Figura 4 (a)]. Los cardiomiocitos expuestos a PCI resultaron con un aumento significativo de la actividad MTT reductasa [Fig. 4 (a) y 4 (b)], es decir, $0,0617 \pm 0,009$ unidades de DO ($n = 10$) en células expuestas a PCI y $0,0902 \pm 0,002$ unidades de DO ($n = 10$) en células expuestas a IS [Fig. 4 (c)]. Consistente con lo anterior, la producción de formazán de una sola célula en condiciones de IS fue significativamente menor en comparación con los niveles de formazán desarrollado en cardiomiocitos expuestos a PCI, es decir, ($36,4 \pm 3,0\%$ vs $52,2 \pm 4,2\%$ de niveles de intensidad respectivamente, $p < 0,05$, $n = 25$) [Fig. 4 (b)]. El perfil de la viabilidad celular detectado con la actividad MTT reductasa de poblaciones de células y de células individuales, como consecuencia de las condiciones de IS y PCI, fue similar a la obtenida a partir del ensayo de tripan azul [Figs. 4 (b), 4 (c) y 4 (d)]. Con base en la evaluación de la actividad MTT reductasa, la morfología celular y el ensayo de exclusión del tripan azul, el PCI redujo la pérdida de células viables ($p < 0,05$, $n = 25$; Fig. 4) inducida por el tratamiento con 5% de CO₂, 37 °C; 60 min, una condición de isquemia térmica simulada.

Perfil de expresión diferencial de microRNAs de cardiomiocitos expuestos a PCI

Para caracterizar los perfiles de expresión de miRNAs en cardiomiocitos aislados en condiciones de normoxia y PCI, visualizamos el patrón de expresión de miRNAs mediante el uso de micromatrices en una estación de trabajo Nimblegen, como se describió en materiales y métodos (Fig. 5). Los cambios en la intensidad de fluorescencia después de haber sido normalizadas [Fig. 6 (a)], se registraron como cambios en los perfiles de expresión de miRNAs. Por ejemplo, los niveles de intensidad de fluorescencia fueron medidos para cada uno de los 3100 miRNAs dispuestos en la matriz [Figs. 6 (a) y 6 (b)]. El aumento o disminución de las intensidades de fluorescencia calculados como el \log_2 del cociente de la relación de la intensidad de fluorescencia de los miRNAs en cardiomiocitos expuestos a condiciones de normoxia (21% O₂) y a PCI, se interpretó como cambios en los miRNAs expresados y patrones heterogéneos de las intensidades de fluorescencia detectadas en las matrices y se asociaron con diferencias de los perfiles de expresión de miRNAs, no obstante, para algunos miRNAs se observaron intensidades de fluorescencia similares localizados en diferentes cuadrantes

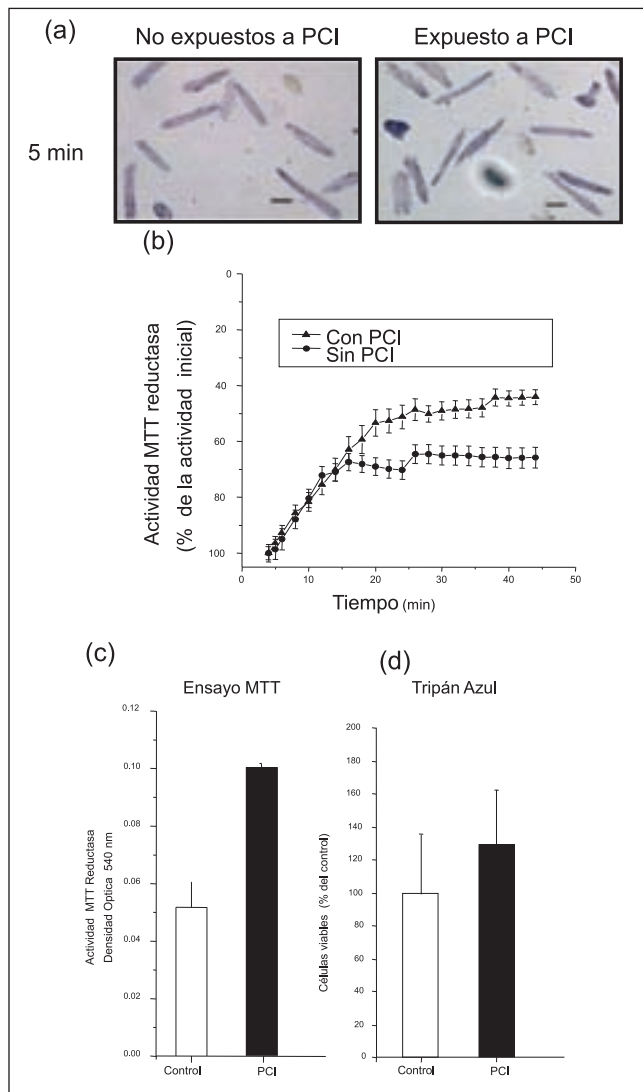


Figura 4. Efecto del PCI en la supervivencia de los cardiomiocitos. Fotografías de cardiomiocitos aislados, en Tyrode (con calcio y glucosa) sin exposición y expuestos a PCI, según el protocolo descrito en materiales y métodos y en la Figura 3. (A). La morfología celular conservada en las células expuestas a PCI. Las barras horizontales representan 30 micras. (B). Este panel muestra la actividad MTT- reductasa de cardiomiocitos individuales con PCI durante 5 a 45 min. en función del tiempo. El PCI promueve la supervivencia celular y el aumento en la producción de formazán 2-45 min de observación en tiempo real, siendo significativa desde los 20 min (** n = 9 , p < 0,01). (C y D). Evaluación de la viabilidad de los cardiomiocitos no expuestos (Control) y expuestos a PCI por el ensayo de actividad MTT reductasa y el ensayo de tripan azul. Los datos representan la media \pm SEM (n = 25), el PCI redujo la pérdida de células viables (p < 0,05, n = 25).

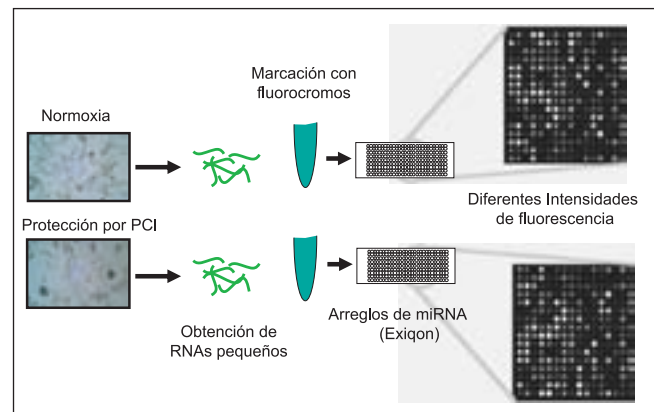


Figura 5. Protocolo para la obtención de los perfiles de expresión de miRNA usando hibridación de micro-matrices de miRNAs. Se extrajo el RNA de bajo peso molecular a partir de cardiomiocitos ventriculares en condiciones de normoxia y PCI, se marcó y se hibridaron las micro-matrices de miRNAs.

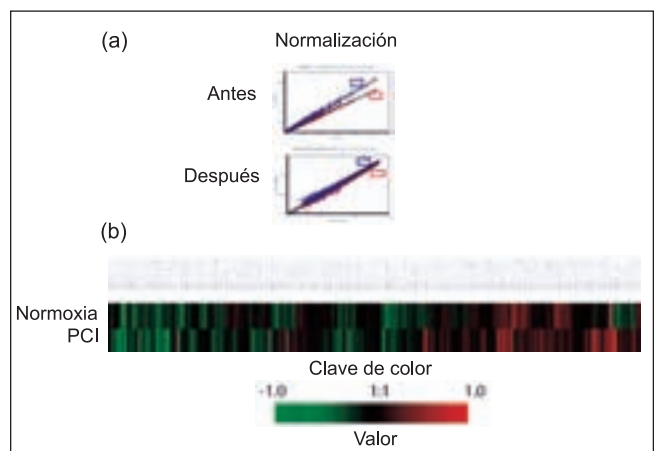


Figura 6. Diagrama del análisis de expresión diferencial de miRNAs en cardiomiocitos ventriculares aislados en condiciones de Normoxia y PCI. El análisis de hibridación diferencial con microarreglos de *miRNAs* se realizó con cDNAs obtenidos de células cardiacas de ventrículos de cobayo (*Guinea pig, Cavia porcellus*) en condiciones de lesión o protección por preacondicionamiento isquémico. Se determinaron los niveles de expresión relativos de 3.100 *miRNAs* (n=4), previa normalización de los datos. Se comparó el \log_2 de la proporción entre los promedios de las intensidades de fluorescencia (Isotiocianato de fluoresceína) de cada *miRNA* en cada grupo experimental (Prueba t, valores de p<0,05). Las filas representan las condiciones experimentales (Normoxia y Preacondicionamiento) y las columnas representan los *miRNAs*. Verde significa expresión disminuida ($\log_2 = -1$). Negro significa expresión similar ($\log_2 = 0$). Rojo significa expresión aumentada ($\log_2 = +1$). Se usó el programa TIGR MeV (<http://www.tigr.org/software/tm4>).

de las micro-matrices [Fig. 6 (b)]. En conjunto, cardiomiocitos aislados de cobayo expuestos a PCI se asociaron con un perfil de expresión diferencial de miRNAs en comparación con los cardiomiocitos en condiciones de normoxia [Fig. 6 (b)].

De las 3100 sondas de miRNAs impresas en las micro-matrices, 238 fueron detectados en los cardiomiocitos en normoxia y en PCI y se asignaron a miRNAs específicos. En total, 62 y 95 miRNAs específicos cambiaron su expresión significativamente en respuesta a cada condición de normoxia y PCI, respectivamente (Cuadro 1). La comparación fue determinada basada en la *T-test*, según la distribución-F, con un valor crítico de $P < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza, después de haber sido normalizados. Algunos los miRNAs expresados diferencialmente en los cardiomiocitos expuestos a PCI, en comparación con los no precondicionados se relacionan en el cuadro 2.

Cuadro 1. miRNAs expresados que cambiaron significativamente en respuesta a la inducción de protección por PCI

Tratamiento	miRNA	miRNA
Normoxia	87	62
Preacondicionamiento	151	95

miRNAs significados para cada tratamiento fueron determinados basados en la T-test. Los valores de P según la distribución-F, valor crítico de $P < 0.05$ y un 95% de intervalo de confianza.

Cuadro 2. Algunos miRNAs expresados diferencialmente en PCI

Aumentaron	No cambiaron	Disminuyeron
hsa-miRNA-409.3p	hsa-miR-508	hsa-let-7d.3p
hsa-3689a-5p	hsa-miR-586	mmu-miR-3473c
hsa-miR-4660.3p	hsa-miR-597	hsa-miR-15b-5
hsa-miR-1908	hsa-miR-181a	hsa-miR-451a
hsa-miR-4507		hsa-miR-379-3p
hsa-miR-4425		hsa-miR-719
hsa-miR-21		hsa-miR-921
hsa-miR-24		hsa-miR-143
hsa-miR-137		
hsa-miR-875		

Con el fin de identificar las posibles vías funcionales mediadas por estos miRNAs expresados diferencialmente y con base en las secuencias de los miRNAs se identificaron algunos potenciales mRNAs objetivos validados de la base de datos miRWalk (Dweep H, 2011). Los 18 miRNAs evalua-

dos (Cuadro 2), resultaron tener mRNAs dianas validados, cuya identidad reveló que las vías predominantes mediadas potencialmente por los miRNAs identificados estaban involucrados en proliferación celular, diferenciación y muerte celular, reparación de daños en el DNA, canales iónicos, así como mRNAs dianas implicados en cambios epigenéticos, siendo este último proceso identificado como particularmente implicado (Fig. 6b, Cuadro 2).

Discusión

En este trabajo se presenta evidencia experimental de que la exposición de miocitos cardiacos aislados de corazones de cobayos, a las condiciones de preacondicionamiento descritas en materiales y métodos y en la figura 3 induce efectos cardioprotectivos actuando de manera directa en la supervivencia de los cardiomiocitos ventriculares. Se muestra que el preacondicionamiento isquémico en cardiomiocitos individuales se puede evaluar mediante el monitoreo de la morfología y de la actividad MTT reductasa en tiempo real, como indicadores simultáneos del estado de viabilidad. También, se presenta evidencia de la expresión diferencial de miRNAs, en cardiomiocitos aislados en condiciones de preacondicionamiento.

Los resultados mostraron que la reducción de la sal de tetrazolium MTT al pigmento formazán es una función del número de células viables presentes. Típicamente, la célula cardiaca viable tiene forma de bastón (10-30 μm de ancho and 80-150 μm de largo), es estriada, íntegra y con actividad metabólica, reflejado por la integridad y regularidad de la membrana celular observada en el microscopio de luz y la reducción del MTT en formazán que se puede cuantificar en las células viables, respectivamente. El cardiomiocito, cuando es lesionado, se acorta, luego se hipercontrae y presenta una forma redondeada (10-30 μm X 40-60 μm) con una contractura miofibrilar y reducción de la actividad MTT reductasa (Gomez, 1997).

La determinación del nivel de viabilidad de células cardiacas individuales mediante la evaluación de la actividad MTT reductasa es común (Carmichael, 1987; Yu, 2013), sin embargo, hacía falta una caracterización más detallada de la reducción del MTT. Especialmente, algunos aspectos importantes son si los cardiomiocitos individuales en forma de bastón, acortados o de forma redonda soportan la reducción de MTT y si la inhibición o estimulación del metabolismo de estas células puede ser discriminado por la actividad MTT reductasa observada mediante el registro en tiempo real, de las secuencias de imágenes de la misma célula viable en forma de bastón y expuestas a condiciones de preacondicionamiento y a la adenosina, dos condiciones informadas que

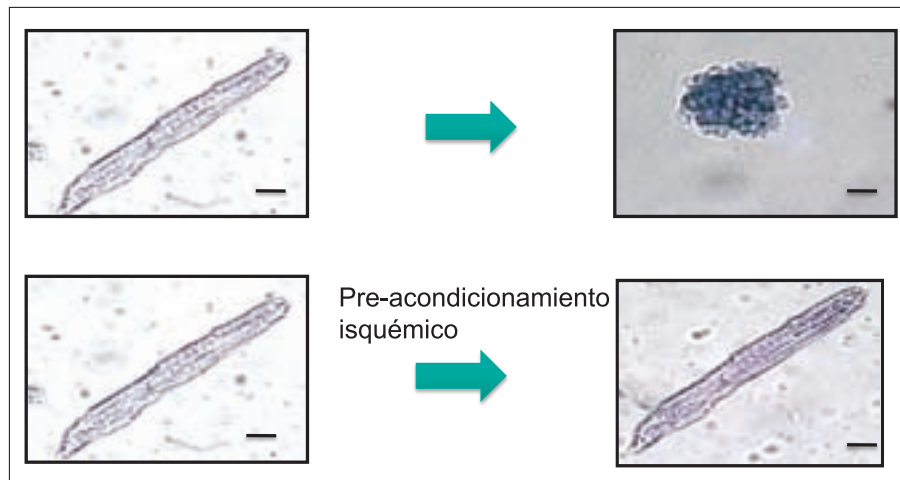


Figura 7. Efecto del preconditionamiento isquémico sobre la viabilidad de cardiomiocitos ventriculares aislados individuales sometidos a isquemia simulada. En los paneles de la izquierda se observa la imagen óptica original de un cardiomiocito ventricular aislado por disociación enzimática y visualizado por microscopía de luz. Observe la morfología y la longitud de las células cardíacas ventriculares aisladas, en forma de bastón, de 108 ± 19 micras, de larga ($n = 45$). En los paneles de la derecha, se observan las células cardíacas después de ser expuestas a IS. Nótese que la célula conserva su forma de bastón cuando es expuesta a PCI (derecha y abajo) a diferencia del cardiomiocito que se lesiona por IS (derecha y arriba), cuando no ha sido sometido a PCI. Selección de una célula cardíaca individual aislada con forma redondeada (con un diámetro de 49 ± 12 micras) y con pérdida de la morfología típica de un cardiomiocito viable. Barra es equivalente a 30 micras.

inducen cardioprotección contra la isquemia (**de Jong**, 1990; **Toombs CF**, *et al* 1992; **Gross**, 1992; **Gómez**, 1997; **Sato**, 2000; **Vinten-Johansen**, 2013), así como a la exposición al 2,4-dinitrofenol (DNP), un conocido inhibidor de la fosforilación oxidativa, que se ha utilizado para simular los efectos de la hipoxia (**Alekseev**, 1997; **Hudman**, 2002).

El examen de la morfología celular y de la actividad de la MTT reductasa de manera simultánea y en tiempo real pueden ser indicadores sensibles, precisos y menos variables para determinar el nivel de viabilidad de estas células, en particular cuando el número de células es muy bajo (**Gómez**, 1997; **Sarvazyan**, 1998) y proporciona evidencia adicional de que el PCI tiene acción citoprotectiva directa sobre los cardiomiocitos promoviendo su supervivencia *in vitro* (Fig. 7). Por lo tanto, una evaluación simultánea de la morfología y actividad metabólica en el tiempo en cardiomiocitos individuales revela el efecto del PCI en células cardíacas aisladas e individuales y tiene el potencial de ser usada como una herramienta de bioprospección de nuevas drogas o diversas condiciones que tengan propiedades de lesión o citoprotección.

La confirmación del efecto lesivo del DNP así como del efecto protectorio directo de la Adenosina y del PCI sobre células cardíacas aisladas e individuales, en ausencia de otros tipos

celulares, tales como células vasculares o nerviosas, mediante el monitoreo de la supervivencia en tiempo real, sugieren que esta aproximación experimental puede servir como una herramienta de tamizaje para determinar los efectos sobre la viabilidad de células cardíacas aisladas expuestas a agentes o a condiciones con propiedades cardioprotectivas o cardioprotóxicas en estudios farmacológicos y biotecnológicos de cardioprotección. Estos podrían incluir, soluciones cardioplégicas, inducción de hipotermia para reducir el metabolismo miocárdico, condiciones para disminuir la demanda de oxígeno. En todos estos estudios está involucrado la evaluación de la inducción o la promoción de la supervivencia celular y la reducción o limitación del daño de las células cardíacas.

Debido a la dependencia de la citoprotección de la naturaleza de la condición experimental a la que los cardiomiocitos se han expuesto y a las limitadas medidas biológicamente relevantes de daño de la célula cardíaca, para evaluar la acción citoprotectora o la eficacia de intervenciones cardioprotectoras, éstas se han basado en la evaluación y seguimiento de los cambios fisiológicos (**Gomez**, 1997; **Jiovanovic**, 1998). Por lo tanto, la evaluación en tiempo real de la actividad MTT reductasa y la morfología puede ayudar a la identificación de sustancias con propiedades de cardioprotección y, de manera específica y precisa evaluar el éxito en la supervivencia celular a nivel de célula cardíaca aislada e individual.

Un enfoque sencillo pero muy valioso, en la evaluación de estas sustancias, implicaría la determinación de efectos específicos sobre la viabilidad de cardiomiocitos individuales antes de su implementación en soluciones de adyuvantes y en ensayos clínicos. Por ejemplo, un efecto de supervivencia más alta después de las exposiciones directas de la célula cardíaca individual indicaría una posible recuperación miocárdica atribuibles a la intervención.

En este trabajo además evaluamos la expresión diferencial de miRNAs, genes reguladores de la expresión genética (Ambros, 2004), en cardiomiocitos aislados. Este trabajo utilizó una herramienta reciente de biotecnología molecular para estudiar el perfil de miRNAs (Castoldi, 2007) en cardiomiocitos aislados expuestos a condiciones de lesión por isquemia y protección por exposición a PCI. Los miRNAs diferencialmente expresados y validados resultan ser moléculas útiles para anticipar cambios en la expresión de genes importantes en la fisiología de las células cardíacas (Hofsl, 2013). La identificación de miRNAs como potenciales marcadores moleculares que regulen la expresión de genes con propiedades cardioprotectoras o cardioprotectoras y que estén implicados en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, como en la isquemia y la falla cardíaca, será clave para estudios dirigidos identificar miRNAs con potencial diagnóstico y terapéutico (Baker, 2013).

La investigación de la expresión de algunos de estos microRNAs en células cardíacas aisladas, con la posibilidad de generar interferencia de la expresión de algunos genes, se espera tenga impacto, no solo en investigaciones básicas, sino también en futuras aplicaciones clínicas (Manne, 2010; Ali, 2011, Baker, 2013). Los resultados obtenidos sugieren que los miRNAs identificados pueden ser potenciales marcadores moleculares de prevención, detección temprana y tratamiento de enfermedades cardíacas (van Rooij, 2012). Este avance en la identificación y caracterización funcional de miRNAs en cardiomiocitos, no solo puede contribuir a establecer una herramienta molecular para avanzar en lo que se ha llamado la genómica de tercera generación para resolver el entrecruzamiento entre Genoma-Transcriptoma-Proteoma-Función (Xie, 2005; Parsons, 2012) y enfermedades crónicas como las cardiovasculares, sino también aporta al conocimiento de genes involucrados en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, como la isquemia y la falla cardíaca y es clave para estudios dirigidos identificar miRNAs con potencial diagnóstico y terapéutico (Small, 2011; Baker, 2013). Los miRNAs expresados diferencialmente en cardiomiocitos identificados en este trabajo pueden ser usados para el estudio funcional de genes reguladores, que contribuyan al estudio de la biología molecular de células cardíacas y de genes que puedan asociarse con la iniciación

o la progresión de las enfermedades cardiovasculares (Yang, 2012).

En conclusión, el preacondicionamiento isquémico en cardiomiocitos aislados evaluado por la supervisión de la morfología y la actividad MTT reductasa, de manera simultánea y en tiempo real, en asocio con la expresión e identificación de miRNAs específicos, que cambian su expresión con el PCI, plantea la importancia de investigar la función de algunos miRNAs bajo condiciones fisiopatológicas de estrés y enfermedad. Adicionalmente, este modelo experimental se puede constituir en un procedimiento de bioprospección guiado por un filtro celular, metabólico y molecular para el estudio de la fisiología y patología de la célula cardíaca, así como para el tamizaje de fármacos, productos naturales o procedimientos con potenciales efectos cardioprotectores o cardioprotectores, encaminados a reducir el riesgo de daño celular y disfunción ventricular.

Limitaciones del trabajo

El monitoreo en tiempo real del preacondicionamiento isquémico cardíaco en células individuales puede haber sesgado favorablemente la interpretación de los cambios asociados con cardioprotección, en parte porque los datos de la función de los cardiomiocitos no estaban disponibles y las células cardíacas podrían exhibir una susceptibilidad heterogénea a la lesión y a la respuesta a condiciones de estrés celular; sin embargo, esto puede ser un valor agregado porque ésta aproximación de evaluar la viabilidad de células cardíacas individuales como parámetro de protección permite la evaluación simultánea de una actividad metabólica y de la morfología de la célula cardíaca individual en tiempo real. Por otra parte, se requieren investigaciones adicionales para validar por PCR en tiempo real la expresión diferencial de miRNAs, así como la identificación y la validación experimental de sus principales dianas moleculares (Xie, 2005; Gomez, 2011) en los cardiomiocitos .

Agradecimientos

Este estudio fue posible gracias al apoyo financiero del Instituto Nacional de Salud y de Colciencias, así como a la vinculación de estudiantes de pregrado y posgrado de la Universidad Nacional de Colombia que apoyaron la ejecución de algunos de los experimentos.

Bibliografía

Alekseev, A. E., Gomez, L. A., Aleksandrova, L. A., Brady, P.A., Terzic, A. Opening of cardiac sarcolemmal KATP channels by dinitrophenol separate from metabolic inhibition. *J Membr Biol* 157:203-214.

- Ali, S., Almhanna, K., Chen, W., Philip, P. A., Sarkar, F. H. 2011. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer *Am J Transl Res* 3:28-47.
- Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 43:350-355.
- Andersson, B. S., Eksborg, S., Vidal, R. F., Sundberg, M., Carlberg, M. 1999. Anthraquinone-induced cell injury: acute toxicity of carminomycin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone in isolated cardiomyocytes. *Toxicology* 135:11-20.
- Armstrong SC. 2004. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 61:427-36.
- Arstall, M. A., Zhao, Y.Z., Hornberger, L., Kennedy, S. P., Buchholz, R. A., Osathanondh, R., Kelly, R. A. 1998. Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 30:1019-25.
- Babashah, S., Soleimani, M. 2011. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer* 47:1127-1137.
- Baker, A. H., van Rooij, E. 2013. miRNA overexpression induces cardiomyocyte proliferation in vivo. *Mol Ther* 21:497-498.
- Buerke M, Weyrich AS, Lefer AM. 1994. Isolated cardiac myocytes are sensitized by hypoxia-reoxygenation to neutrophil-released mediators. *Am J Physiol* 266:H128-36.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942.
- Castoldi, M., Benes, V., Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. 2007. mi-Chip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods* 43:146-152.
- Cohen, M. V., Walsh, R. S., Goto, M., and Downey, J. M. 1995. Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release. *J Mol Cell Cardiol* 27:1527-1534.
- de Jong, JW., Keijzer, E., Huizer, T., Schoutsen, B. 1990. Ischemic nucleotide breakdown increases during cardiac development due to drop in adenosine anabolism/catabolism ratio. *J Mol Cell Cardiol* 22:1065-1070.
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey P., Gretz, N. 2011. miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 5:839-847.
- Gómez, L. A. 2011. Avances científicos y tecnológicos. Genoma humano y salud pública. Segunda edición. Editores: Malagón-Londoño G, Moncayo-Medina A. Salud Pública. Perspectivas. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; p. 615-630.
- Gomez, L. A. 2011. Las enfermedades cardiovasculares: un problema de salud pública y un reto global. *Biomédica* 31:469-473.
- Gomez, L. A., Alekseev, A., E., Aleksandrova L. A., Brady, P., A., Terzic, A. 1997. Use of the MTT assay in adult ventricular cardiomyocytes to assess viability: Effects of adenosine and potassium on cellular survival. *J Mol Cell Cardiol* 29:1255-1266.
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, Ph., Lee P. Lim, L.P., Bartel, D. P. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 27:91-105.
- Gross, G. J., and Auchampach, J. A. 1992. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Cir Res* 70: 223-233.
- Gross, G. J., Hsu, A., Gross, E.R., Falck, J.R., Nithipatikom, K. 2013. Factors mediating remote preconditioning of trauma in the rat heart: central role of the cytochrome p450 epoxygenase pathway in mediating infarct size reduction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 18:38-45.
- Haworth, R. A., Hunter, D. R., Berkoff, H. A. 1980. The isolation of Ca²⁺-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* 12:715-23.
- Hayashi, M., Nasa, Y., Tanonaka, K., Sasaki, H., Miyake, R., Hayashi, J., Takeo, S. 1995. The effects of long-term treatment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hypoxia/reoxygenation injury of isolated cardiac cells in adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 27:2031-2041.
- Hofslie, E., Sjursen, W., Prestvik, W. S., Johansen, J., Rye, M., Tranø, G., Wasmuth, H. H., Hatlevoll, I., Thommesen, L. 2013. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer. *Br J Cancer* 108:1712-1719.
- Hudman, D., Rainbow, R. D., Lawrence, C.L., Standen, N. B. 2002. The origin of calcium overload in rat cardiac myocytes following metabolic inhibition with 2,4-dinitrophenol. *J Mol Cell Cardiol* 34:859-871.
- Jacobson, S. L., Piper, H. M. 1986. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 18:661-78.
- Jovanović, A., Lopez, J. R., Alekseev, A. E., Shen, W. K., Terzic, A. 1998. Adenosine prevents K⁺-induced Ca²⁺ loading: insight into cardioprotection during cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 65:586-591.
- Kang P.M., Haunstetter A., Aoki H., Usheva A., Izumo S. 2000. Morphological and Molecular Characterization of Adult Cardiomyocyte Apoptosis During Hypoxia and Reoxygenation. *Circulation Research* 87:118-125
- Klauke, N., Smith, G. L., Cooper, J. 2003. Stimulation of single isolated adult ventricular myocytes within a low volume using a planar microelectrode array. *Biophys J* 85:1766-74.
- Ladilov, Y. V., Balsler, C., Piper, H. M. 1998. Protection of rat cardiomyocytes against simulated ischemia and reoxygenation by treatment with protein kinase C activator. *Circ Res* 82:451-7.
- Lewis, B. P., Burge Ch. B., Bartel D.P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by Adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120:15-20.
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Burge, Ch. B. 2003. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115:787-798.
- Manne, U., Shanmugam, CH., Bovell, L., Katkooi, V. R. Bumpers, H. L. 2010. miRNAs as biomarkers for management of patients with colorectal cancer *Biomark Med* 4:761-770.
- Marber, M. 2000. Ischemic preconditioning in isolated cells. *Circ. Res.* 86:926-931.
- Margolin, A. A., Greshock, J., Naylor, T. L., Mosse, Y., Maris, J. M., Bignell, G., Saeed, A. I., Quackenbush, J., Weber, B. L. 2005. CGHAnalyzer: a stand-alone software package for cancer genome analysis using array-based DNA copy number data. *Bioinformatics* 21:3308-3311.
- Minners, J., van den Bos, E. J., Yellon, D. M., Schwab, H., Opie, L. H., Sack, M. N. 2000. Dinitrophenol, Cyclosporin A, and Trimetazidine Modulate Preconditioning in the Isolated Rat Heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovascular Research* 47:68-73.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Murray, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136.
- Ohata, H., Trollinger, D. R., Lemasters, J. J. 1994. Changes in shape and

- viability of cultured adult rabbit cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **86**:259-71.
- Parsons, X. H., Parsons, J. F., Moore, D. A.** 2012. Genome-scale mapping of microRNA signatures in human embryonic stem cell neurogenesis. *Mol Med Ther.* **1**:105-124.
- Sarvazyan N.** 1998. A New approach to Assess Viability of Adult Cardiomyocytes: Computer-assisted image analysis. *J Mol Cell Cardiol* **30**:297-301.
- Sarvazyan N.** 1998. An alternative preconditioning mechanism? *J Mol Cell Cardiol* **30**:2785-2786.
- Sato, T., Sasaki, N., O'Rourke, B., Marban, E.** 2000. Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning? *Circulation* **102**:800-805.
- Small, E. M. & Olson, E. N.** 2011. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* **469**:336-342.
- Taylor, D., L., Woo, E.S., Giuliano, K., A.** 2001. Real-time molecular and cellular analysis: the new frontier of drug discovery. *Curr Opin Biotechnol* **12**:75-81.
- Toombs, C. F., McGee, S., Johnston, W. E., Vinten-Johansen, J.** 1992. Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. *Circulation* **86**:986-994.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Olson, N.A.** 2007. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* **316**:575-579.
- Vander Heide, R. S., Rim, D., Hohl, C. M., Ganote, C. E.** 1990. An *in vitro* model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **22**:165-81.
- Vinten-Johansen, J., Dobson, G. P.** 2013. Adenosine-procaine cardioplegia and adenosine-lidocaine cardioplegia: Two sides of the same coin? *J Thorac Cardiovasc Surg* **145**:1684-1685.
- Vinten-Johansen, J., Thourani V. H., Ronson R. S., Jordan, J. E., Zhao, Z. Q., Nakamura M, Velez D, Guyton R. A.** 1999. Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thorac Surg* **6**:1942-1948.
- World Health Organization.** 2011. Global status report on non communicable diseases. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2011. Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/.
- Xie, X, Lu, J., Kulbokas, E. J. Todd R. Golub, T. R., Mootha, V., Kerstin Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Kellis, K.** 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434**:338-345.
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G., Wang, Z.** 2007. The muscle-specific microRNA *miR-1* regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting *GJA1* and *KCNJ2*. *Nature Medicine* **13**: 486-491.
- Yang, S., Banerjee, S., de Freitas, A., Cui, H., Xie, N., Abraham, E., Liu, G.** 2012. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**: L521-L529.
- Yu, B., Song, B.** 2013. Notch 1 Signalling inhibits cardiomyocyte apoptosis in ischaemic postconditioning. *Heart Lung Circ* **13**:1080-1089.

Recibido:16 de octubre de 2013

Aceptado para publicación:8 de noviembre de 2013

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA COLOCACIÓN DE UN SATÉLITE ARTIFICIAL MEDIANTE UN COHETE LANZADO DESDE TERRITORIO COLOMBIANO

A PRELIMINARY STUDY OF THE PLACEMENT OF AN ARTIFICIAL SATELLITE BY A ROCKET LAUNCHED FROM COLOMBIAN TERRITORY

Jhonathan Orlando Murcia Piñeros¹, José Gregorio Portilla²

Resumen

Murcia-Piñeros J.O, J.G. Portilla: Estudio preliminar de la colocación de un satélite artificial mediante un cohete lanzado desde territorio colombiano. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 449-461, 2013. ISSN 0370-3908.

Se presenta el estudio de la trayectoria de vuelo de un cohete de tres etapas lanzado desde territorio colombiano con el propósito de posicionar un pequeño satélite en órbita baja terrestre. Para ello se consideraron las fuerzas que afectan el movimiento del cohete tales como la fuerza de empuje, la de la gravedad así como las que surgen cuando el objeto se desplaza a través de la atmósfera y, con valores específicos de rendimiento de cohetes que se pueden derivar de la producción actual de la industria nacional, se estableció la masa y el tamaño de cada una de las tres etapas que conforman el cohete a través de un proceso de optimización. Se integraron las ecuaciones diferenciales que describen el movimiento del cohete por medio de un código computacional diseñado por los autores lo que permite determinar el estado dinámico de la carga útil (y de las etapas una vez se hayan desprendido) en cualquier instante de tiempo. La integración se extendió hasta alcanzar el momento de la entrada a órbita (inyección) lo que permite establecer los elementos orbitales del satélite.

Palabras clave. Satélite artificial, cohete, motor cohete, trayectoria de vuelo, vehículo lanzador.

Abstract

We present a study of the flight path trajectory of a three stage rocket launched from colombian territory with the purpose of placing a small satellite in Low Earth Orbit (LEO). Various forces that affect the motion of the rocket were considered such as thrust, gravity and those that arise from the movement through the atmosphere. Taking into account specific values related with the performance of rockets that could be derived from the output of the national industry, we calculated the mass and size of each one of the three stages by means of an optimization process. The differential equations were integrated using a Fortran code written by the authors which permits to calculate the dynamic state of the payload (and stages when discarded) at the desired time. The integration was extended until orbit insertion which permits to know the orbital elements of the satellite.

Key words. Artificial satellite, rocket, rocket motor, flight path trajectory, launcher.

¹ Observatorio Astronómico Nacional, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, e-mail: jomurciap@unal.edu.co

² Observatorio Astronómico Nacional, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, e-mail: jgportillab@unal.edu.co

1. Introducción

Colocar un objeto en órbita alrededor de la Tierra exige, en nuestro actual estado tecnológico, utilizar vehículos de masa variable que sean capaces de alcanzar velocidades cercanas a la decena del kilómetro por segundo. Para ello se apela al uso de un sistema de uno o varios motores diseñados para quemar grandes cantidades de material químico el cual, al entrar en combustión, genera en tiempos relativamente breves, una fuerza de empuje en dirección opuesta a la dirección del vehículo, esto es, del cohete. De este modo se comunica la velocidad necesaria para dejar orbitando una carga útil (satélite o nave espacial) alrededor del planeta Tierra.

Como es bien conocido, el primer satélite artificial fue el Sputnik I colocado por el misil balístico de alcance intercontinental R-7. Esto fue realizado por la Unión de las Repúblicas Socialistas y Soviéticas (URSS) el 4 de octubre de 1957. Desde entonces, otras naciones han desarrollado autónomamente la tecnología necesaria para llegar a órbita, con lo que, hasta ahora, se han llevado a cabo más de 6000 lanzamientos para colocar cargas orbitales con amplia diversidad de objetivos, lo que ha generado una industria sólida y en permanente crecimiento. Se estima que, en el presente, la industria espacial mundial posee volúmenes de ventas que se aproximan a los 270 miles de millones de dólares anualmente³ y su impacto e influencia en casi todas las áreas de las actividades humanas es directo y de gran visibilidad.

Lamentablemente Colombia ha hecho pocos esfuerzos para convertirse en una nación que genere desarrollo en tecnología astronáutica. Existe una comunidad marginal, fundamentalmente constituida por entusiastas aficionados, quienes han realizado al menos desde hace 40 años, y no con la debida continuidad, ensayos con pequeños cohetes. También existe una población minoritaria, con formación posgradual en el campo (lograda tanto nacional como internacionalmente) que poseen proyectos de investigación muy puntuales en algunas universidades o en los servicios de la fuerzas militares, en particular de la Fuerza Aérea. Pero cada uno trabaja aisladamente el uno del otro: nadie, con la debida autoridad e interés, ha canalizado estos esfuerzos para dirigirlos hacia un objetivo central y, menos aun, se ha generado una política decisiva en términos de asegurar presupuestos sustanciosos y continuos que sustente una diversidad de proyectos que hagan competitiva la nación frente a países del medio local.

La razón principal de esta situación, triste es decirlo, es la falta de interés de parte del Estado quien, al menos en teoría, está en la obligación de promover —con políticas serias y continuas y vigilando la asignación de sus corres-

pondientes presupuestos— el establecimiento y desarrollo de la tecnología espacial en los servicios armados, universidades, institutos de investigación y la industria. Esta indiferencia ha conllevado, por supuesto, a una casi que total dependencia de las instituciones estatales y privadas usuarias de la tecnologías espaciales que, para efectos de cumplir con sus actividades, deben contratar con industrias extranjeras y someterse a sus arbitrios y condiciones.

Solo en poco más de la última década se ha venido presenciando un ligero incremento de la investigación astronáutica en algunas universidades y los servicios armados. Entre los años 2000 a 2002 surgieron, en la Universidad Nacional de Colombia, las primeras tesis en diseño de motores cohete de combustibles sólidos y, al poco tiempo, se realizaron investigaciones conjuntas en el Departamento de Ingeniería Mecánica de dicha Universidad sobre el modelamiento matemático, diseño, construcción y pruebas de un micromotor cohete de propelentes líquidos y se publican los primeros avances teóricos de cohería en el país (Garzón, Duque & Roa, 2004; Achury, 2005). También en la misma universidad se creó, por esos mismos años, un grupo de investigación en cohería hidráulica (GIPCUN).

En otras universidades bogotanas se ha presenciado un interés en temas de propulsión: la Universidad San Buenaventura ha adelantado investigaciones en la construcción y funcionamiento de motores cohete de propelentes sólidos a base de combustibles caseros (Gómez & Castro, 2006). En el año 2008 surgió un semillero de investigadores en la Universidad Libre para el desarrollo de motores cohete de combustible sólido y la integración de ingenieros aeronáuticos, mecánicos y electrónicos enfocados en el desarrollo de cohetes atmosféricos (Galindo & Murcia, 2009). En el año 2009 la Fundación Universitaria los Libertadores creó la primera tesis sobre el diseño conceptual y preliminar de un cohete portador de dos etapas para el transporte de carga útil de una tonelada lanzado desde el territorio colombiano a órbitas bajas de la Tierra (Calderón & Murcia, 2009); también se realizaron las dos primeras tesis sobre el diseño y estudio de motores cohete de propulsión iónica para los sistemas de posicionamiento de satélites (Escorcía, 2011; Robledo, 2011). La Universidad de los Andes formó el grupo de investigación Proyecto Uniandino Aeroespacial (PUA) que se ha enfocado en la investigación en temas de propulsión termoquímica, aerodinámica y, en general, comportamientos actitudinales propios de vehículos tipo cohete. El 9 de junio de 2009, con apoyo de la Fuerza Aérea Colombiana en la base de GAORI, se llevó a cabo el lanzamiento de la primera misión de cohería experimental de PUA con un vehículo cohete propulsado por un motor de combustible sólido de 20 kg de empuje, equipado con sistemas de monitoreo y almacenamiento de datos (Urrego, 2009). En el campo satelital,

³<http://www.vatp.lv/en/nekrizelv-large-potential-space-industry>

el desarrollo más publicitado lo ha tenido el proyecto de la Universidad Sergio Arboleda con el picosatélite Libertad I, un objeto en forma de cubo de 10 cm de lado, comprado y ensamblado por esta universidad y luego transportado a Kazajistán para su lanzamiento a bordo de un cohete portador ruso para posicionarlo en órbita baja polar (Joya, 2007). El satélite, junto con varios otros, entró en órbita exitosamente en abril del 2007; duró en funcionamiento 21 días aunque aun permanece en órbita. A parte del evidente propósito propagandístico, permanece por aclarar cuales fueron los objetivos tecnológicos y científicos que se lograron con la puesta en órbita de este objeto (Portilla, 2013).

Varias universidades en Medellín no han sido ajenas a investigaciones de tipo astronáutico. En el 2006 se creó un grupo que fomenta la investigación aeroespacial denominado Inges Aerospace, con la participación conjunta de la Universidad de Antioquia, Eafit y Bolivariana y con una rama dedicada a la cohería conocida como "Cohería Paisa", cuyo principal desarrollo es en el campo de la propulsión sólida con el diseño de cohetes por etapas⁴. La Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) adelanta investigaciones en diseños aerodinámicos de toberas, diseños de motores cohete de 70 mm con propelentes sólidos, contando con la colaboración de la Fuerza Aérea Colombiana y empresas privadas (Escobar & Jaramillo, 2009).

A parte de estas investigaciones promovidas en las instituciones universitarias, también merecen citarse los proyectos de los servicios armados, industria militar e institutos gubernamentales. En el año 2008 la Fuerza Aérea Colombiana a través del Centro de Investigaciones en Tecnología Aeronáutica (CITA) propuso la creación de un cohete portador de tres etapas de propelentes líquidos con la capacidad de transportar pico satélites colombianos a órbitas bajas de la Tierra⁵. En la actualidad Indumil es la única empresa del Estado que se encarga de investigar y adelantar proyectos en el campo de los cohetes y misiles de propelentes sólidos de doble base, contando con los permisos militares exigidos y con las instalaciones necesarias para el almacenamiento, manipulación y producción de químicos altamente explosivos.

Finalmente, en el año 2006 y como iniciativa del Estado Colombiano, se creó la Comisión Colombiana del Espacio (CCE), una organización intersectorial con fines de consulta, coordinación y planificación de políticas nacionales sobre tecnología espacial. Poco después de su creación, la Secretaría de la CCE fue asignada al Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Sin embargo, tanto por su condición de "comisión", así como su estructura y ubicación en el organigrama del estado, no le ha permitido rendir los mejores frutos por lo que sus logros, a sus siete años de creación,

han sido más bien discretos. La intención de adquirir un satélite goestacionario para propósitos de comunicaciones no fue posible concretarla, pese a existir los recursos para ello y de haber convocado a licitación en dos ocasiones. Se esperaba que en este tipo de adquisiciones la CCE tuviera mucho en qué intervenir y acompañara la compra exitosa de dicho satélite. No fue ese el caso. Una segunda intención, esta vez de adquirir un satélite de observación terrestre, lleva en consideración más de dos años a la espera de que alguien ofrezca alguna explicación sobre en qué etapa del proceso se está. A finales del año 2012, la Secretaría de la CCE fue cedida a la Fuerza Aérea Colombiana, por lo que es de esperar que temas como los del satélite de observación terrestre así como la creación de una Agencia Colombiana del Espacio sean pronto una realidad.

Retornando a las investigaciones realizadas en el medio académico, ningún grupo a nivel nacional ha emprendido un estudio teórico que permita realizar un primer análisis del tipo de trayectoria de un cohete multietapas (lanzado desde un punto en particular del territorio colombiano) requerido para colocar pequeños satélites en órbitas bajas que permitan suplir algunas necesidades en el caso eventual que la nación adopte la decisión política de construirlos, no solo éstos sino también los cohetes que los coloquen en órbita. Por ello, esta comunicación se constituye en un primer estudio de exploración consistente en estudiar de forma preliminar la trayectoria de un pequeño cohete de tres etapas lanzado desde territorio colombiano para efectos de colocar una carga útil con masas cercanas a los 200 kg. De este modo, se estudian algunas posibles trayectorias que tendría el cohete para efectos de observar en donde se verifican los sitios de caída de sus dos primeras etapas, así como examinar el perfil de vuelo, esto es, estudiar el incremento de la velocidad y de la altura conforme transcurre el tiempo. Para dicho estudio se tuvieron en cuenta las principales fuerzas que afectan el movimiento de un cohete (empuje, gravedad, resistencia y sustentación), lo que exigió, para efectos de integrar las ecuaciones diferenciales de movimiento, desarrollar un programa en Fortran escrito por los propios autores con base en el integrador numérico Radau (Everhart, 1985).

La sección 2 de esta comunicación describe las fuerzas involucradas; las ecuaciones diferenciales de movimiento se examinan en la sección 3; la sección 4 contiene la optimización de las etapas del cohete, sus masas y dimensiones en tanto que la sección 5 presenta los resultados obtenidos. Finalmente, la sección 6 expone las conclusiones.

2. Fuerzas involucradas

Para modelar el movimiento de un cohete es necesario definir el tipo de fuerzas que actúan sobre el objeto. En

⁴<http://ingesaerospace.blogspot.com>

⁵Presentación en el congreso de ciencia y tecnología aeroespacial CICTA 2007.

este estudio se consideran cuatro fuerzas: aquellas que surgen a causa del movimiento a través de la atmósfera: el arrastre D y la sustentación L ; adicionalmente, se considera la fuerza de propulsión (empuje) del cohete T y la fuerza de atracción gravitacional W .

2.1 Las fuerzas aerodinámicas

Generalmente (aunque no exclusivamente) los cohetes parten de la superficie terrestre, en donde la densidad atmosférica es un máximo. Por ello, en los primeros instantes del vuelo, ha de tenerse en cuenta las fuerzas que surgen por el movimiento del cohete a través del fluido. Conforme transcurre el tiempo la altura del vehículo se va incrementando por lo que la densidad comienza a decaer fuertemente y eventualmente, a partir de cierta altura, se reducen a cero.

Funcionalmente, la fuerza de arrastre D y de sustentación L están definidas por:

$$D = qC_D A_P, \quad (1)$$

$$L = qC_L A_P, \quad (2)$$

donde A_P es el área proyectada del vehículo, C_D y C_L son los coeficientes de resistencia y sustentación, respectivamente, y q es la denominada presión dinámica dada por:

$$q = \frac{1}{2} \rho V^2, \quad (3)$$

en donde V es la velocidad y ρ es la densidad del aire en un punto determinado de la atmósfera considerándola ideal, sin influencia de los vientos o fenómenos meteorológicos. Para una descripción satisfactoria de la densidad atmosférica en función de la altura es indispensable contar con un modelo de atmósfera estándar.

Existen varios modelos matemáticos para la atmósfera terrestre que han sido creados a lo largo de los años, tales como la *US Standard Atmosphere*, *ISA (International Standard Atmosphere)*, *Earth-GRAM (Earth Global Reference Atmospheric Model)*, *MSISE (Mass Spectrometer Incoherent Scatter)*, *ICAO (International Civil Aviation Organization)*, *ARDC (Air Research and Development Comand)*, entre otros (ANSI, 2004). El más reciente y avanzado es el modelo de la NASA *Earth Gram 2010*⁶, un modelo global que depende de la latitud, longitud y achatamiento terrestre; también modela las corrientes que generan los vientos. Otro modelo utilizado actualmente por la organización de aviación civil internacional (OACI) es el ISA con límites de datos hasta los 32 km y el modelo completo hasta los 90 km de altitud (ANSI, 2004).

El modelo de atmósfera estándar US1976 cuenta con datos hasta los 1000 km de altitud, pero la descripción matemática que describe las variaciones de presión y densidad en función de la altitud no está completo. Una buena

opción, por su persistencia, relativa sencillez y rango amplio de valores, es la utilización del modelo ARDC1959 (Zipler, 2007) sobre el que se realizaron con posterioridad el modelo atmosférico ISA y el US1976. Dicho modelo matemático es utilizado aun en aplicaciones aeroespaciales actuales. Debido a que Colombia no cuenta con investigaciones de una atmósfera estándar local, y por las razones atrás expuestas, se utilizó el modelo atmosférico ARDC1959 (Minzner *et al*, 1959). Otro motivo para su aplicación es que códigos como el CADAC o ALTOS de simulación de cohetes cuentan con este para el modelamiento atmosférico por su precisión y simplicidad (Zipfel, 2007).

El modelo ARDC1959 define el cambio de las propiedades del gas como lo son la temperatura molecular, la presión P y la densidad ρ en función del incremento de la altitud geométrica h_G y la variación de la gravedad g .

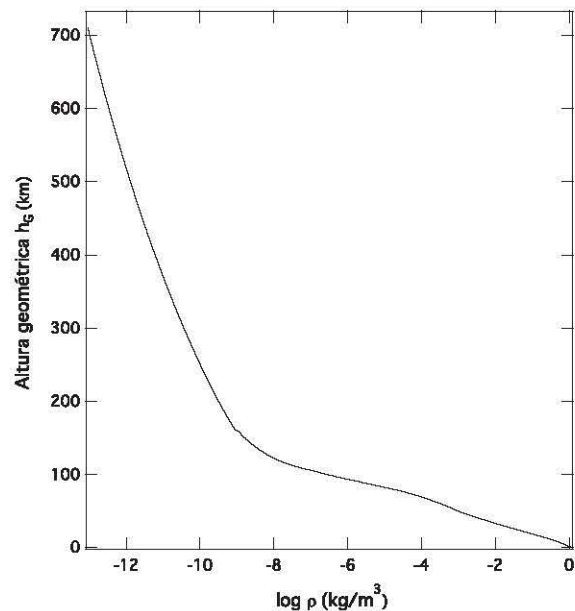


Figura 1: Relación entre la densidad atmosférica y la altura geométrica con el modelo ARDC1959.

Utilizando los principios de la hidrostática (Minzner *et al*, 1959), considerando la atmósfera terrestre libre de rotación, fuerzas de Coriolis y centrípeta, vientos e incidencia de la radiación solar, la variación de la presión en función del cambio de altitud se representa como:

$$dP = -\rho g dh_G. \quad (4)$$

Con los datos obtenidos de cohetes sondas y globos meteorológicos se puede construir el modelo matemático de cada capa atmosférica (aquellas con gradiente térmico y aquellas que no lo tienen) obteniendo el comportamiento de las propiedades del fluido en función de la altitud geométrica. En particular, la Figura 1 muestra los valores

⁶<http://see.msfc.nasa.gov/tte/model-gram.htm>

de densidad ρ correspondientes a los valores de altura geométrica obtenidos con el modelo ARDC1959. Dicho perfil de densidad es el que se adoptó para este estudio.

La dependencia funcional de C_D será vista en la sección 4 cuando se defina la dimensión y forma del cohete.

2.2 La fuerza gravitacional

La fuerza de atracción gravitacional que se ejerce sobre el vehículo puede darse en términos del potencial gravitacional terrestre y las posibles perturbaciones gravitacionales adicionales que ejercen otros cuerpos. El potencial gravitacional de cuerpo "real" Φ satisface la ecuación de Laplace $\nabla^2\Phi = 0$. Una descripción de su solución en coordenadas esféricas se encuentra, por ejemplo, en **Kaula** (1966). El potencial gravitacional puede escribirse entonces en función del radio vector posición ($r = R_e + h$, siendo $R_e = 1$ R.T. = 6378.14 km, el radio del planeta en el ecuador), la latitud ϕ y la longitud λ como (**Xu**, 2008):

$$\Phi = -\frac{GM_e}{r} \left\{ 1 + \sum_{n=2}^{\infty} \sum_{m=0}^n \left(\frac{R_e}{r}\right)^n P_{nm}(\sin\phi) [C_{nm} \cos m\lambda + S_{nm} \sin m\lambda] \right\},$$

donde $G = 6.67 \times 10^{-11} \text{ Nm}^2\text{kg}^{-2}$ es la constante de Cavendish, M_e es la masa de la Tierra ($5,67 \times 10^{24} \text{ kg}$), C_{nm} y S_{nm} son los denominados armónicos esféricos (constantes adimensionales propias de cada cuerpo central) y $P_{nm}(\sin\phi)$ son los polinomios de Legendre. Para el caso de la Tierra el término adicional que más perturba el clásico potencial kepleriano (GM_e/r) es aquel que corresponde a $C_{20} = C_2 = -J_2$, el cual es al menos mil veces más grande que todas las demás constantes que siguen en la serie. Por tal razón, el potencial gravitacional que se tendrá en cuenta aquí solo incluye el término de C_{20} , por lo que se reduce a (**Tewari**, 2007; **Portilla**, 2009):

$$\Phi = -\frac{GM_e}{r} + \frac{GM_e R_e^2 J_2}{2r^3} (3 \sin^2 \phi - 1), \quad (5)$$

donde $J_2 = 0.00108263$ para la Tierra. Despreciando la atracción gravitacional del Sol y de la Luna, de tal suerte que la fuerza gravitacional \vec{W} sea solo debida a la fuerza de atracción gravitacional terrestre, tendremos que:

$$\vec{W} = -\nabla\Phi, \text{ siendo: } \nabla = \frac{\partial}{\partial r} \hat{r} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \phi} \hat{\phi},$$

donde \hat{r} y $\hat{\phi}$ son vectores unitarios en la dirección del radio vector y la latitud, respectivamente. Por lo tanto, tenemos:

$$\vec{W} = -W_r \hat{r} - W_\phi \hat{\phi},$$

donde:

$$W_r = \frac{GM_e}{r^2} \left[1 - \frac{3R_e^2 J_2}{2r^2} (3 \sin^2 \phi - 1) \right], \quad (6)$$

$$W_\phi = \frac{3GM_e}{r^2} \left(\frac{R_e}{r}\right)^2 J_2 \sin \phi \cos \phi. \quad (7)$$

2.3 La fuerza de empuje

La fuerza de empuje está descrita por:

$$T = v_e \dot{m} = I_{sp} g_0 \dot{m}, \quad (8)$$

donde v_e es la velocidad de salida de los gases calientes (con respecto al cohete), I_{sp} es el impulso específico, g_0 el valor de la aceleración de la gravedad en la superficie terrestre y \dot{m} es la tasa de salida (masa en la unidad de tiempo) de los mismos. Se ha supuesto que la contribución adicional del empuje originado por la diferencia de presión entre los gases de salida con la de la presión atmosférica es despreciable. Asumiremos que el grano que conforman los motores de combustible sólido se ha diseñado de tal modo que la tasa de salida de los gases sea constante.

3. Ecuaciones de movimiento

Como origen del sistema inercial se toma el centro de masas de la Tierra. Respecto a la superficie de la Tierra, el cohete se sitúa en un marco de referencia sobre la superficie del planeta que depende de las coordenadas esféricas de latitud ϕ y longitud λ (ver Figura 2).

Con origen en el centro de masas de la Tierra (S), se definen los ejes cartesianos XYZ donde el plano del ecuador se encuentra sobre los ejes XY y el eje Z apunta al polo norte celeste. Sobre este sistema de referencia inercial se encuentra un punto o fijo sobre la superficie terrestre cuya distancia al centro de masas es r e inclinado respecto a los ejes del sistema de referencia inercial por un ángulo de latitud ϕ (positivo hacia el PNC, negativo en caso contrario), y un ángulo de longitud λ respecto al eje X ; estas coordenadas se encuentran en movimiento debido al efecto de rotación de la Tierra a una velocidad angular $\vec{\omega}$ sobre el ecuador. Por tal motivo se crea un sistema de referencia no inercial instantáneo de origen en o y con los ejes cartesianos xyz definidos de tal modo que el eje x está en dirección del radio vector posición \vec{r} , el eje z apuntando en dirección norte y el eje y hacia el este. El ángulo formado entre el eje z y la proyección del vector velocidad \vec{V} en el plano yz se conoce como el azimut A o rumbo: es la dirección de movimiento del cohete respecto al norte geográfico de la Tierra. El ángulo que forman el vector posición con el vector velocidad sobre el eje x se denomina ángulo de trayectoria de vuelo ϑ , ver Figura 2 (**Tewari**, 2007).

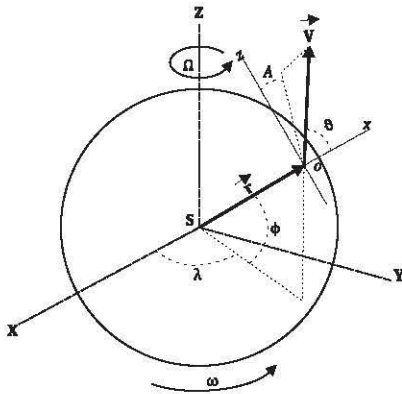


Figura 2: Descripción del sistema de referencia.

El conjunto de las seis ecuaciones diferenciales que definen el movimiento del cohete sobre dicho sistema de referencia son (Tewari, 2007):

$$\frac{dr}{dt} = V \cos \vartheta, \quad (9)$$

$$\frac{d\phi}{dt} = \frac{V \sin \vartheta \cos A}{r}, \quad (10)$$

$$\frac{d\lambda}{dt} = \frac{V \sin \vartheta \sin A}{r \cos \phi}, \quad (11)$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{T \cos \alpha}{m} - \frac{D}{m} - \frac{W_r \cos \vartheta}{m} + \frac{W_\phi \sin \vartheta \cos A}{m} - \omega^2 r \cos \phi (\sin \phi \sin \vartheta \cos A - \cos \phi \cos \vartheta), \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} = & \frac{\omega^2 r \sin A \sin \phi \cos \phi}{V \sin \vartheta} + \\ & + \frac{V}{r} \sin \vartheta \sin A \tan \phi - \frac{W_\phi \sin A}{mV} \\ & - \frac{2\omega}{\sin \vartheta} (\cos \phi \cos \vartheta \cos A - \sin \phi \sin \vartheta), \quad (13) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d\vartheta}{dt} = & \frac{T \sin \alpha}{mV} + \frac{L}{mV} + \frac{W_r \sin \vartheta}{mV} - 2\omega \sin A \cos \phi \\ & + \frac{W_\phi \cos \vartheta \cos A}{mV} - \frac{V}{r} \sin \vartheta \\ & - \frac{\omega^2 r \cos \phi}{V} (\sin \phi \cos \vartheta \cos A + \cos \phi \sin \vartheta), \quad (14) \end{aligned}$$

donde m es la masa instantánea del cohete, α es el denominado ángulo de ataque (aquel que existe entre el vector velocidad y el vector de empuje). Es claro que, dada la complejidad de las ecuaciones diferenciales, se ha de proceder para su solución a través de la utilización de un integrador numérico. Para tal efecto, hemos utilizado el integrador Radau escrito en Fortran 77 (Everhart, 1985).

Nótese que las ecuaciones no contienen términos que incluyan tanto la presencia de vientos como la existencia de ángulo de deslizamiento (ver Calise & Leung, 1995, para las ecuaciones completas). Tampoco se ha incluido un método de optimización de trayectoria. La inclinación que presenta el vehículo, esto es, a que el ángulo ϑ tienda a aumentar en el tiempo, es estrictamente de origen gravitacional.

4. El cohete portador

De proponérselo, el país podría estar en capacidad de desarrollar un pequeño cohete para colocar cargas útiles a órbitas bajas. Países como Brasil y Argentina están encaminados en esa dirección y en menos de un lustro esperan colocar satélites artificiales por sus propios medios.

Una opción que bien vale la pena considerar, en un inicio, es la colocación de minisatélites con masas cercanas a los 200 kg. De hecho, la Fuerza Aérea Colombiana ha propuesto un rango parecido de masa para un satélite de órbita baja. Para estos rangos de masa, y con los avances en miniaturización, se podrían elaborar satélites que satisfagan un amplio abanico de propósitos entre los que se encuentran la seguridad del territorio y vigilancia de fronteras, búsqueda de recursos naturales, prevención y monitoreo de desastres naturales, etc. Dada la dificultad inherente en el desarrollo y puesta a punto de motores de combustible líquido no sería nada extraño que se adoptara como alternativa la utilización de motores de combustible sólido para cada una de las etapas que constituyen el cohete. Éstos son relativamente sencillos de construir y puede decirse que en el presente se dispone del propelente ya que el país elabora propelentes sólidos de doble base con un impulso específico⁷ de 220 s y una densidad de 1.67 g cm^{-3} . Este tipo de propelentes están siendo utilizados en aplicaciones militares a baja escala por Indumil.

Para efectos de estudio, se decidió adoptar una configuración de un cohete consistente en tres etapas, parecida a la del cohete Scout (Whitney et al., 1965) donde todas sus etapas están conformadas por motores de combustible sólido. Con el propósito de adoptar valores de masa iniciales (y, obviamente, de definir las dimensiones del vehículo) es preciso optimizar la relación de masas entre cada etapa, considerando la masa de la carga útil, la masa del propelente, la masa de la estructura y las velocidades de salida de los gases con relación al vehículo. Para tal efecto, se puede utilizar un procedimiento iterativo y de ese modo obtener los valores adecuados de relaciones de masa. Para el valor nominal que se ha escogido para la masa de la carga útil, teniendo en cuenta el valor del impulso específico I_{sp} para propelentes sólidos que actualmente se desarrollan en el país por las industrias militares (que, como ya se dijo, están alrededor de 220 s) y que se toma como un estándar para cada una de las tres etapas. Partiendo de la ecuación ideal del movimiento

⁷Comunicación personal con Indumil.

del cohete que permite conocer el cambio de velocidad ΔV a través de:

$$\Delta V = -v_e \ln \frac{m_f}{m_i},$$

donde v_e es la velocidad de los gases de escape con relación al vehículo, m_i la masa inicial y m_f la masa final, se puede extender la misma para sucesivas etapas y así escribir (Koelle, 1961; Tewari, 2007):

$$\Delta V = -\sum_{k=1}^N v_{ek} \ln \frac{m_{fk}}{m_{ik}}, \quad (15)$$

donde el subíndice k indica la etapa específica a analizar; en nuestro caso $N = 3$. Si se reemplazan las masas por los factores de carga estructural σ_k , el factor de relación de masas iniciales y finales λ_k , se encuentra que la ecuación anterior queda de la forma:

$$\Delta V = -\sum_{k=1}^N v_{ek} \ln (\sigma_k + (1 - \sigma_k) \lambda_k), \quad (16)$$

donde:

$$\lambda_k = \frac{m_{i(k+1)}}{m_{ik}}, \quad (17)$$

$$\sigma_k = \frac{m_{sk}}{m_{sk} + m_{propk}}, \quad (18)$$

siendo m_{sk} la masa estructural de la etapa y m_{propk} la masa del propelente químico. Al relacionar el cambio de velocidad con la velocidad de gases de escape de la primera etapa, y la relación entre factores de masa α_k , la ecuación a iterar queda de la siguiente forma:

$$\frac{\Delta V}{v_{e1}} = -\sum_{k=1}^N \beta_k \ln (\sigma_k + (1 - \sigma_k) \alpha_k \lambda_1), \quad (19)$$

$$\beta_k = \frac{v_{ek}}{v_{e1}} = \frac{Isp_k}{Isp_1}, \quad (20)$$

$$\alpha_k = \frac{\lambda_k}{\lambda_1}, \quad (21)$$

$$\lambda_T = \frac{m_{pay}}{m_{i1}} = \lambda_1^N \prod_{k=1}^N \alpha_k. \quad (22)$$

Para este caso, β_k representa la relación de velocidades de escape, λ_T la relación entre la carga paga o carga útil m_{pay} (masa a transportar) con la masa inicial total del vehículo m_{i1} (Lafleur, Fleming & Saleh, 2012).

Para el caso de estudio adoptamos una velocidad final del cohete ideal, al cabo de las tres etapas, de 9.7 km s^{-1} , que es 2 km s^{-1} más de lo requerido para la velocidad orbital, pues a ese valor hay que restarle lo que se reduce en velocidad por pérdida de la presencia de la fuerza de gravedad y el arrastre atmosférico (Tewari, 2007). Se compararon datos estadísticos de otros cohetes lanzadores para órbitas bajas lográndose a adoptar como factor de

masa estructural un valor de $\sigma_k = 0.1$ que sería el peor episodio posible en cada una de las tres etapas, es decir, el cohete más pesado estructuralmente. De igual forma, se adoptó $\beta_k = 1$ por aquello de que todas las etapas tienen el mismo propelente e impulso específico (Humble, Henry & Larson, 1995). Los resultados que se obtuvieron del proceso iterativo a través de un código de optimización se presentan en la Tabla 1.

Etapas	Propelente (kg)	Estructura (kg)	Total (kg)
I	50416.36	5601.81	65552.89
II	7313.36	812.60	9054.70
III	1060.87	117.85	1378.75
Carga	0.0	200	200

Tabla 1: Masas del cohete portador.

Con las masas halladas en el código de optimización se procedió a realizar un diseño conceptual de las dimensiones aproximadas del cohete portador para que se sea posible realizar valoraciones de carácter aerodinámico (como el C_D) y de ese modo incluir dichos datos en el código de trayectoria de vuelo. Es importante añadir que para el diseño final se tuvieron en consideración las dimensiones y características de cohetes construidos en otras latitudes con las mismas o similares características (Humble, Henry & Larson, 1995).

El primer parámetro que depende de las masas es la relación de la fuerza de empuje a desarrollar por cada uno de los motores cohete. Para ello se buscaron valores de la relación empuje/peso (T/W) de cohetes históricos o de línea base (Humble, Henry & Larson, 1995; Sutton & Biblatz, 2010). Para los cohetes portadores usuales el valor de la relación T/W para las primeras etapas oscila entre 1.0 a 1.5. En el caso que nos ocupa se seleccionó un valor medio de 1.3. Para los motores de etapas superiores y de posicionamiento orbital el valor suele ser inferior a 1.0. Adoptamos entonces los valores de 0.9 y 1.1 para la segunda y tercera etapa, respectivamente. Sabiendo los valores de masa de cada etapa, tomando $v_e = 2160 \text{ m s}^{-1}$, se puede utilizar la ecuación (8) con los valores de fuerzas de empuje y así determinar los flujos máxicos y los tiempos de funcionamiento de cada etapa, ver Tabla 2.

Etapas	T/W	Empuje (N)	\dot{m} (kg/s)	t_b (s)
I	1.3	834761	386.4	130.4
II	0.9	83831	38.8	188.4
III	1.1	15271	3.6	150.0

Tabla 2: Valores nominales de la relación T/W , flujos máxicos y tiempos de funcionamiento de cada etapa del cohete portador.

Una de las ventajas tecnológicas de construir un cohete portador de varias etapas es que la estructura de todas ellas,

exceptuando la última, pueden ser recuperadas mediante paracaídas una vez que se consume el propelente y ser reutilizadas en otro lanzamiento. La estructura de la etapa superior suele quedar en órbita baja y al cabo de un tiempo reintegrar a la atmósfera terrestre donde se desintegra por efectos de la fricción.

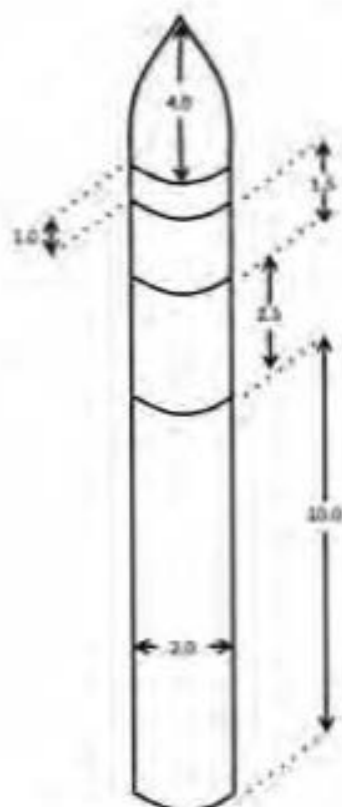


Figura 3: Dimensiones del cohete portador. Las unidades están en metros.

Tomando los datos de las masas de cada etapa, el estimado de la densidad del propelente, el volumen de carga que ocupa y la referencia de los cohetes históricos, se estiman las dimensiones del cohete portador del presente estudio. En la Figura 3 se pueden observar las dimensiones del cohete portador. El cohete tiene un diámetro de 2 m, longitud de fuselaje de 14 m y el cono de protección de la carga útil de 4 m, dando una altura total de 18 m. Para este caso se tiene en cuenta la densidad⁶ del propelente de 1.67 g cm^{-3} , y con las masas de la Tabla 8 de cada etapa se estima el volumen y longitud de las mismas, dando como resultado que la primera etapa tiene una longitud estimada de 10 m, 2.5 m la segunda, 1.5 m la tercera y un espacio de 1 m de longitud para computadores y otros sistemas de vuelo.

⁶Dato suministrado por Lockheed.

Una vez calculadas las dimensiones del cohete, se introdujeron como datos de entrada en un código computacional aerodinámico obteniendo así el comportamiento del coeficiente de arrastre en función del número Mach, esto es, de la velocidad, tal y como se muestra en la Figura 4. Aquí se observa que el máximo coeficiente de arrastre del vehículo por onda de choque se obtiene alrededor de Mach 1 con un valor cercano a 0.34. Después de superar los efectos sónicos, el coeficiente disminuye a medida que aumenta el valor de número Mach siendo cercano a 0.10 para velocidades de 4 veces la del sonido y superiores. Con el propósito de evitar una variación notoria del coeficiente de arrastre con respecto al ángulo de ataque, asumiremos que existe un mecanismo de control que mantiene un valor nulo del ángulo de ataque.

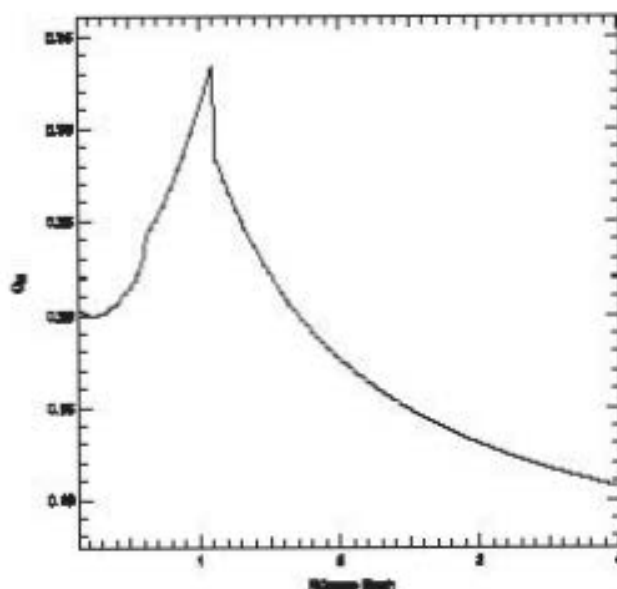


Figura 4: Comportamiento del coeficiente de arrastre aerodinámico en función del número Mach.

En el momento del despegue, el cohete enciende el motor cohete de su primera etapa generando una fuerza de empuje constante de 834761 N durante un tiempo de 130.4 s. Cinco segundos antes del apagado del motor cohete principal (MECO, Main Engine Cut Off) se desprende la estructura de la primera etapa del cuerpo principal del cohete, el cual enciende, en ese mismo instante, el motor cohete anillo de la segunda etapa que transmite una fuerza de empuje de 82881 N durante 188.4 s antes de ser desprendida de la estructura de la tercera etapa y carga útil (SECO, Second Engine Cut Off). Finalmente, se enciende la tercera etapa con una fuerza de empuje constante de 15271 N, la cual se puede diseñar de tal modo que el quemado proceda durante un tiempo de 150 s y cuyo propósito es generar la

velocidad final de inserción (inyección) necesaria para que la carga útil quede orbitando a una altitud determinada. De acuerdo con los parámetros de diseño, el flujo másico se mantiene constante, siendo controlado con la cantidad de área quemada por el propelente constante en el tiempo que puede lograrse mediante la utilización de una configuración de estrella para la forma del grano.

Con el propósito de estudiar la trayectoria del cohete lanzado desde territorio continental colombiano, se eligió un sitio ubicado en el departamento de la Guajira sobre el mar Caribe con coordenadas geográficas de $\phi = 12^{\circ}3'20''$ norte y $\lambda = 72^{\circ}9'35''$ oeste. Esta posible localización tiene la ventaja de estar ubicada en una zona desértica muy cerca al mar para aprovechar los recursos hídricos en las plataformas de lanzamiento. También se encuentra alejada de núcleos urbanos; la mayor parte de la trayectoria de vuelo puede realizarse sobre zona desértica y marítima; además, en esta zona se encuentra la más grande infraestructura ferroviaria del país por las minas de sal y carbón existentes en la región, contando con puertos marítimos y aeropuertos independientes que disponen de los medios para el transporte de maquinaria pesada. Entre las desventajas de este lugar se encuentran las altas velocidades de los vientos, razón por la cual allí se ubica el parque eólico de Colombia. Adicionalmente, es una de las zonas del territorio nacional más alejadas del ecuador con latitud superior a los 12° norte, lo que disminuiría el peso del lanzamiento de carga útil a órbitas geoestacionarias. Las posibles trayectorias del cohete que pueden cruzar por rutas aéreas de alto tráfico así como la posibilidad de sobrevuelo de territorio continental venezolano para cierto rango de azimuts de lanzamiento se constituyen también en factores de desventaja.

Para efectos de estudiar la trayectoria de vuelo del cohete, junto con cada una de las trayectorias de las etapas del mismo, una vez que éstas ya no hacen parte integral de la parte activa del cohete, se procedió a integrar numéricamente las ecuaciones (9) a (14), las cuales contienen términos que funcionalmente están definidos por las ecuaciones (1), (2), (3), (6), (7) y (8). La dependencia de la densidad del aire ρ frente a la altura está dada a través del modelo ARDC1959 (ver Figura 1) para lo cual se utilizaron valores tabulados en el correspondiente código. Del mismo modo se procedió frente a la dependencia funcional de C_D con respecto a la velocidad (ver Figura 4). Se asumió la existencia de un mecanismo de control de vuelo para asegurar un valor constante del ángulo de ataque α igual a cero. Así mismo, se adoptó un valor de $C_L = 0$. El valor de la masa del cohete en todo tiempo se calculó asumiendo tasas de quemado constante en cada una de las etapas, esto es, $m = M_0 - \dot{m}t$ (ver Tabla 2) y teniendo en cuenta la expulsión de las etapas correspondientes. Las condiciones iniciales del vuelo corresponden al radio terrestre ($r = R_e$), la latitud y longitud del sitio del lanzamiento (citados atrás) y el azimut de lanzamiento que puede ser variable. Para

términos que diverjan, los valores iniciales tanto de V como de ϑ son igualados a un valor pequeño diferente de cero.

5. Resultados

En la Figura 5 se puede observar el comportamiento del valor de la presión dinámica (ver ecuación (3)) con respecto al tiempo. Se observa que el punto de mayor presión, conocido como q_{\max} , se logra a los 65 s de vuelo (que corresponde a un valor de altitud de 10 km y una velocidad de 426 m s^{-1}). El valor de esa presión en tal punto es de 36 000 Pa. Este factor es de vital importancia para el diseño estructural del vehículo, ya que es la máxima carga que debe soportar el cohete durante la fase de ascenso atmosférico.

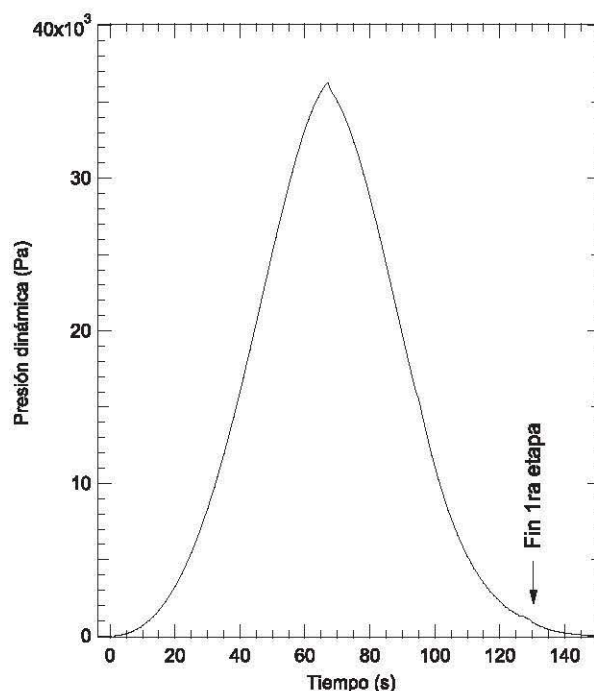


Figura 5: Valor de la presión dinámica con relación al tiempo.

Durante el ascenso, el cohete aumenta la velocidad a medida que disminuye la masa, proporcionalmente a este aumento de velocidad se produce un aumento de presión hasta llegar a la zona de la atmósfera donde se vuelve significativo el descenso de la densidad del aire a medida que aumenta la altitud y velocidad del vehículo. Después de los 65 s de vuelo el valor de la densidad desciende considerablemente dando como resultado la disminución de la presión dinámica. Tan solo unos 20 segundos después del fin de la primera etapa se puede considerar que la presión dinámica es nula.

Posteriormente se analizaron las posibles trayectorias del cohete con un rumbo comprendido desde los 0 hasta los 90

grados e intervalos de 15 grados con el propósito de determinar si la primera y segunda etapas tienen el tiempo de impactar en o cerca de poblaciones pertenecientes a territorios de otros países.

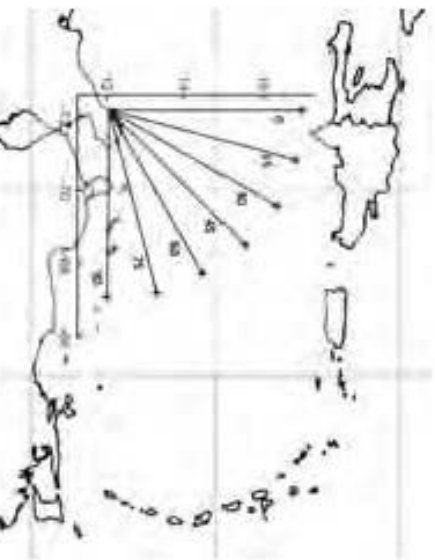


Figura 6: Trayectorias de bombas de vapor del volcán con rumbo orientadas entre 0 y 90 grados e intervalos de 15 grados. Las cruces al final de la línea señalan el lugar de impacto de la primera etapa. Nótese que el valor de la longitud se sugiere hacia el oeste.

Para esta tipo de cálculos se hizo la suposición de que cada etapa en su caída hacia tierra está orientada de "vabosa", esto es, el eje longitudinal de la etapa es paralelo a la dirección del vector de la fuerza de resultante, pero que de ese modo se conserva el valor del área proyectada. Una suposición adicional y solo válida en una primera aproximación, es conservar el mismo comportamiento de C_D del de la primera etapa.

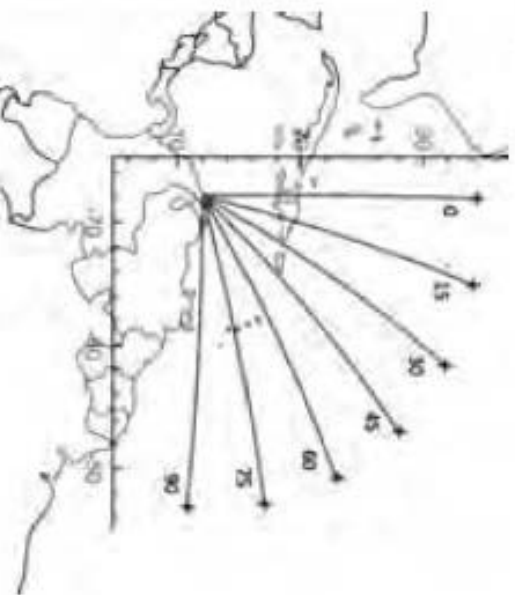


Figura 7: Trayectorias de bombas de vapor del volcán con rumbo orientadas entre 0 y 90 grados e intervalos de 15 grados. Las cruces al final de la línea señalan el lugar de impacto de la segunda etapa. Nótese que el valor de la longitud se sugiere hacia el oeste.

En la Figura 6 se muestran las trayectorias y los lugares de impacto de la primera etapa. Se observa que la mayoría de las trayectorias sobrevuelan el mar Caribe y el impacto de la primera etapa, salvo para rumbos de lanzamiento entre 75 y 90 grados, no representa preocupación para habitantes en tierra. En la Figura 7 se puede observar la continuación de la trayectoria y los lugares de impacto de la segunda etapa. Los valores de ángulo comprendidos entre 0 y 45 grados sobrevuelan el algún momento territorio insular bien de El Salvador, República Dominicana y Puerto Rico. Valores de ángulo entre 60 y 75 grados sobrevuelan las Antillas Menores. Ángulos de rumbos cercanos a cero son especialmente sensibles debido a su relativa cercanía de sobrevuelo por territorio continental de la costa este de los Estados Unidos. Escapando algunos de ángulos de rumbos a unos 6 grados, los lugares de impacto de la segunda etapa se verifican en sitios bien al interior del Océano Atlántico. Si bien esto no representa riesgo a poblaciones en tierra, sí lo puede representar para barcos que están atracando al océano o aviones desplazándose a través de rutas aéreas al momento del despegue. Si se trata de minimizar el sobrevuelo de áreas relativamente pobladas, valores de rumbos comprendidos entre 45 y 60 grados serían los más convenientes.

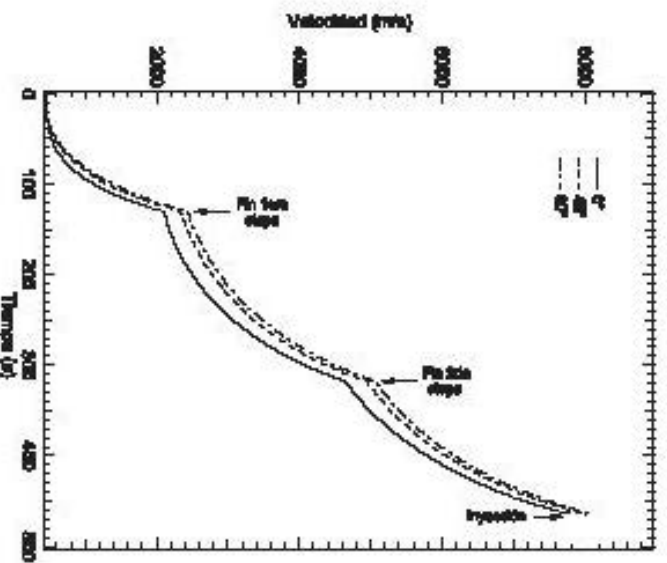


Figura 8: Perfil de velocidad del volcán con respecto al tiempo para varios rumbos de salida. Se distinguen solo los valores comprendidos e intervalos de 45° para facilitar su identificación.

La Figura 8 muestra el correspondiente perfil de velocidad del volcán con respecto al tiempo para varios valores de ángulo de lanzamiento. Al final de la primera etapa se

alcanzan a lograr velocidades comprendidas entre 2.05 a 2.45 km s⁻¹, mientras que al finalizar la segunda etapa las velocidades están en un rango entre 4.6 a 5.1 km s⁻¹. Los valores de velocidad en el momento de la inyección están en un intervalo comprendido entre 7.8 y 8.1 km s⁻¹. Es claro que los máximos valores de velocidad se logran con un ángulo de azimut de lanzamiento igual a 90° aunque la diferencia, con relación a los valores mínimos (de 0°), es de apenas unos 150 a 200 m s⁻¹ para la inserción orbital.

Los anteriores análisis fueron realizados con varios valores de rumbo comprendidos desde 0° hasta 90°. Para efectos de la continuación del análisis de la trayectoria y estudiar la colocación de un satélite en órbita baja, se seleccionó un valor representativo de azimut de 45°. Dejando los demás valores de condiciones iniciales sin modificar, se analiza primeramente el comportamiento de la altura de cada una de las etapas en función del tiempo de vuelo. Esto se puede observar en la Figura 9. La primera etapa se agota en torno a los 130 s; después de la separación de ésta (para dar lugar al inicio del encendido de la segunda) continua ganando altura hasta alcanzar un valor cercano a los 150 km, lo que ocurre a los 270 s después del lanzamiento. Su impacto en el océano se verifica a los 450 s.

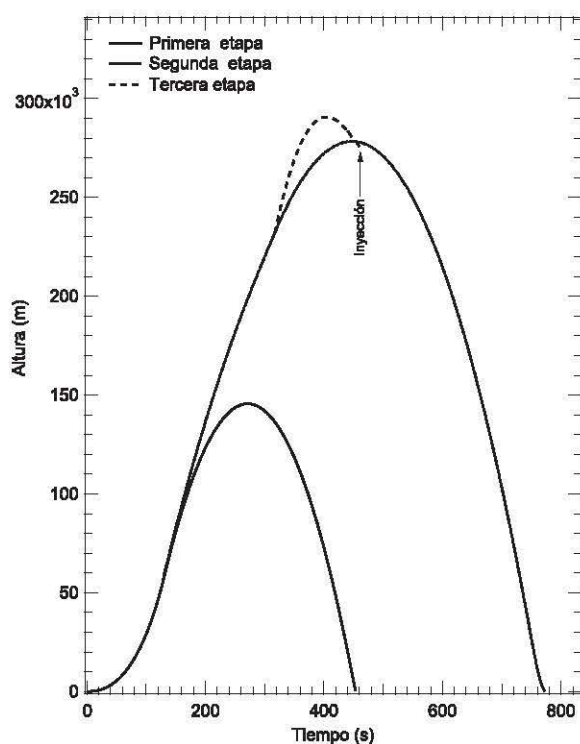


Figura 9: Comportamiento de la altura de cada una de las tres etapas para un valor de azimut de lanzamiento igual a 45°.

En cuanto a la segunda etapa, la cual se enciende estando a una altura de unos 55 km, termina agotándose al cabo de transcurridos 318 s a una altitud cercana a los 230 km; continua ganando altura hasta llegar a los 290 km (lo que ocurre a los 395 s) para, posteriormente, de regreso a tierra, impactar en el océano a los 775 s. La tercera etapa continua ganando un poco más de altura, alcanzado el máximo pico de altitud de 290 km a los 400 s. A partir de ahí, y aun ganando velocidad, comienza a disminuir la altura ($\dot{r} < 0$) hasta llegar el momento de la inyección a los 470 s. En la Figura 10 se puede apreciar el comportamiento del ángulo de vuelo en función del tiempo. La inyección se verifica a un valor de $\vartheta = 90.9$: tanto la tercera etapa como la carga útil quedan en órbita. Sin embargo, esta última se puede desprender de la estructura de la tercera etapa con ayuda de resortes u otro mecanismo con lo que se altera muy ligeramente la trayectoria de la carga útil. La trayectoria de la tercera etapa será la misma que tiene el satélite en órbita en los primeros instantes de la inyección pero, por su mayor área proyectada, experimenta una fuerza mayor de resistencia y su descenso será más marcado que el que experimentará el satélite. Finalmente, por su cercanía con las capas densas de la atmósfera, se genera un aumento de temperatura por fricción de tal modo que se desintegra el objeto.

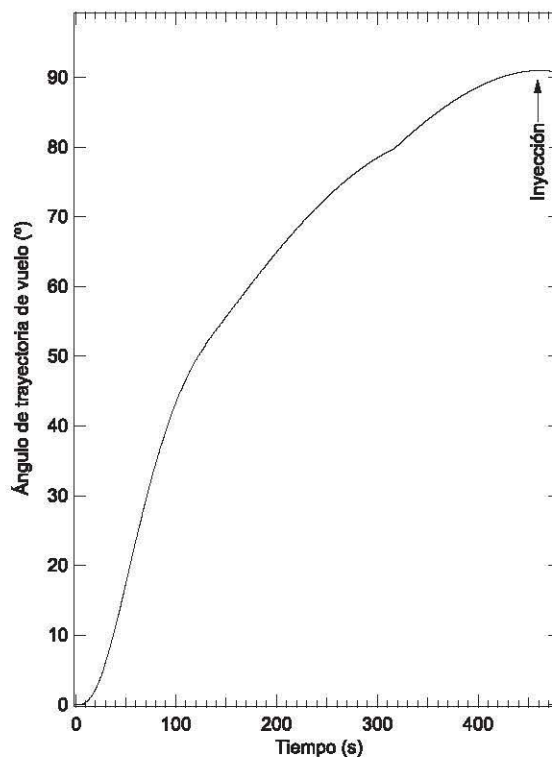


Figura 10: Comportamiento del ángulo de vuelo para un lanzamiento con azimut igual a 45°.

Examinemos las características orbitales del satélite en el momento en que ingresa a órbita terrestre. En la tabla 3 están consignados los valores dinámicos en el momento de la inyección orbital para un lanzamiento de 45° , valores que corresponden al sistema inercial centrado en la Tierra.

Radio vector, r	Velocidad, V	Ángulo de vuelo, ϑ ($^\circ$)
6649.7 km	8041.57 m s $^{-1}$	90.94

Tabla 3: Datos dinámicos al momento de la inyección.

En el caso que nos ocupa, el valor de la velocidad en el momento de la inyección (*cut-off*) es más del requerido para una órbita circular a una altura de 272 km (que es del orden de 7745 m s $^{-1}$), esto es, casi 300 m s $^{-1}$ más. De ahí que la órbita deba resultar con una excentricidad relativamente alta.

Los valores del semieje mayor a y excentricidad e de la órbita están dado entonces por (Portilla, 2009):

$$a = \frac{r}{2 - Q},$$

$$e = \sqrt{1 - Q(2 - Q) \sin^2 \vartheta},$$

en donde:

$$Q = \frac{rV^2}{k^2},$$

siendo $k = \sqrt{GM_e} = 107.10085 \text{ RT}^{3/2} \text{ d}^{-1}$. Los valores de la altura en el perigeo h_p y el apogeo h_a están dados por:

$$h_p = a(1 - e) - R_e,$$

$$h_a = a(1 + e) - R_e,$$

y el periodo orbital por:

$$T = \frac{2\pi a^{3/2}}{k}.$$

De igual modo, el valor de la inclinación orbital está dado por (Chobotov, 2002):

$$\cos i = \sin A \cos \phi.$$

Los valores de algunos de los elementos orbitales del satélite en el momento de ingresar a órbita baja terrestre se presentan en la Tabla 4.

a km	e	h_p km	h_a km	T min	i $^\circ$
7216.5	0.080	261	1415	101.6	46.2

Tabla 4: Algunos parámetros orbitales al momento de la inyección.

Claramente es posible explorar otra serie de azimuts de trayectoria para efectos de colocar satélites con objetivos claramente definidos. Es el caso, por ejemplo, de los satélites en órbita heliosincrónica, frecuentemente utilizados para observación terrestre y que requieren órbitas de tipo polar ligeramente superiores a los 90° . Nuestro código posee la facilidad de cambiar directamente datos de entrada que permitan calcular, y con ello examinar, la factibilidad en la escogencia de rumbos específicos así como valorar los tipos más adecuados de órbitas que se ajusten a las necesidades del país a mediano y largo plazo.

6. Conclusiones

En la presente comunicación se ha realizado el estudio de la trayectoria de vuelo para un cohete de tres etapas lanzado desde un sitio en territorio colombiano con fines de colocar un pequeño satélite (~ 200 kg) a órbita baja. Para ello se integraron las ecuaciones diferenciales de movimiento en un sistema de referencia no inercial así como se definieron algunas características de diseño del vehículo el cual se optimizó a través de un proceso iterativo. Se tuvo en cuenta las fuerzas principales que afectan el movimiento del vehículo, tales como la atracción gravitacional (incluyendo el armónico zonal J_2) así como la fuerza de empuje y aquellas otras que se originan por el movimiento a través de un fluido. Para estas últimas fue preciso utilizar datos de densidad del aire en función de la altura para lo cual se utilizó un modelo atmosférico. Para la integración numérica de las ecuaciones diferenciales se utilizó un código computacional en lenguaje Fortran 77 elaborado por los autores basado en el integrador Radau. Se logró simular la trayectoria de vuelo desde el lanzamiento (ubicado en un sitio en el departamento de la Guajira) y determinar la trayectoria de vuelo para varios valores de azimut. Se determinaron los puntos de impacto de la primera y segunda etapas y se discriminaron de ese modo las trayectorias de vuelo que sobrevuelan por áreas pobladas o limítrofes con otros países. Se estableció que el mejor rango de azimut corresponde a valores entre 45 y 60° .

Este se constituye en el primer análisis realizado en Colombia que se ocupa de estudiar la trayectoria de un cohete (incluso sin apelar a códigos realizados en el extranjero) para posicionar un pequeño satélite de forma lo más realista posible, advirtiendo que son mucho los aspectos que habría que incluir para futuros análisis más detallados, tales como el estudio del perfil atmosférico en la zona próxima al lanzamiento, estudio de vientos, características de los materiales que integran el cohete, forma detallada del vehículo, etc. Tanto el vehículo de lanzamiento como el satélite bien pueden ser de fabricación autóctona, realizable a un corto plazo siempre y cuando el país adopte la decisión, fundamentalmente política, de hacerlo. El análisis es del todo premelimitar, básicamente enfocado en cual tendrían que ser las dimensiones del vehículo y cual tendrían que ser los azimuts de lanzamiento

para minimizar los riesgos de caída de las etapas o de mal funcionamiento del vehículo. Estos resultados han de verse como una primera exploración tendiente a crear conciencia en el medio, de que este tipo de tecnologías pueden ser accequibles a un país como el nuestro, que a pesar de la problemática social y relativamente altos niveles de pobreza, los ejemplos de países en condiciones iguales o peores que el nuestro tales como Irán, Paquistán y Corea del Norte muestran que es posible acceder al espacio por medios autóctonos.

Bibliografía

- Achury, V.** 2005. Modelamiento por CFD Aplicado a un Micro Motor Cohete, Tesis de Pregrado en Ingeniería Mecánica, Universidad Nacional, Bogotá.
- American National Standard Institute, ANSI.** 2004. Guide to Reference and Standard Atmosphere Models. American Institute of Aeronautics and Astronautics, Reston, Virginia.
- Anderson, J.** 2010. Introduction to Flight, McGraw Hill, Singapore.
- Bate, R., Mueller, D., & White, J.** 1971. Fundamentals of Astrodynamics, Dover, New York.
- Calderón, O. & Murcia, J.** 2009. Diseño Conceptual y Preliminar de un Vehículo que Transporta Carga Útil de una Tonelada a Órbitas Bajas, Tesis de Pregrado en Ingeniería Aeronáutica, Fundación Universitaria los Libertadores, Bogotá.
- Calise, A. J. & Leung, M. S. K.** 1995. Optimal Guidance Law Development for an Advanced Launch System, NASA Contractor Report 4667.
- Chobotov, V.** 2002. Orbital Mechanics. American Institute of Aeronautics and Astronautics, Reston, Virginia.
- Escobar, S. & Jaramillo, S.** 2009. Diseño Conceptual de un Motor Cohete de 70 mm de Propelente Sólido. Tesis de Pregrado en Ingeniería Aeronáutica, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín.
- Escorcia, M.** 2011. Estudio Dinámico de los Parámetros Generales de Rendimiento en un Motor Cohete de Propulsión Iónica Mediante el Lenguaje Computacional de Tipo M. Tesis de Pregrado en Ingeniería Aeronáutica, Fundación Universitaria los Libertadores, Bogotá.
- Everhart, E.** 1985. An Efficient Integrator that Uses Gauss-Radau Spacings, Dynamics of Comets: Their Origin and Evolution, Carusi & Valsecchi (edi.): 185-202.
- Galindo, D. & Murcia, J.** Diseño de Cohetes Atmosféricos, Segundo Congreso de Ciencia y Tecnología Aeroespacial, CICTA 2008, Bogotá.
- Garzón, D., Duque, C. & Roa, M.** 2004. Introducción General a la Tecnología de la Propulsión. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Gómez, S. & Castro, H.** 2006. Diseño Preliminar de un Sistema de Propulsión Líquida con Hidrógeno Líquido como Combustible Adaptado a un Rocket Belt, Tesis de Pregrado en Ingeniería Aeronáutica, Universidad San Buenaventura, Bogotá.
- Humble, R., Henry, G. & Larson, W.** 1995. Space Propulsion Analysis and Design. McGraw Hill, New York.
- Joya, R.** 2007. Libertad 1, primer satélite colombiano en el espacio. Innovación y Ciencia, 14: 16-23.
- Kaula, W. M.** 1966. Theory of satellite Geodesy. Blaisdell Pu. Co., Waltham, Massachusetts.
- Koelle, H.** 1961. Handbook of Astronautical Engineering. McGraw Hill, New York.
- Lafleur, J., Fleming, S. & Saleh, J.** 2012. Response Surface Equations for Expendable Launch Vehicle Payload Mass Capability, Journal of Spacecraft and Rockets, 49, (1): 185-189.
- Minzner, R., Champion, K. & Pond, H.** 1959. The ARDC Model Atmosphere, 1959. Air Force Surveys in Geophysics No. 115.
- Portilla, J. G.** 1996. El Problema de los dos Cuerpos y el Problema Principal del Satélite Artificial en Ecuaciones Diferenciales del Primer Orden. Rev. Acad. Colomb. Cien., 20, (76): 25-32.
- Portilla, J. G.** 2001. Astronomía Para Todos. Unibiblos, Bogotá.
- Portilla, J. G.** 2009. Elementos de Astronomía de Posición. Unibiblos, Bogotá.
- Portilla, J. G.** 2013. La órbita del satélite Libertad 1. Aceptado para publicación en la Rev. Acad. Colomb. Cien.
- Robledo, J.** 2011. Diseño Conceptual de un Motor Cohete Iónico para Maniobras Espaciales, Tesis de Pregrado en Ingeniería Aeronáutica, Fundación Universitaria los Libertadores, Bogotá.
- Sutton, G. & Biblatz, O.** 2010. Rocket Propulsion Elements. John Wiley & Sons, New York.
- Tewari, A.** 2007, Atmospheric and Space Flight Dynamics, Birkhäuser, Boston.
- Urrego, A.** 2009. Investigaciones en Cohetería Experimental. Misión Séneca, Lanzamiento del Cohete Ainkaa 1, Tesis de Pregrado en Ingeniería Mecánica, Universidad de los Andes, Bogotá.
- Weiland, C.** 2010. Computational Space Flight Mechanics. Springer, Heidelberg.
- Whitney, C. K., et al.** 1965. Scout Motor Performance Analysis and Prediction Study (PAPS). NASA Contractor Report CR-336.
- Xu, G.** 2008. Orbits. Springer, Berlín.
- Zipfel, P.** 2007. Modeling and Simulation of Aerospace Vehicle Dynamics. American Institute of Aeronautics and Astronautics, Reston, Virginia.

Recibido: 20 de junio de 2013

Aceptado para publicación: 16 de enero de 2014

LAS NUEVAS FRONTERAS DE LA FÍSICA DE LA MATERIA CONDENSADA

THE NEW FRONTIERS OF CONDENSED MATTER PHYSICS

Jon A. Schuller*, Samuel A. Hevia**, Iván K. Schuller***

RESUMEN

Schuller J.A., S. A. Hevia, I. K. Schuller: Las nuevas fronteras de la física de la materia condensada. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 463-468, 2013. ISSN 0370-3908.

La física de la materia condensada es la base de muchas ideas fundamentales en ciencia y es el origen de un sinnúmero de aplicaciones que afectan nuestras vidas diarias. La nanociencia ha producido materiales nuevos con funcionalidades inexistentes en la naturaleza. La computación cuántica aprovecha la superposición de estados físicos para producir fenómenos inesperados y para simular la evolución de sistemas complejos. Los metamateriales, forman una clase de materiales sintéticos que tienen propiedades ópticas fundamentalmente diferentes de lo que existen en la naturaleza.

Palabras clave: nanociencia, computación cuántica, metamateriales

ABSTRACT

Condensed matter physics is the basis for many fundamental ideas in science and the origin for a countless number of applications, which affect our daily life. Nanoscience has produced new materials with functionalities, which don't exist in nature. Quantum computing takes advantage of the superposition of quantum states to produce unexpected phenomena and for the simulation of complex systems. Metamaterials form a class of synthetic materials with optical properties unlike anything found in nature.

Key Words: nanoscience, quantum computing, metamaterials.

Introducción

El 21 de Noviembre de 1783 en los jardines de Rue de Montreuil, Paris, Benjamín Franklin era uno de los cientos que presenciaba un espectáculo maravilloso: el primer vuelo

humano en la historia. Jean-François Pilâtre de Rozier y el Marqués d'Arlandes eran los primeros valientes que se iban a remontar en el aire en un globo inventado por los hermanos Montgolfier. Muchos de los espectadores estaban deslumbrados por este acontecimiento, pero como sucede con cada

* Department of Electrical and Computer Engineering, University of California, Santa Barbara, CA 93106, USA.

** Instituto de Física, Pontificia Universidad Católica de Chile, Av. Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago, Chile.

*** Department of Physics and Astronomy, University of California San Diego, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA.

gran descubrimiento, había algunos cínicos en la audiencia que consideraban que esto era una pérdida de tiempo. Uno de ellos tomó por el brazo a Franklin y le dijo con desprecio:

“Monsieur, franchement, à quoi peut bien servir de s’envoler dans les airs?” (¿Señor, francamente, para que sirve esto de volar en el aire?)

A lo que Franklin respondió:

“Monsieur, à quoi peut bien servir l’enfant qui vient de naître?” (¿Señor, para que sirve un bebé recién nacido?)

Esto ilustra como funciona la ciencia básica. Tal como con un bebé recién nacido, es imposible predecir a dónde va a ir y que llegará a ser. Lo que sí se puede asegurar, es que la totalidad de todos los recién nacidos van a producir muchas maravillas y van a mejorarnos la vida de manera inconcebible e impredecible. Así que cuando miren a los ojos de sus hijos y nietos que recién nacen, recuerden, a lo que están predestinados es a producir algo único, inusual, maravilloso y que es imposible predecir a priori a dónde van a llegar. Como dijo Antonio Machado “Caminante no hay camino, se hace camino al andar”. Lo importante es caminar y uno llegará a algún lugar.

Así es la ciencia básica. Es investigación que se hace para satisfacer la curiosidad innata del hombre de entender la naturaleza. De esto nacen no sólo los conocimientos que nos abren los horizontes, sino también las aplicaciones prácticas que mejoran nuestras vidas.

La física ha tenido un enorme impacto en todas las ciencias naturales. Desarrolló los nuevos conceptos que rigen la ciencia moderna y también es responsable de la mayoría de los métodos modernos de preparación de materiales, diagnosis, e instrumentación usados en las otras ciencias naturales. Por supuesto ésta tuvo un impacto esencial en la industria, en las telecomunicaciones, producción de energía, y dispositivos médicos. Por lo tanto, cuando miren a su alrededor se darán cuenta que la física les está impactando continuamente, mejorando y facilitando sus vidas. Por ejemplo, en un artículo reciente en el New York Times (Noviembre 8, 2009) el Dr. Brent James (el principal fiscalizador de la calidad de hospitales de Intermountain Healthcare) dijo: “El sistema Americano de salud es más caro que cualquier otro, sin producir mejores resultados. La cura está en las mediciones”. Cuando uno habla de mediciones se refiere a lo que se hace con aparatos inventados por físicos; rayos X, ultrasonido, óptica, resonancia magnética, scanners, radiación para diagnosticar y curar, etc. Los médicos estarían completamente perdidos sin los aparatos que la física les ha brindado.

Pasado

En 1871 cuando comenzó sus clases de física en Cambridge, James Clerk Maxwell, el inventor de las ecuaciones que describen el electromagnetismo, dijo: “en unos pocos años los físicos se dedicaran a agregar algunos decimales a las constantes físicas”. El famoso Lord Kelvin, cuyo nombre se usa como unidad para medir la temperatura (grados Kelvin), dijo al final del siglo XIX que la física estaba acabada, que todo se entendía y que las teorías físicas funcionaban tan bien que no podían estar mal y que sólo alguna que otra “cosita” necesitaba explicación. Fueron justamente los estudios de estas “cositas” que llevaron a la teoría cuántica y a la relatividad.

Los logros pasados de la física antes de la era moderna son tan numerosos que es casi imposible resumir sus efectos sobre la sociedad. Sin embargo, hay algunos conceptos claves que han tenido un efecto inmedible. Uno de estos, debido al famoso físico italiano Galileo Galilei, es que la manera de entender el universo es haciendo experimentos y observaciones. Con anterioridad a él, las ideas aristotélicas planteaban que el pensamiento puro podía llevarnos a un entendimiento de la naturaleza. Galileo hizo experimentos sobre la caída de objetos desde la torre de Pisa y apuntó sus telescopios a los cielos descubriendo nuevos astros. Esta idea de no sólo pensar y elucubrar, sino que además comparar y aprender observando la naturaleza, delinea las actividades científicas modernas.

Mecánica Clásica

La mecánica clásica, principalmente desarrollada por Newton y contenida en las leyes que llevan su nombre, describen el comportamiento de prácticamente todos los objetos macroscópicos. La gran revolución en el pensamiento científico introducido por Newton, fue que las mismas leyes rigen el comportamiento de los astros y de los objetos terrestres. Lo interesante y fascinante es que las ideas de Newton son simples y se pueden resumir en tres leyes que cualquier estudiante de física elemental las puede entender y aplicar. Estas leyes se utilizan en el diseño de variadas máquinas, como por ejemplo las que se usan en sistemas industriales o en el transporte que reemplazó a los animales de carga. Nos permitieron mandar un hombre a la luna y nos ayudan a ubicar satélites que facilitan las comunicaciones. Así que cuando manejen sus autos, viajen en avión, usen el GPS o miren televisión, recuerden que todo esto sería imposible sin el desarrollo de la física.

Electricidad y Magnetismo

Antes del siglo XIX la electricidad y el magnetismo eran una de esas curiosidades descubiertas por los griegos y los chinos

en minerales como la magnetita y el ámbar. Eran dos fenómenos que aparentemente no tenían ninguna relación entre sí, pero en el siglo XVIII una gran actividad en el desarrollo de experimentos y teorías dio origen al entendimiento moderno de la electricidad y el magnetismo como fenómenos que tienen un origen común. El origen y comportamiento de estos, fue resumido de una manera muy compacta por Maxwell, en lo que hoy en día se conoce como las ecuaciones de Maxwell. Estas ecuaciones no sólo explican de una manera unificada muchos experimentos y observaciones, sino que además condujeron a la generación de electricidad por medios mecánicos, tal como los utilizados en plantas hidroeléctricas. Esto nos permitió modificar el mundo a nuestro alrededor, ya no dependíamos del sol o de velas para calentarnos e iluminar el ambiente.

Las ecuaciones de Maxwell tienen incorporados una serie de fenómenos tales como la relatividad especial, que fue desarrollada mucho más tarde por Einstein, o la existencia de ondas electromagnéticas. Según esto, el universo está lleno de campos electromagnéticos que bajo ciertas condiciones pueden producir ondas que se propagan de un lugar a otro con la velocidad de la luz. Esto suena como ciencia ficción o más aún, magia. Pero el hecho es que estas mismas ondas electromagnéticas son las que se usan para transmitir señales de radio y televisión. Por lo tanto cuando miren la TV recuerden: ¡esto se debe todo a la física! Incluyendo el televisor.

Presente

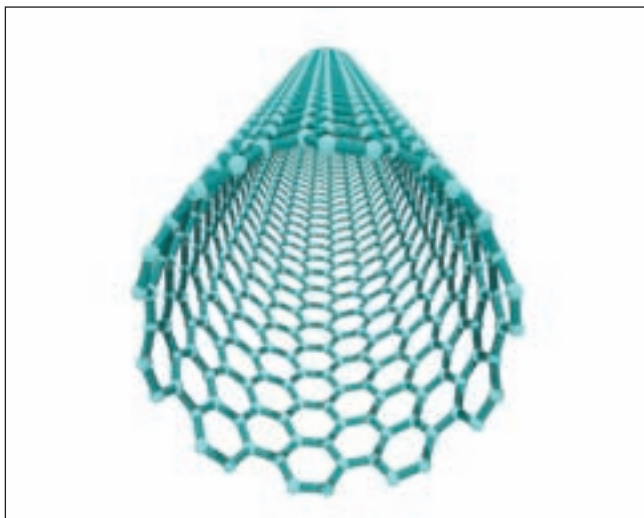


Figura 1. Un ejemplo de un material nanométrico es el “nanotubo” formado por átomos de carbono. Las propiedades de este diminuto “tubo” son regidas por la mecánica cuántica (Saito et al. 1998).

Durante el principio del siglo XX una gran revolución ocurrió en la física solo por intentar resolver las “cositas” inexplicables que mencionaba Lord Kelvin. Una de estas cositas era la “emisión espectral” de los diferentes elementos del sistema periódico. Los átomos de los distintos elementos pueden liberar energía mediante la emisión de luz. Esta emisión de luz consiste de un conjunto de diferentes colores (longitudes de ondas) que es propio de cada elemento. Estos “espectros de emisión” eran una de esas curiosidades que no se entendían y que parecían sumamente complicadas. La teoría de la mecánica cuántica, un tema que ahora se enseña en los cursos elementales de las carreras de física y química, explicó estas emisiones de una manera relativamente sencilla. Otra “cosita” curiosa e inexplicable era el experimento (Michelson-Morley, 1887) en el cual se demostró que la luz viajaba a una velocidad constante independiente de si el observador se está moviendo o no. Note que esta observación es muy poco intuitiva, ya que no es cierta para ningún otro objeto que estamos acostumbrados a observar. Por ejemplo, si un niño hace rodar una pelota por el pasillo de un tren en movimiento, la velocidad de la pelota vista desde la estación es diferente a la vista por un pasajero del tren. Esta “pequeña” curiosidad dio origen a la relatividad especial, que ahora se enseña en los cursos de física básica.

La mecánica cuántica logró explicar los fenómenos a escala atómica, o sea, fenómenos que se manifiestan cuando se estudian objetos constituidos de tan sólo unos pocos átomos. El comportamiento de la materia a esta escala es completamente diferente a lo que estamos acostumbrados. Por ejemplo, un fenómeno extremadamente exótico e inesperado es el llamado “efecto túnel”, el cual es predicho por la ecuación fundamental de la mecánica cuántica, conocida como la ecuación de Schrödinger. Esta predice por ejemplo, que cuando un objeto choca contra una muralla, en lugar de rebotar a veces la atraviesa. Esto nuevamente suena a magia porque contradice nuestra experiencia diaria. A pesar de ello, cada uno de nosotros utiliza este fenómeno millones de veces al día en el cabezal que lee la información en el computador. Así, otra vez la física triunfa incluso cuando las predicciones suenan esotéricas o contradicen nuestra intuición común. La mecánica cuántica explica un sinnúmero de fenómenos químicos, bioquímicos, electrónicos y propiedades de materiales, incluso a escala subatómica. Ejemplos de estos nuevos fenómenos son el efecto transistor (Premio Nobel de Física 1956), el efecto láser (Premios Nobel de Física 1964), la superconductividad (Premios Nobel de Física 1972), la teoría de las interacciones químicas (Premio Nobel de Química 1998), el comportamiento de fibras ópticas (Premio Nobel de Física 2009), etc. Los resultados prácticos que surgieron de estos descubrimientos fundamentales cubren toda la electrónica moderna, comunicaciones, mediciones

en medicina, dispositivos médicos para hacer operaciones o para mejorar la visión en oftalmología. Todo debido en gran parte... ¡a la física!

Futuro

Predecir a dónde van a llevar los nuevos desarrollos científicos es muy difícil, quizás imposible. Niels Bohr mismo dijo que “lo mas difícil para predecir, es el futuro”. Durante los últimos 25 años hubo un desarrollo vertiginoso de las telecomunicaciones y la computación, lo que nos condujo a tener acceso casi ilimitado a información y nos permitió poder comunicarnos a cualquier parte del mundo de manera instantánea a través del Internet. Todo esto es consecuencia inesperada y sorprendente debida en gran parte al desarrollo científico en el ámbito de la física de la materia condensada. Pocas personas vislumbraron a mediados del siglo XX que hoy en día casi todo el mundo iba a tener acceso a un computador, el cual le permitiría comunicarse con sus amigos y tener acceso ilimitado a cualquier biblioteca en el mundo. ¡Gratis!

En lo que prosigue de este artículo trataremos de hacer una extrapolación realista de la nueva ciencia y posibles aplicaciones que podrían surgir en tres áreas que se están investigando intensamente. Estas investigaciones seguramente van a llevar a nuevas ideas, nuevos materiales, dispositivos, funcionalidades y aplicaciones que son difíciles de predecir. Las ideas que vamos a describir son extensiones de ciencia

y tecnología presente, aunque lo más probable es que no van a ser aplicadas tal como las describimos. Para algunos, esto va a parecer ciencia ficción, pero cuando eso suceda piensen que lo mismo dirían a comienzos del XX cuando les hablaban de las tecnologías actuales.

Nanociencia

La Nanociencia se refiere al estudio y manipulación de objetos con dimensiones mayores que las de un átomo pero mucho más pequeñas que las de un objeto macroscópico (ver figura 2). Los conocimientos desarrollados durante el siglo XX llevaron a un entendimiento cuantitativo de la estructura atómica y de las propiedades de los materiales con dimensiones macroscópicas. Sin embargo, en el rango de tamaños intermedios, del orden de unos cientos de nanómetros (un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro), la materia tiene propiedades completamente nuevas e inesperadas. No se comporta ni como los constituyentes atómicos ni como el material masivo (**Montero** et al. 2003). Por lo tanto mediante la manipulación de objetos con estas dimensiones intermedias, es posible crear materiales y dispositivos con nuevas propiedades (**Fullerton** et al. 2007). Por ejemplo, materiales aisladores se pueden transformar en metálicos (**Ohtomo** et al. 2004), materiales químicamente inertes se ponen reactivos (**Yoon** et al. 2007) o propiedades magnéticas son manipulables con estímulos externos como la luz (**Cauro** et al. 2001). Estos descubrimientos y posibilidades que ofrece la investigación básica en la física de la materia condensada

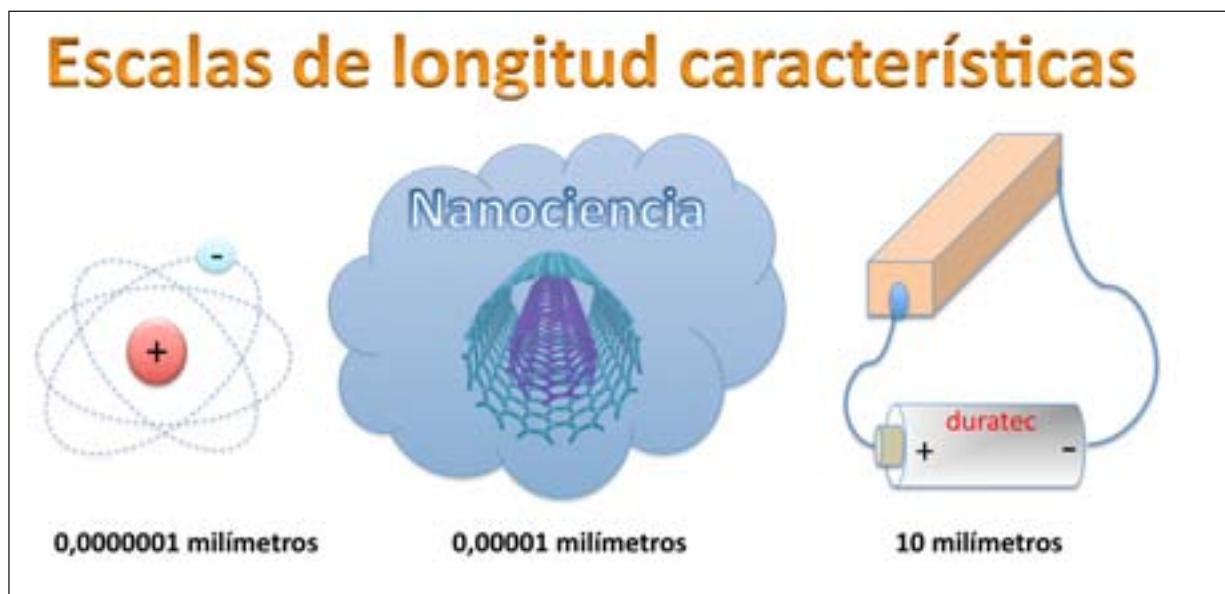


Figura 2 Nanociencia, estudio y manipulación de objetos con dimensiones mucho mayores que las de un átomo pero mucho más pequeñas que las de un objeto macroscópico.

nos da la capacidad de crear nuevos materiales y desarrollar dispositivos con funcionalidades nuevas que no existen en la naturaleza. ¡El sueño del alquimista! Esto abre una amplia gama de posibles aplicaciones en diversos campos. Por ejemplo, nos va a permitir estudiar y simular inteligencia artificial, desarrollar nuevos catalizadores, producir energía limpia de manera más eficiente, guiar drogas a determinados sitios en el cuerpo y soltarlos precisamente donde producen los mayores beneficios. Diagnosticar y quizás reparar órganos con técnicas no invasivas. Pero como siempre, primero viene la investigación fundamental que desarrolla las ideas que son la base de las aplicaciones. Es muy importante darse cuenta que la conexión entre los resultados de la ciencia básica y las aplicaciones es imposible de predecir a priori.

Computación Cuántica

La computación actual se basa en dispositivos llamados “bits” que pueden estar en dos estados distintos, comúnmente designados como un cero o un uno. Por ejemplo, un interruptor puede estar abierto (un cero) o cerrado (un uno). Toda la computación está basada en manipular estos ceros y unos en millones de dispositivos, millones de veces por segundo. A pesar del continuo aumento en la capacidad de cómputo de los computadores actuales, existe un límite superior que no podrá ser superado si no se modifica la tecnología en la cual están basados. Una alternativa es la planteada por la computación cuántica (**DiVincenzo** et al. 1995). Esta se basa en un concepto sumamente extraño, pero que es real y está comprobado experimentalmente; la superposición de estados cuánticos. Esto dio origen a la famosa paradoja del gato de Schrödinger, en que un gato puede estar vivo y muerto a la vez, o sea está en la superposición de sus dos posibles estados. En un dispositivo cuántico de dos estados, no sólo existe la posibilidad de que el dispositivo esté en uno de esos dos estados, sino que también puede estar en una “superposición” de los dos estados cuánticos. Por ejemplo, el interruptor no sólo está abierto o cerrado, sino que también puede estar cerrado y abierto a la vez.

La computación cuántica está basada en manipular esta superposición de estados cuánticos. En principio de esta manera la computación ocurre en paralelo, acelerando los cálculos miles de millones de veces. Un logro extraordinario. El desafío es como implementar estas ideas en dispositivos que se puedan construir y manipular con la tecnología presente. Varias implementaciones se están investigando, incluyendo: átomos confinados en un campo electromagnético, junturas de Josephson, electrones flotando en la superficie del helio, nanopuntos semiconductores, etc. Cuál de ellos eventualmente surgirá como la solución, es difícil de predecir.

Los campos aplicados que podrían beneficiarse enormemente del crecimiento en poder computacional incluyen: la predicción del clima, traductores instantáneos, inteligencia artificial o diagnósticos médicos continuos. Todo consecuencia inesperada de la física de la materia condensada.

Metamateriales

Generalmente se dice que “nada puede viajar más rápido que la luz”, pero esto no es completamente cierto. Esta frase hay que modificarla levemente: “nada puede viajar más rápido que la velocidad de la luz en el vacío”. Cuando la luz viaja dentro de un material, su velocidad baja por un factor n , que se denomina el “índice de refracción”. En los materiales transparentes comunes, como el vidrio, el índice de refracción es positivo y tiene un valor cercano a uno ($n \sim 1.5$). En materiales más exóticos, como un vapor atómico ultra-frío, algunos físicos han logrado aumentar el índice de refracción muchas veces, bajando la velocidad de la luz acercándose a la velocidad de una bicicleta (**Hau** et al. 1998). Al poner en contacto dos materiales de índice de refracción distintos y hacer pasar un rayo de luz a través de ellos, la luz, además de cambiar su velocidad en la interfaz entre los materiales, también cambia su dirección. Este efecto es el que origina que una cuchara se vea doblada cuando está dentro de un vaso con agua.

En los materiales comúnmente encontrados en la naturaleza, el índice de refracción es siempre positivo. ¿Qué pasaría si uno lograra crear un material que tenga un índice de refracción negativo? La predicción es que los rayos de luz se doblarían en la dirección opuesta a la cual se doblan en un material común. Como consecuencia, un simple bloque de un “metamaterial” formaría una imagen, pero una lente curvada no (ver figura 3) (**Smith** et al. 2004). Estas predicciones se hicieron hace varios años pero nunca se habían comprobado experimentalmente. En los últimos años la tecnología ha avanzado considerablemente, lo que nos ha permitido poder fabricar materiales artificiales con índice de refracción negativo, o sea, “metamateriales”. Además de modificar nuestro entendimiento de conceptos básicos de óptica, esto tiene un potencial enorme en el desarrollo inesperado de muchas nuevas aplicaciones. Ejemplos de aplicaciones que se vislumbran incluyen aviones invisibles al radar (**Schurig** et al. 2006), lentes que pueden resolver estructuras mucho más pequeñas (**Fang** et al. 2005), ópticas nuevas para curar el desprendimiento de retina, la degeneración macular y la ceguera. Y como ya lo pueden adivinar ¡todo debido a la física de la materia condensada!

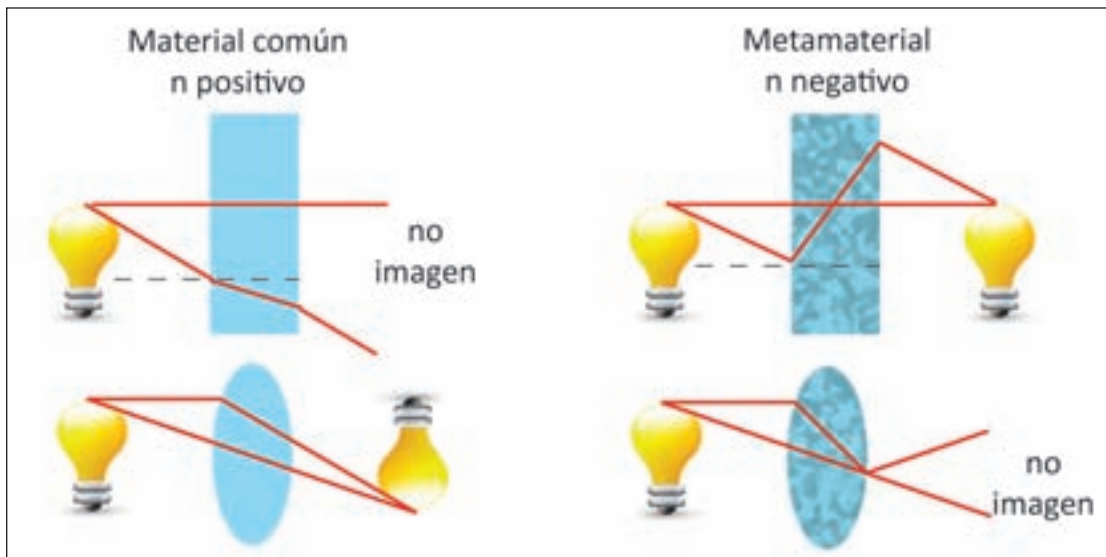


Figura 3 Comparación de las propiedades ópticas de un material común y un metamaterial.

Resumen

Como siempre y como un buen resumen de este artículo, hay que tomar en consideración que los metamateriales son un tema de investigación básica. Al igual que con todos los demás temas de investigación básica, es difícil predecir dónde y cómo estos van a ser utilizados. Lo que podemos asegurar con certeza absoluta es que la totalidad de la investigación va a llevar a muchas nuevas maravillas todavía inconcebibles. Tal como nuestros hijos que van a caminar por nuevos senderos todavía inimaginables.

Agradecimientos

La ciencia y en particular la física dependen crucialmente de fondos de investigación, colaboraciones y apoyo familiar. Agradecemos el apoyo financiero de las instituciones NSF, DOE, AFOSR, ONR, NATO, CONICYT, FONDECYT y la ayuda del Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología (CEDENNA). Este manuscrito está basado en trabajo de muchos años y un manuscrito anterior en la Revista Franco-Chilena de Oftalmología, *12*, 28 (2010). Las interacciones y ayuda de cientos de colaboradores, jóvenes y viejos, con los cuales hemos interactuado es crucial. El apoyo y la ayuda de nuestras familias son invaluable.

Bibliografía

Cauro R., Gilabert A., Contour J. P., Lyonnet R., Medici M.-G., Grenet J. C., Leighton C., Schuller I. K. 2001. Persistent and transient photoconductivity in oxygen-deficient $\text{La}_2/3\text{Sr}_{1/3}\text{MnO}_3$ - δ thin films. *Phys. Rev. B* **63** (17): 174423.

- DiVincenzo D. P.** 1995. Quantum Computation. *Science* **270** (5234): 255–261.
- Fang N., Lee H., Sun C., Zhang X.** 2005. Sub-Diffraction-Limited Optical Imaging with a Silver Superlens. *Science* **308**: 534-537.
- Fullerton E. E., Schuller I. K.** 2007. The 2007 Nobel Prize in Physics: Magnetism and Transport at the Nanoscale. *Am. Chem. Soc. Nano* **1** (5): 384-389.
- Hau L. V., Harris S. E., Dutton Z., Behroozi C. H.** 1998. Light speed reduction to 17 metres per second in an ultracold atomic gas. *Nature* **397**: 594-598.
- Montero M. I., Schuller I. K.** 2003. Nanoestructuras: un Viaje de Tres a Cero Dimensiones. *Revista Española de Física* **17** (2): 35-39.
- Ohtomo A., Hwang H.Y.** 2004. A High-Mobility Electron Gas at the $\text{LaAlO}_3/\text{SrTiO}_3$ Heterointerface. *Nature* **427**: 423-426.
- Saito R., Dresselhaus G., Dresselhaus M. S.** 1998. *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. Imperial College Press. London.
- Schurig D., Mock J. J., Justice B. J., Cummer S. A., Pendry J. B., Starr A. F., Smith D. R.** 2006. Metamaterial Electromagnetic Cloak at Microwave Frequencies. *Science* **314**: 977-980.
- Smith D. R., Pendry J. B., Wiltshire M. C. K.** 2004. Metamaterials and Negative Refractive Index. *Science* **305**: 788-792.
- Yoon B., Koskinen P., Huber B., Kostko O., von Issendorff B., Hakkinen H., Moseler M., Landman U.** 2007. Size-dependent structural evolution and chemical reactivity of gold clusters. *Chem. Phys.* **8** (1): 157-161.

Recibido: 15 de octubre de 2013

Aceptado para publicación: 11 de enero de 2014

BIOPROSPECCIÓN DE PLANTAS NATIVAS PARA SU USO EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN: CASO *HELICONA PSITTACORUM* (HELICONIACEA)

BIOPROSPECTING OF NATIVE PLANTS FOR THEIR USE IN BIOREMEDIATION PROCESS: *HELICONIA PSITTACORUM* CASE (HELICONIACEAE)

Peña-Salamanca Enrique J.^{*}, Madera-Parra Carlos A.^{**}, Sánchez, Jesús M.^{***}, Medina-Vásquez Javier^{****}

RESUMEN

Peña-Salamanca E. J., C. A. Madera-Parra, J.M. Sánchez, J. Medina-Vásquez: Bioprospección de plantas nativas para su uso en procesos de biorremediación: caso *Heliconia psittacorum* (heliconiaceae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 469-481, 2013. ISSN 0370-3908.

La fitoremediación es el proceso que emplea la vegetación para el tratamiento de la contaminación en el agua, suelo y aire. Los Humedales artificiales de flujo sub-superficial y superficial, constituyen la principal aplicación tecnológica para la matriz agua, basada en un tipo de plantas cuya características principales son la hiperacumulación de sustancias tóxicas, y transformación de dichos compuestos gracias a sus propiedades biológicas. Recientemente, se han estudiado el empleo de especies nativas como el caso de las Heliconias, cuyo uso más reconocido es en la ornamentación. Los estudios realizados con *Heliconia psittacorum* para evaluar su potencial fitoremediador se ha logrado demostrar que la especie presenta características adecuadas a las condiciones en los humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales, a partir de su capacidad de eliminación de DBO₅, DQO y SST, por encima del 70 % de remoción sin detrimento de sus propiedades fisiológicas. Los resultados aquí presentados plantean la necesidad de ampliar la evaluación del desempeño de especies nativas frente a la capacidad de tolerancia de las mismas para el manejo del estrés del contaminante. Esta información complementaria es importante para identificar los problemas del tratamiento de aguas residuales mediante la fitoremediación en zonas tropicales.

Palabras clave: fitoremediación, humedales artificiales, *Heliconia*, plantas hiperacumuladoras.

ABSTRACT

Phytoremediation is a process that use plants for the treatment of contamination in the water, soil and air. Surface and Subsurface flow constructed wetlands are the main technological application for water matrix, based in

* Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología enrique.pena@correounivalle.edu.co

** Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Escuela EIDENAR carlos.a.madera@correounivalle.edu.co

*** Universidad del Valle, Facultad de Administración, Instituto de Prospectiva, jotasanchez19@yahoo.com

**** Universidad del Valle, Facultad de Salud, Escuela de salud pública, Maestría en salud pública jmedina@univalle.edu.co

a specific plant type whose main features are hyper accumulate of toxics substances and transformation of these substances through biological properties. Recently, there has been studying the use of native plants such as *Heliconia*, which it is well-known for ornamental purposes. Recent studies has demonstrated the performance of *H. psittacorum* for wastewater treatment, based in its removal capacity in terms of DBO₅, DQO and SST (efficiencies >70 %). Those results indicate the importance to evaluate removal efficiencies, plant tolerance and physiological responses under stress conditions. Additional studies are needed to identify the optimal bed design for the treatment of high-strength wastewater in tropical areas.

Key words: phytoremediation, constructed wetlands, *Heliconia*, hyper accumulator plants.

1. Introducción

La fitoremediación se define como el uso de plantas para eliminar, destruir o transformar contaminantes del suelo, agua y aire (Zhi-xin *et al.*, 2007; Panich-Pat *et al.*, 2010). En este proceso, las plantas son seleccionadas principalmente por su potencial fisiológico, como en el caso de enzimas presentes para tolerar y asimilar sustancias tóxicas, por sus tasas de crecimiento, por la profundidad de sus raíces y su habilidad para bioacumular y/o degradar contaminantes (Peña-Salamanca *et al.*, 2005; Ospina-Álvarez *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2009). La vegetación con este tipo de características se conoce como plantas hiper-acumuladoras (Peña-Salamanca, 2005), por su capacidad de acumular uno o más elementos inorgánicos, a niveles cien veces más altos que el ambiente circundante y que otras especies creciendo bajo las mismas condiciones ambientales (Pilon-Smits, 2005).

En las eco tecnologías de tratamiento como el caso de los humedales artificiales, las plantas cumplen un papel preponderante en la transformación de las sustancias tóxicas que allí se depositan. Éstas deben adaptarse a una situación de estrés por cuanto están expuestas a la contaminación (Bragato *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2009). La evaluación de parámetros fisiológicos como el potencial hídrico, retención y eliminación de nitrógeno (N) y las tasas fotosintéticas, sirven de indicadores de la capacidad de respuesta de la planta (Tanner, 2001). En el afluente del humedal, la materia orgánica contenida en el agua residual doméstica (ARD), se presenta en forma de material suspendido y disuelto, y abarca un gran número de compuestos químicos. La cantidad de estos compuestos es caracterizada por parámetros como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), la demanda química de oxígeno (DQO), carbono orgánico total (COT) y sólidos suspendidos totales (SST) (Gómez & Segura, 2008; Peña-Salamanca *et al.*, 2009).

Sobre el funcionamiento de este tipo de sistemas y el papel de la vegetación es muy poco lo que se conoce, especialmente en latitudes tropicales, por lo que se hace necesario estudiar los procesos internos involucrados en la transformación del contaminante con el fin de optimizar su desempeño (Kivai-

si, 2001; Barceló & Poschenrieder, 2003; Gómez & Segura, 2008). En ellos, plantas y microorganismos, participan activamente en la eliminación de contaminantes como patógenos, nutrientes o químicos orgánicos e inorgánicos (Bragato *et al.*, 2006; Kantawanichkul *et al.*, 2009; Konnerup *et al.*, 2009). Las plantas secuestran los nutrientes y los almacenan en raíces y brotes o para el caso de metales pesados, los acumulan en otros tejidos, siendo útiles así en los procesos de biorremediación (Bragato *et al.*, 2006). Entre los mecanismos de transformación o eliminación de contaminantes evidenciados en estas unidades se encuentran: sedimentación, precipitación, transformación química, adsorción, cambio iónico en la planta, biodegradación del sustrato, rompimiento, transformación y asimilación de nutrientes (Haberl *et al.*, 1998; 1999; Quipuzco, 2002).

Heliconia psittacorum (Kress *et al.* 2001, Kress *et al.* 1993) es una especie neotropical de uso comercial que desde los años 70's se ha cultivado, debido en gran parte, a su valor ornamental. La mayoría de las especies del género *Heliconia*, se distribuyen en el Neotrópico, desde el sur de México hasta el norte de Argentina, incluyendo las islas del Caribe. Colombia es considerada el país más diverso en Heliconias con 94 especies que equivalen a aproximadamente el 50% del total de especies descritas. En el país, las especies de este género alcanzan la mayor diversidad entre los 500 y los 1500 m.s.n.m. y tienen dos sitios altamente diversos: la vertiente Pacífica y los Andes (Kress *et al.* 1993). Recientemente, estudios han evaluado el papel de esta especie en la remediación de aguas residuales encontrando efectos positivos en la bioremediación (Ascuntar & Toro 2007, Gomez & Segura 2008, Gutiérrez 2009a 2009b, Sandoval 2009, Peña *et al.*, 2011). Estas evidencias muestran una cierta tolerancia de *H. psittacorum* a un amplio espectro de condiciones ambientales, por lo que la hace una especie atractiva para su uso en sistemas naturales como los humedales construidos subsuperficiales (HC) para el tratamiento de aguas residuales (Brisson y Chazarenc, 2009, Maza, 2006, Madera *et al.*, 2013).

El propósito de este trabajo es examinar el papel de las plantas en los procesos de transformación y eliminación de la

materia orgánica en sistemas naturales para el tratamiento de aguas residuales como el caso de los HC, utilizando como planta modelo la especie *Heliconia psittacorum* a partir de trabajos científicos realizados en Colombia. Adicionalmente, se presentara la información de la respuesta fisiológica de la vegetación frente al estrés generado por la presencia de contaminantes en la matriz agua, así mismo, se hace un análisis comparativo de la potencialidad de plantas cosmopolitas y tropicales para su uso en la fitoremediación.

2. Metodología

La metodología empleada tuvo en cuenta la revisión y análisis de documentos y artículos científicos relacionados con experiencias en el uso de *Heliconia* en HC (fitoremediación) de aguas residuales. El análisis se realizó a partir de la evaluación del desempeño de las especies en estos sistemas naturales, para lo cual se tomaron en cuenta variables que se detallan en la Tabla 1. Las especies seleccionadas fueron *Heliconia psittacorum* como planta modelo de ambientes tropicales y una planta cosmopolita como el caso *Phragmites australis*, especie comúnmente empleada en humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales (Zhi & Ji 2012).

Tabla 1. Variables empleadas para la comparación del desempeño de *Heliconia psittacorum* en el tratamiento de aguas residuales.

Parámetro	Descripción
Materia orgánica (MO) : DBO ₅ , DQO, SST	Busca establecer la capacidad del sistema para reducir el contenido de materia orgánica en el agua, lo cual es importante dado el impacto ambiental que la MO causa en los cuerpos hídricos.
Nutrientes: Nitrógeno y Fosforo	Determinar que tan eficiente es el sistema con <i>Heliconia ps</i> en la reducción de los parámetros que más contribuyen a fenómenos tan complejos como la eutrofización de cuerpos de agua especialmente oligotróficos
Patógenos: <i>e coli</i> y huevos de helmintos	Determinar el aporte en reducir entero bacterias y helmintos asociados a enfermedades del tracto digestivo en el ser humano.
Metales pesados: Cd (II), Hg (II), Pb (II) y Cr (VI)	Identificar la capacidad de acumulación de metales pesados, que son elementos con un alto grado de toxicidad para el ser humano.

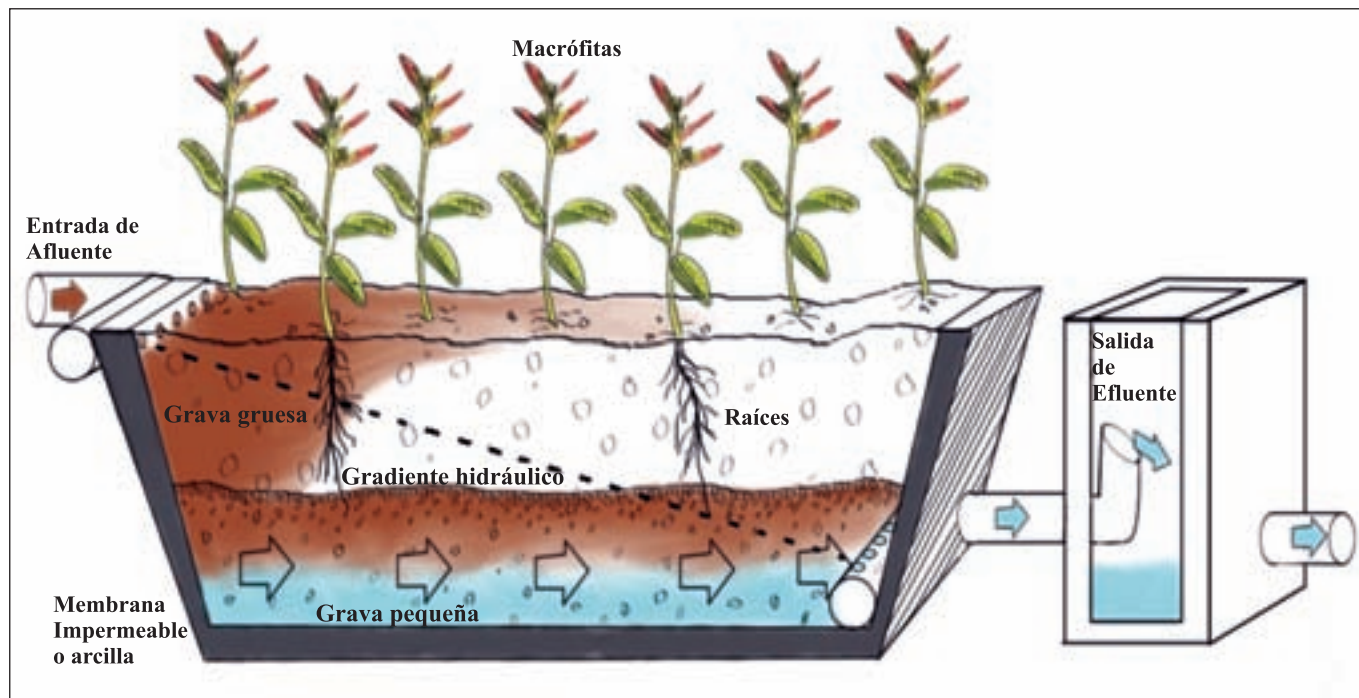


Figura 1. Elementos de un humedal artificial de flujo subsuperficial.

3. Humedales Construidos

En los humedales construidos subsuperficiales (HCS), los procesos aeróbicos predominan cerca de la rizósfera, en la cual se presenta el crecimiento microbiano más importante de la superficie del medio de soporte (Madigan *et al.*, 2004; Gómez & Segura, 2008; Li *et al.*, 2009). Lo anterior, da lugar a diferentes procesos microbianos que la convierten en la zona de reacción activa de estos sistemas (Kadlec *et al.*, 2000; Stottmeister *et al.*, 2003). En términos generales los HCS (Figura 1) están compuestos de un medio filtrante, de un tipo de vegetación y microorganismos asociados, cada uno desempeñando funciones que favorecen el tratamiento del agua residual, a través de la captura y fijación de la materia orgánica y su posterior incorporación a los procesos fisiológicos de plantas y microorganismos (Kura *et al.*, 1997). Los HCS pueden ser además de flujo horizontal o flujo vertical (Chazarenc & Merlin, 2004; Cooper, 2004). Estos sistemas se han convertido en alternativas económicas y efectivas, utilizados en varios países de zonas templadas (Zhi-xin *et al.*, 2007; Bragato *et al.*, 2009; Kantawanichkul *et al.*, 2009; Mirza *et al.*, 2011).

3.1 Plantas hiperacumuladoras

Las plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad de acumular y transformar una variedad de compuestos tóxicos, en especial metales (Mirza *et al.*, 2011, Peña-Salamanca *et al.*, 2004). Su capacidad fitoremediadora se mide a partir de sus tasas de crecimiento y de acumulación, para obtener un valor de extracción (en gramos o kilogramos de metal por hectárea y año), además deben presentar un alto rango de tolerancia a condiciones tóxicas (Zhi-xin *et al.*, 2007). Este tipo de plantas se definen como aquellas que contienen más de 0,1% de su peso seco de Co (Cobalto), Cu (Cobre), Cr (Cromo), Pb (Plomo) o Ni (Níquel), o 1% de su peso seco de Mn (Manganeso) o Zn (Zinc) (Prasad, 2004; Wei *et al.*, 2009). No obstante, existen especies naturales o mejoradas que pueden acumular concentraciones de 2-4% de su peso seco (Brooks, 1998).

Debido a que los requerimientos de eliminación de metales son cada vez mayores, se calcula que las plantas naturales son muy lentas para ajustarse a estas medidas. La principal limitante de las plantas hiperacumuladoras naturales, es su baja tasa de crecimiento, por lo cual se considera incrementar sus tasas por medio de ingeniería genética, para alcanzar valores mayores. Por otro lado, la limitada solubilidad de los metales en los suelos es otro inconveniente que está siendo resuelto con el uso de quelantes u otros surfactantes en el suelo o en el agua, o con la combinación de la fitoremediación con técnicas *in situ* como la electroósmosis para estimu-

lar la movilidad de los metales hacia la planta. Igualmente, el uso de hongos simbióticos con las raíces (micorrizas), está siendo estudiado para mejorar la habilidad de la planta para absorber agua y ciertos nutrientes, incrementando el área superficial disponible para la absorción (Prasad, 2004).

Entre las plantas comúnmente usadas en estos sistemas de HCS se pueden encontrar especies de la familia, Brassicaceae, y plantas acuáticas del género *Typha*, *Juncus*, *Lemna* y *Eichornia*, entre otras (Peña-Salamanca, 2005). El papel de estas y otras plantas en la fitoremediación, puede observarse en la Tabla 2. Al momento de seleccionar una planta para fitoremediación, es importante tener en cuenta sus requerimientos fisiológicos de crecimiento y su condición de planta nativa o introducida para evaluar su espectro de distribución. Recientemente se ha venido estudiando la vegetación nativa que permita identificar especies con potencial para su uso en fitoremediación a partir de biodiversidad regional tropical (Prasad, 2004). En la Tabla 3, se consignan diferentes especies vegetales nativas tropicales, junto con los parámetros analizados y algunas aplicaciones a nivel local y nacional.

Tabla 2. Plantas usadas en fitoremediación (Modificada de Prasad, 2004 y Torres & Vasquez, 2010).

Planta	Papel en fitoremediación
<i>Agropyron cristatum</i>	Remediación de compuestos orgánicos como PCP (fenilciclohexilpiperidina) y PAH (Polihidroxialcanoatos)
<i>Alyssum</i> spp.	Acumula níquel
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Acumula ¹³⁷ Cs (Cesio)
<i>Armoracia rustica</i>	Cultivos de pelos radiculares retiran metales pesados
<i>Armeria marítima</i>	Acumula plomo
<i>Asthenatherum forsskalii</i>	Remediación de hidrocarburos de petróleo
<i>Altriplex prostrata</i>	Retira sal del suelo
<i>Azolla pinnata</i>	Acumula plomo, cobre, cadmio y hierro
<i>Brassica canola</i>	Remedia suelos contaminados con ¹³⁷ Cs
<i>Brassica juncea</i>	Hiperacumuladora de metales
<i>Cannabis sativa</i>	Hiperacumuladora de metales
<i>Cardamonopsis hallerii</i>	Hiperacumuladora de metales
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Acumuladora de metales. Retira TNT (trinitro tolueno)
<i>Cyperus conglomeratus</i>	Remediación de hidrocarburos de petróleo
<i>Datura innoxia</i>	Acumula bario
<i>Eucalyptus</i> spp.	Retira sodio y arsénico
<i>Eichornia crassipes</i>	Acumula plomo, cobre, cadmio y hierro
<i>Helianthus annuus</i>	Acumula plomo y uranio Retira ¹³⁷ Cs y ⁹⁰ Sr (Estroncio) en reactores hidropónicos
<i>Hydrocotyle umbellata</i>	Acumula plomo, cobre, cadmio y hierro
<i>Kochia scoparia</i>	Retira ¹³⁷ Cs y otros radionucleicos
<i>Lemna minor</i>	Acumula plomo, cobre, cadmio y hierro
<i>Myriophyllum spicatum</i>	Degrada TNT
<i>Phaseolus acutifolius</i>	Acumula ¹³⁷ Cs

<i>Phragmites communis</i>	Tratamiento de contaminantes orgánicos en aguas residuales
<i>Potamogeton nodus</i>	Elimina TNT
<i>Populus deltoides</i>	Agua freática contaminada con TCE (tricloro etileno)
<i>Populus charkowiensis</i> x <i>P. incassata</i>	Degradación de TCE
<i>Populus trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	Eliminación de TCE, TCA (tricloroetano) y CT (tetracloruro de carbono)
<i>Paulownia sp.</i>	Disminuye el N. Posee altos niveles de absorción
<i>Sagittaria latifolia</i>	Elimina TNT
<i>Salicornia</i>	Elimina sal del suelo
<i>Salix sp.</i>	Fitoextracción de metales pesados, tratamiento de aguas residuales y de escorrentía
<i>Solanum nigrum</i>	Cultivos de células pilosas detoxifican PCBs (Bifenilos policlorados)
<i>Spartina alternifolia</i>	Elimina sal
<i>Spergularia</i>	Elimina sal del suelo
<i>Stipagrostis plumosa</i>	Remediación de hidrocarburos del petróleo
Tamarisk	Elimina sodio y arsénico
<i>Typha spp.</i>	Volatilización de selenio
<i>Thlaspi spp.</i>	Acumuladora de zinc, cadmio y plomo
<i>Vicia faba</i>	Remediación de hidrocarburos del petróleo
<i>Yucca spp.</i>	Absorción y degradación TNT y RDX (explosivos)

Los procesos esenciales de la fitoremediación se muestran en la Figura 2. Estos mecanismos incluyen desde la extracción de contaminantes del suelo o del agua, la concentración de los mismos en el tejido vegetal, su transformación por medio de procesos fisiológicos o de facilitamiento por interacciones bióticas; y la volatilización o transpiración del contaminante por parte de la planta (Zhi-xin *et al.*, 2007; Mirza *et al.*, 2011).

La fitoextracción se constituye en la captación de contaminantes por las raíces de las plantas y la translocación de estos dentro de ellas (Mirza *et al.*, 2011). Sin embargo, el crecimiento lento de las plantas hiperacumuladoras lleva a una baja producción de biomasa y un sistema radicular poco profundo (Li *et al.*, 2009). La biomasa de estos contaminantes extraídos puede ser utilizada como fuente para reponer las deficiencias. No obstante, el metal puede llegar a tener efectos fitotóxicos y por tanto se debe restringir su acceso por parte de animales y material vegetal cosechable. Los contaminantes para los cuales aplica esta estrategia son metales como Ag (Plata), Cd (Cadmio), Co, Cr, Cu, Hg (Mercurio), Mn, Mo (Molibdeno), Pb, Ni, Zn; metaloides como As (Arsénico) y Se (Selenio); los radionucleidos ⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, ²³⁹Pu (Plutonio), ²³⁸U (Uranio), ²³⁴U; y no metales como el

Tabla 3. Algunas especies vegetales nativas tropicales utilizadas en fitoremediación.

Especie	Aplicación	Referencia
<i>Colocasia esculenta</i> (Oreja de burro)	Fitoremediación de mercurio	Skinner <i>et al.</i> , (2007).
	Reducción de nitrato, fósforo, sulfato,	Mbuligwe, (2004).
	Reducción de pesticidas y herbicidas	Cheng <i>et al.</i> , (2002).
	Eliminación de nitrato, fosforo y DQO	Bindu <i>et al.</i> , (2008).
	Eliminación de NH ₄ ⁺ y NO ₃ ⁻ .	Morgan <i>et al.</i> , (2008).
	Eliminación de Cd.	Mandakini <i>et al.</i> , (2005).
<i>Petiveri alliacea</i> (Anamú)	Efecto del nitrógeno e irradiación en la eficiencia fotosintética	Pérez <i>et al.</i> , (2007).
<i>Echinochloa colona</i> (Liendre de puerco)	Efecto en la germinación por sometimiento a Cr(VI)	Rout <i>et al.</i> , (2000).
<i>Vetiveria zizanioides</i> (Vetiveria)	Reducción de nitrógeno amoniacal, total, fósforo total, DBO, DQO	Xiao <i>et al.</i> , (2009)
	Efectos en el crecimiento por exposición a Lixiviados.	Rotkittikhun <i>et al.</i> , (2007)
	Efecto por el riego con fertilizantes	Edelstein <i>et al.</i> , (2009).
<i>Heliconia Psittacorum</i> . (Heliconia)	Efecto en el crecimiento al riego con lixiviados de rellenos sanitarios	Torres y Vásquez, (2010)
	Eliminación de DBO ₅ , DQO, Nitrato, TKN, NH ₄ , orto fosfato y SST	Ascuntar y Toro (2007); Gutiérrez (2009); Mosquera (2010); Ascuntar- <i>et al.</i> , (2009) Sandoval (2010);
	Eliminación de DQO, P-PO ₄ , NH ₄ , NO ₃	Konnerup <i>et al.</i> , (2009).
	Eliminación de Materia orgánica y nutrientes	Paulo <i>et al.</i> , (2008)
	Eliminación de metales pesados: Cd (II), Cr (VI), Pb (II) y Hg (II).	Madera <i>et al.</i> , 2013
	Eliminación de Cr (VI) y Nitrógeno.	Cortes <i>et al.</i> , 2013a.
	Eliminación de DQO, DBO ₅ y NH ₄ ⁺	Cortes <i>et al.</i> , 2013b
<i>Gynerium sagittatum</i> (Caña brava)	Biomasa y crecimiento de la especie	Torres y Vásquez, (2010).
	Eliminación de DBO ₅ , DQO, NH ₄ ⁺ y NO ₃	Stewart, (2005)
	Eliminación de Cr (VI) y Nitrógeno	Cortes <i>et al.</i> , 2013a.
	Eliminación de metales pesados: Cd (II), Cr (VI), Pb (II) y Hg (II)	Madera <i>et al.</i> , 2013

B (Boro). Las plantas de familias *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae* o *Scrophulariaceae*, son ejemplos de plantas utilizadas en estos procesos (Prasad, 2004).

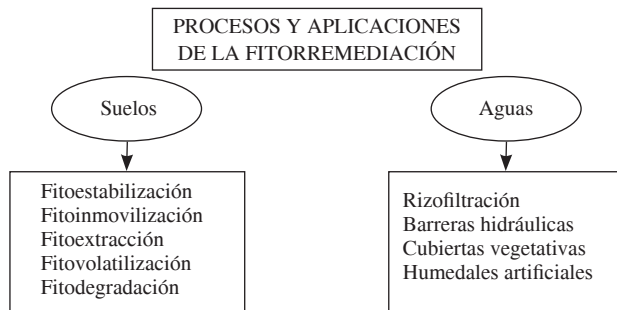


Figura 2. Procesos de fitorremediación, principalmente utilizados en medio terrestre y acuoso.

La rizofiltración consiste en la absorción de los contaminantes dentro de las raíces, por medio de procesos bióticos o abióticos. Los exudados producidos en las raíces pueden causar la precipitación de algunos metales. Los contaminantes son eliminados, luego de ser inmovilizados o acumulados dentro de las plantas. Esta técnica es comúnmente utilizada en suelos donde el contaminante debe estar en solución para ser absorbido por el sistema vegetal. Las plantas requieren un soporte y pueden ser usadas *in situ* o *ex situ*. Aplica para contaminantes como el Pb^{2+} , Cd, Zn, Cu, Ni, Cr y los radionucleidos U, Cs y Sr. Entre las plantas acuáticas utilizadas en rizofiltración, se incluyen *Eichornia crassipes*, *Hydrocotyle umbellata*, *Lemna minor*, *Azolla pinnata* (Prasad, 2004; Giri & Patel, 2011).

La inmovilización de un contaminante del suelo o el agua por medio de absorción, precipitación y acumulación por raíces, es definida como fitoestabilización (Mirza *et al.*, 2011). La planta puede alterar las condiciones del medio, al convertir metales de un estado de oxidación soluble a uno insoluble. Por tanto, esta estrategia es utilizada en tratamientos de suelo, sedimentos y lodos y es menos disruptiva que otras tecnologías, además de tener un menor costo. Sin embargo, tiene como desventaja que los contaminantes permanecen en el suelo y las plantas pueden necesitar mantenimiento a largo plazo. Entre las plantas utilizadas para reducir la filtración de metales en suelos contaminados, son *Brassica juncea*, *Argemone mexicana* y *Festuca rubra*. Los contaminantes para los cuales se ha aplicado la fitoestabilización, son el As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn (Prasad, 2004).

La fitodegradación es la transformación de un contaminante, por medio de compuestos producidos por las plantas. Par-

ticularmente, el rompimiento de un contaminante orgánico, es facilitado por la actividad microbiana en la zona radicular, y es llamado rizodegradación. En esta zona se liberan compuestos como azúcares, ácidos grasos, esteroides, aminoácidos, ácidos orgánicos, factores de crecimiento, nucleótidos, flavonoides, enzimas y otros compuestos, todos exudados por las raíces. Por su presencia, la actividad microbiana puede ser aumentada en esta zona, resultando en la biodegradación de contaminantes orgánicos del suelo. No obstante, los exudados pueden estimular microorganismos no degradadores, que se desarrollan a expensas de aquellos degradadores. Igualmente, las raíces pueden modificar las condiciones del suelo, al aumentar la entrada de aire y regular el contenido de humedad, así crear condiciones más favorables para la biodegradación de microorganismos nativos. Este sistema es de bajo costo y tiene como ventaja que la transformación del contaminante que ocurre *in situ*. Sin embargo, puede tomar un tiempo el desarrollo de una zona radicular extensa. Las plantas más comúnmente utilizadas son *Morus rubra*, *Malus fusca*, *Menta spicata*, *Medicago sativa*, *Agropyrum desertorum*, *Oriza sativa*, *Typha latifolia* y varias especies de algas (Peña-Salamanca *et al.*, 2011). Estas plantas necesitan fertilización adicional debido a la competencia de nutrientes con las poblaciones microbianas. Se aplica en contaminantes como pesticidas (atrazina, diazinon, propanil herbicida), surfactantes, solventes clorados, pentaclorofenol, hidrocarburos aromáticos policíclicos y de petróleo totales (Prasad, 2004).

Finalmente, la captación y transpiración de un contaminante modificado a la atmósfera, se conoce como fitovolatilización (Mirza *et al.*, 2011). La ventaja de este proceso es que los contaminantes pueden ser transformados en formas menos tóxicas e incluso pueden ser sujeto de procesos de degradación más rápidos y efectivos. Sin embargo, de igual forma pueden ser liberados contaminantes o metabolitos dañinos a la atmósfera, o incluso pueden acumularse en la vegetación y pasar a otras partes, como frutos y madera. Las plantas comúnmente usadas en este proceso son *Medicago sativa*, *Brassica juncea*, *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana*. Entre los contaminantes modificados por estas plantas, se encuentran aquellos orgánicos como solventes clorinados y algunos inorgánicos como Se y Hg (Prasad, 2004).

4. Resultados

4.1 Eliminación de Materia Orgánica, Nutrientes y Metales Pesados

Las plantas del género *Heliconia* (Heliconiaceae), pertenecientes al orden Zingiberales (platanillos), son hierbas perennes, nativas de las zonas del Caribe y América central y del sur (Berry & Kress, 1991). Originarias de zonas de altitud

media y baja, de 0 a 1200 metros sobre el nivel del mar; en el caso de Colombia se cuenta con especies hasta los 2400 metros de altitud (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, 2007). Al ser plantas nativas del trópico, proveen hábitat para muchas especies de organismos que dependen de ella como alimento (Arango, 2007). En el Valle del Cauca, crecen el 73 % de las *Heliconias* de Colombia y se puede estimar que tiene 50 o más especies distribuidas a lo largo de su territorio administrativo (Betancur & Kress, 1995).

En la última década, se han desarrollado diferentes trabajos para evaluar la respuesta de plantas del género *Heliconia* a diferentes escalas (Figura 3). El propósito de estos trabajos fue evaluar y proponer una opción tecnológica verde que parte del principio que las plantas son bombas direccionadas solarmente y pueden movilizar contaminantes en varios sentidos, lo cual ha creado y despertado un alto interés en el mundo académico y científico dado sus múltiples y poco conocidos mecanismos de eliminación (Raskin *et al.*, 1997). Además de los beneficios ambientales del tratamiento de aguas residuales, las *Heliconias* pueden también proveer otros servicios ambientales con beneficios económicos asociados (Belmont & Metcalfe, 2003).

En la Tabla 4 se reportan los resultados del potencial fitoremediador de *Heliconia psittacorum* y se compara con humedales sin vegetación y con la especie cosmopolita más ampliamente empleada y sembrada en procesos de eliminación de contaminantes en aguas residuales (humedales construidos) como el caso *Phragmites australis* (Zhi & Ji, 2012). En términos generales, se encontró que estas dos especies contribuyen a la eliminación de contaminantes en igual proporción. Además, el desempeño de los sistemas sembrados con estas especies en la mayoría de los casos fue consistente con lo reportado en la literatura en cuanto a eliminación de

materia orgánica, y se encuentra entre el rango estipulado por diversos autores (60 - 80%) (Reed *et al.*, 1995; Kadlec & Knight, 1996; Karathanasis *et al.*, 2003; Ascúntar & Toro, 2007). Estos hallazgos muestran la potencialidad de emplear la *Heliconia sp* en el proceso de fitoremediación de aguas residuales.

Debido a que la mayoría de macrófitas emergentes pueden trasladar oxígeno de las hojas a las raíces, se presentan micro-zonas aeróbicas en la superficie de las raíces y los rizomas, lo cual crea las condiciones en la zona de raíz de la planta que ayudan al desarrollo de microorganismos que participan en la descomposición de materia orgánica y la nitrificación, respectivamente (Brix, 1993). Este fenómeno fue reportado en casi todos los documentos revisados, donde destacan que *H. psittacorum* puede disponer una buena capacidad para proveer oxígeno al sistema radicular, beneficiando el proceso de nitrificación (no se reportan valores de transferencia de oxígeno).

Gutiérrez (2009a) registró un mejor desempeño de estas plantas en la eliminación de DOQ y DBO₅ para la condición de más alta carga contaminante aplicada al reactor sembrado con la especie *Heliconia sp*, situación igualmente reportada por Madera *et al.* (2013). Montoya *et al.*, (2010), encontraron que en la eliminación de DQO, COD y DBO₅, no habían diferencias entre las especies *Heliconia sp* y *Phragmites au*, indicando que el uso de la especie nativa además de mantener las mismas condiciones operacionales de la tecnología, permite crear ambientes agradables como ornamentación por las floración que dicha especie produce.

La mayor asimilación de nitrógeno ocurrió en hojas (65.7%) y raíces (35,9%) y los porcentajes más altos de desasimilación fueron en el tallo (-1,6%). Evaluando el principal me-



Figura 3. Imágenes experimento a escala laboratorio (a) y escala piloto (b) usando *Heliconia psittacorum*.

Fuente: Madera *et al.*, 2013 y Ascúntar *et al.*, 2009.

Tabla 4. Eficiencias (%) de eliminación promedio para *H. psittacorum* y *P. australis*.

Parámetro	<i>H. psittacorum</i>	<i>P. australis</i>	Sin Plantas (SP)	
DBO ₅	A&T*	63	63	
	G&S**	60	80	
	Ga***	68	79	
	S****	65	77	
	Gb*****	57	-	
	Mo+++	97	97	
DQO	A&T*	59 (Totales) y 42 (Filtrada)	58 (Totales) y 41 (Filtrada)	
	G&S**	63	77	
	Ga***	63	70	
	S****	65 (Totales) y 52 (Filtrada)	74 (Totales) y 53 (Filtrada)	
	Gb*****	53	-	
	Mo+++	95	-	
SST	A&T*	90	88	91
	G&S**	78	85	79
	Ga***	-	-	-
	S****	84	87	85
	Gb*****	-	-	-
Nitrógeno Amoniacal (NH ₃ /NH ₄ ⁺)	A&T*	Disminución longitudinal	Variación longitudinal	Disminución longitudinal
	G&S**	9	39	9
	Ga***	18(NH ₄ ⁺)	36(NH ₄ ⁺)	10 (NH ₄ ⁺)
	S****	20(NH ₄ ⁺)	38 (NH ₄ ⁺)	9 (NH ₄ ⁺)
	Gb*****	33(NH ₃)	-	27 (NH ₃)
Nitritos y Nitratos (NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻)	A&T*	Concentraciones heterogéneas en cada etapa		
	G&S**	43(NO ₂ ⁻)	65 (NO ₂ ⁻)	48 (NO ₂ ⁻)
	Ga***	-	-	-
	S****	-32y -49	65 y -112	-22 y -77
	Gb*****	-3,4 (NO ₃ ⁻)	-	16 (NO ₃ ⁻)
	Ma+	48 y 35 (NH ₄ ⁺ y NO ₃ ⁻)	-	45 (NH ₄ ⁺)
Fosfatos (PO ₄)	A&T*	Comportamiento oscilatorio en sentido longitudinal (La mayor parte de porcentajes de eliminación fueron negativos)		
	G&S**	Oscilación permanente		
	Ga***	-111	-257	-244
	S****	10	30	10
	Gb*****	10	-	23
Metales	Ma+	95 Cd, Pb, Hg, Cr (VI)	-	90
	Co++	60 Cr (VI)	-	-

*A&T-> Ascúntar & Toro (2007) **G&S-> Gómez & Segura (2008) ***Ga-> Gutiérrez (2009a);****S-> Sandoval (2009); *****Gb-> Gutiérrez (2009b),+ Ma>Madera et al., 2013; ++ Co>Cortes et al., 2013; Mo+++>Montoya et al, 2010.

canismo de eliminación de nitrógeno(N) en este caso, fue la denitrificación, la cual eliminó el 19.7% de la carga de N afluyente en humedales plantados y 16.2% en los controles. Seguido por la acumulación de N en el lecho de soporte, siendo responsable de la eliminación del 6.2 y 5.0% del N afluyente, respectivamente. El aporte de *H. psittacorum* en la eliminación de la carga afluyente de N por asimilación directa solo fue del 0.2%, pero su presencia promovió la eliminación de N, por tanto se puede sugerir su uso en este tipo de sistemas de tratamiento (Gutiérrez, 2009b).

Las eliminaciones de nitrógeno amoniacal y de nitritos fueron mayores en *P. australis.*, lo cual puede estar asociado a que las raíces de esta planta al ser más extensas y abundantes ofrecen una mayor área para transferencia de oxígeno y formación de comunidades de microorganismos (Gómez & Segura, 2008; Li *et al.*, 2009). Por otro lado, la inestabilidad presentada en algunos casos, pudo ocurrir por la cantidad de interacciones que se generan en la rizósfera, que dan lugar a fenómenos y eventos como nitrificación-desnitrificación (Yang *et al.*, 2001, Meuleman *et al.*, 2003; Peña-Salamanca *et al.*, 2011), fijación simbiótica de Nitrógeno, asimilación biológica, muerte vegetal, adsorción del medio (Ascúntar & Toro, 2007). Igualmente, en estos casos pueden darse procesos de transformación como: volatilización del ion amonio (NH_3), mineralización (amonificación), reducción de nitratos a amonio (nitrato-amonificación), oxidación anaerobia del amonio (Anammox), adsorción, desorción y lixiviación (Vymazal, 2007). De otro lado, en algunos casos, la variación en la saturación de los sistemas pudo ocasionar la oscilación en la eliminación de fosfatos, al afectar los procesos de adsorción y desorción de este contaminante en el medio (Gómez & Segura, 2008).

Los resultados reportados del nitrógeno foliar en ambas especies (*Heliconia* y *Phragmites*) muestran que hay mayor acumulación en hojas cuando las especies trataron menores cargas orgánicas. Así mismo, se encontró la existencia de una diferencia en eficiencia fotosintética en estas especies, la cual puede estar asociada a otros factores como el tipo de metabolismo de las especies, pues las plantas C4, como *P. australis*, usan más eficientemente el nitrógeno, el CO_2 , la radiación solar y el agua, que las plantas tipo C3, como *H. psittacorum*.

Adicionalmente, el uso de plantas contribuye a la minimización de zonas muertas en los HCS y sirve de soporte para evitar compactación del medio, mejorándose así el comportamiento hidrodinámico de estos sistemas (Gómez & Segura, 2008). Por el contrario, cuando no se tienen las plantas el grado de mezcla se ve favorecido por el crecimiento de biopelículas, puede aparecer la compactación del lecho,

entre otros factores que ocasionan progresivamente un taponamiento del sistema y una disminución en su eficiencia hidráulica (Gómez & Segura, 2008).

En el caso de los metales pesados, Cortes *et al.*, (2013) y Madera *et al.*, (2013) reportaron que la *Heliconia* ha mostrado resultados muy alentadores, donde ubican esta especie como una planta acumuladora de metales, con gran desempeño en la eliminación de metales pesados (Cd, Pb, Hg y Cr (VI)), de la matriz líquida contaminada con múltiples metales, donde se lograron reportar porcentajes de eliminación superior al 90% de los citados metales, indicando que no se presentaron procesos de antagonismo o inhibición en la especie por la toma de un metal y la planta no mostró signo alguno de daño como hojas amarillas o clorosis. Los estudios con esta especie estuvieron alrededor de un 5 al 10% con más capacidad de eliminación de los citados metales que un sistema sin plantas. Así mismo, esta especie en el caso de metales como Hg (II) y Cr (VI), logro traslocar una cantidad importante de estos metales desde la raíz a los tejidos aéreos (tallo, hoja), característica importante en el proceso de fitoremediación, por lo cual se puede calificar esta especie como acumuladora de metales pesados y de alto potencial para emplear en sistemas de humedales construidos.

4.2 Respuestas fisiológicas y de crecimiento

En cuanto a las respuestas fisiológicas de *H. psittacorum*, resultados previos han demostrado mayores tasas de crecimiento y de actividad fotosintética de esta especie en el primer tercio del largo del humedal en el sentido del flujo, en comparación con el resto de este, debido posiblemente a que la mayor parte de la materia orgánica y los nutrientes eran consumidos en esta longitud (Lara, 1999). Por otra parte, *Phragmites sp.* acorde con los reportes mostrados en la Tabla 5, presentó un crecimiento uniforme en la totalidad del área del humedal.

La emisión de fluorescencia de la clorofila en plantas es una prueba sensitiva de la eficiencia fotosintética de la planta y permite reflejar a largo plazo perturbaciones en el aparato fotosintético (Pérez *et al.*, 2007; Hsu, 2007). Las plantas perturbadas usan menos energía radiante para la fotosíntesis, disipando el exceso de luz para evitar fotoinhibición o foto oxidación, mediante reacciones de des-excitación como pérdida de calor y fluorescencia de la clorofila, los cuales han sido exitosamente usados como métodos no invasivos (Baker & Rosenqvist, 2004). Por tanto, las tasas fotosintéticas de la vegetación en un humedal pueden ser consideradas un indicador fisiológico del metabolismo de la planta y de su participación en la transformación de los diferentes nutrientes en el sistema; igualmente, permite evaluar la producción

de biomasa vegetal que participa en la eliminación de nutrientes del humedal. La *Heliconia psittacorum*, los reportes indican que esta especie no altero su tasa fotosintética, indicando una alta capacidad de aclimatación a las condiciones extremas en la que fue sometida en los diferentes estudios.

Otra variable fisiológica utilizada para evaluar el efecto de la carga contaminante en el desempeño de la planta es el potencial hídrico, el cual aporta información sobre umbral de tolerancia del estado hídrico al interior de las plantas (Shanker *et al.*, 2005, Lorenzen *et al.*, 2001; Steinbachová-Vojtísková *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008, Martínez, 2008). Gutierrez, (2009b), reportó que *H. psittacorum* presentó el mayor potencial (valores más bajos), cuando estuvo sometida a caudales pequeños y menor carga de nutrientes, con valores mejores a los encontrados para la especie *P. australis*.

Martínez (2008), evaluó diferentes parámetros para establecer la respuesta fisiológica de *Heliconia psittacorum* y registró condiciones óptimas en ambientes con flujo de aguas residuales. La carga orgánica y el flujo de agua residual influyó el comportamiento de la planta (Tabla 5). Estos resultados sugieren realizar otras investigaciones para definir la eficiencia de la especie en la eliminación de nitrógeno.

Así mismo, se realizaron estudios evaluando la respuesta de crecimiento de diversas especies vegetales a diferentes cargas de lixiviados para su uso potencial en la eliminación de cargas del contaminantes de este residuo líquido, *Heliconia* sp., *Beloperone guttata*, *Cyperus* sp., *Petiveria alliacea*, *Gynerium sagittatum*, *Vetiveria zizanioides*, *Colocasia esculenta*, *Tradescantia* sp., *Ammana coccinea*, *Echinochloa colona* y *Cynodon dactylon*, fueron estudiadas. Los resultados mostraron que la velocidad de crecimiento en los trata-

mientos con lixiviados no fue significativamente diferente con respecto al control (sin lixivado) para la mayoría de las especies (Tabla 6). Todas las especies vegetales presentaron crecimiento positivo a las cargas a las que fueron sometidas. Las especies con mayor adaptabilidad fueron *Colocasia esculenta*, *Echinochloa colona* y *Tradescantia* sp.; con adaptabilidad alta fueron *Petiveria alliacea*, *Cynodon dactylon* y *Beloperone guttata*; con adaptabilidad media *Ammana coccinea*, *Heliconia* sp. y *Gynerium sagittatum*; y con adaptabilidad baja el *Cyperus* sp (Torres y Vásquez, 2010).

Tabla 6. Comparación de la velocidad de crecimiento en once especies de plantas nativas en tallos y hojas.

Especies vegetales	Crecimiento en Tallo	Crecimiento en Hojas
<i>Heliconia</i> sp.	VR>VC	VR>VC
<i>Petiveria alliacea</i> (Anamú)	VR>VC	VR>VC
<i>Tradescantia</i> sp.	-	VR>VC
<i>Colocasia esculenta</i> (Oreja de burro)	VR>VC	VR>VC
<i>Vetiveria zizanioides</i> (Vetiveria)	-	VR>VC
<i>Gynerium sagittatum</i> (Caña brava)	VR<VC	VR>VC
<i>Cynodon dactylon</i> (Pelo de indio)	-	VR>VC
<i>Ammana coccinea</i> (Palo de agua)	VR>VC	VR>VC
<i>Echinochloa colona</i> (Liendre de puerco)	VR>VC	VR>VC
<i>Beloperone guttata</i> (Camarón Amarillo)	VR>VC	VR>VC
<i>Cyperus</i> sp. (Papiro Enano)	VR<VC	-

*VR: Velocidad en Réplicas *VC: Velocidad en Control

Finalmente, Arias y Brix (2003) destacan el desarrollo y la investigación de la tecnología de humedales construidos en Colombia, al reconocer varias experiencias colombianas do-

Tabla 5. Respuestas fisiológicas de *Heliconia psittacorum*.

	Diferencia con plantas control	Rango	Observaciones
Nitrógeno Foliar	Si	2,6 a 5,6mg/g	Incremento de la asimilación en la entrada del humedal proporcional al incremento de la biomasa.
Potencial Hídrico	Si	-1,31 a -0,04Mpa Entrada: -1,7 a 0,49 Salida: -2,11 a 0,18	Valores de potencial cercanos a cero a la entrada del humedal y más negativos a la salida, en relación con los requerimientos hídricos en la planta.
Eficiencia Fotosintética	No	0,78 a 0,85 Valor normal 0,8 a 0,87	Respuesta fotosintética positiva a lo largo del humedal.
Biomasa	Si	Concentración de Nitrógeno Entrada>Medio>Salida	Alcanzó su crecimiento máximo a la entrada del humedal.
Parámetros Físicoquímicos	-	Nitrato>Nitrito>Amonio	Los datos permiten establecer el comportamiento del humedal para la eliminación de nitrógeno.

cumentados desde el año 1998 con la opción de estar disponibles en todo el mundo. Un aspecto adicional a resaltar es el potencial uso de esta tecnología sembradas con especies nativas de Colombia para el mejoramiento de la calidad de agua del río Bogotá, tal como lo apuntan Rodríguez y Opsina (2005).

Conclusiones

Los estudios realizados con *Heliconia psittacorum* para evaluar su potencial fitorremediador demuestran que esta planta presenta características de aclimatación adecuadas a las condiciones en los humedales construidos para el tratamiento de aguas residuales en el país. Entre las características más relevantes, es la capacidad de eliminación de DBO₅, DQO y SST, mayor a 60% en la mayoría de los estudios, su capacidad para acumular metales pesados sin detrimento de sus propiedades fisiológicas y su rápido crecimiento y desarrollo. Por otro lado, esta planta genera una ganancia estética por la belleza de su inflorescencia, lo cual a su vez, puede generar beneficios económicos al comercializarse.

Teniendo en cuenta la necesidad que existe en realizar programas y proyectos efectivos para el control de la contaminación en Colombia generada por la descarga aguas residuales crudas en cuerpos hídricos, el uso de la eco-tecnología humedal construido sembrado con *Heliconia psittacorum*, muestra que es una alternativa costo-efectiva ideal para este propósito.

Es necesario ampliar la evaluación del desempeño de especies nativas en diversas matrices como agua, aire y suelo y su respuesta frente a la capacidad de tolerancia de las mismas para el manejo del estrés del contaminante. Esta información beneficiará el desarrollo de nuevas tecnologías para resolver los problemas del tratamiento de aguas residuales mediante la fitoremediación.

Agradecimientos

Los autores desean expresar sus agradecimientos a María Isabel Arce por su valioso apoyo en la edición final del manuscrito. A UNIVALLE, ACUAVALLE S.A. E.S.P., BURGASEO S.A E.S.P, por su colaboración en el trabajo de campo de muchas de las tesis de pregrado y postgrado de la Universidad del Valle, realizadas en la estación experimental de Ginebra.

Bibliografía

Arias, C. A. and Brix, H. (2003). Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales. Revista Ciencia e Ingeniería Neogranadina, No 13, pp. 17–24. Red de Revistas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.

- Arango, A.M. 2007. Biosistema integral de tratamiento de aguas residuales domésticas. Diseño, construcción y evaluación. Tesis de maestría, Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Manizales. Manizales – Colombia.
- Ascúntar R., D., Toro V., A. F. 2007. Estudio del comportamiento hidrodinámico de humedales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Trabajo de Grado, Ingeniería Sanitaria. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Baker, N. R., Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of experimental botany, 55:1607-1621.
- Barceló, J., Poschenrieder, C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. Contributions to science, 2(3):333-334.
- Belmont, M. A., Metcalfe, C. D. 2003. Feasibility of using ornamental plants (*Zantedeschia aethiopica*) in subsurface flow treatment wetlands to remove nitrogen, chemical oxygen demand and nonylphenol ethoxylate surfactants – a laboratory-scale study. Ecological engineering, 21:233-247.
- Berry, F. H., Kress, W. Jhon. 1991. Heliconia. An identification Guide. Estados Unidos, Smithsonian Institution Press. 334p.
- Betancur, J., Kress, W. J. 1995. Biodiversity and conservation of neotropical montane forests. Proc. Symposium, New York Botanical Garden. p. 513-523.
- Bragato, C., Brix, H., Malagoli, M. 2006. Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel and *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. Environmental Pollution, 144:967-975.
- Bragato, C., Schiavon, M., Polese, R., Ertani, A., Pittarello, M., Malagoli, M. 2009. Seasonal variations of Cu, Zn, Ni and Cr concentration in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex steudel in a constructed wetland of North Italy. Desalination, 246:35-44.
- Brisson J, F. Chazarenc, 2009. Maximizing pollutant removal in constructed wetlands: Should we pay more attention to macrophyte specie selection? Journal Science of Total Environment, 407, 3923-3930.
- Brix, H. 1993. Wastewater treatment in constructed wetland: system design, removal processes, and treatment performance. En: Moschiri, G.A. (Ed.), Constructed wetlands for water quality improvement. Lewis publishers, Boca raton, Fl. Pp. 9-2.
- Brooks, R. R. 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals. CAB International. Reino Unido. 380 pp.
- Chazarenc F., Merlin G. 2004. Influence of raw wastewater with sequential load on vertical subsurface flow constructed wetlands behaviour. En: 9th IWA International Specialised Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. Avignon, France.
- Cheng, S., Grosse, W., Karrenbrock, F., Thoennssen, M. 2002. Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals. Ecological engineering, 18(3):317-325.
- Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC). 2007. Heliconias: compendio de experiencias investigativas sobre flores y follajes tropicales del Valle del Cauca – Colombia. 148p.
- Cooper, P. 2004. The performance of vertical flow constructed wetland systems with special reference to the significance of oxygen transfer and hydraulic loading rates. En: 9th IWA International Specialised Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. Avignon, France.
- Cortes-Sandoval A, Madera-Parra C.A, Peña-Varón M.R, Peña S E.J, Lens J.P.N. 2013. Eliminación de DQO, Nitrógeno (TKN, NH₄⁺, NO₃) y Cr (VI) en humedales construidos con policultivos tratando lixiviados de rellenos sanitarios a escala piloto .Seminario Internacional GRAL, 2013, Sao Pablo, Brasil.

- Edelstein, M., Plaut, Z., Dudai, M., Ben-Hur, M.** 2009. Vetiver (*Vetiveria zizanioides*) responses to fertilization and salinity under irrigation conditions. *Journal of environmental management*, 91:215-221.
- Giri, A. K., Patel, R. K.** 2011. Toxicity and bioaccumulation potential of Cr (VI) and Hg (II) on differential concentration by *Eichornia crassipes* in hydroponic culture. *Water science & technology*, 63(5):899-907.
- Gómez C, D. X., Segura S., J.** 2008. Estudio de humedales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas residuales domésticas: aplicación de modelos hidrodinámicos y macrocinéticos. Trabajo de Grado, Ingeniería Química. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Gutiérrez M., H.** 2009 a. Estimación del balance de nitrógeno en un humedal construido subsuperficial (microcosmos) plantado con *Heliconia psittacorum* para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Tesis de maestría, Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Gutiérrez L., C. F.** 2009 b. Respuesta fisiológica de macrófitas emergentes y su relación con la eficiencia en el tratamiento de agua residual doméstica en humedales construidos. Tesis de maestría, Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Greenway, M. Woolley, A.** 2001. Changes in plant biomass and nutrient removal over 3 years in a constructed free water surface flow wetland in Cairns Australia. *Water Science and Technology*, 44(11-12):303-310.
- Haberl, R., Grego, S., Langergraber, G., Kadlec, R., Cicalini, A., Dias S., Novais, J., Aubert, S., Gerth, A., Thomas, H., Hebner A.** 1998. Constructed wetlands for the treatment of organic compounds. *Journal of Soils & Sediments.*, 3(2):109-124.
- Hsu, B. D.** 2007. On the possibility of using a chlorophyll fluorescence parameter as an indirect indicator for the growth of *Phalaenopsis* seedlings. *Plant Science*, 172(3):604-608.
- Kadlec, R. H., Knight, R. L.** 1996. *Treatment wetlands*. CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, Fl. 893 pp.
- Kadlec, R. H., Knight, R. L., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., Haberl, R.** 2000. *Constructed wetlands for pollution control – processes, performance, design and operation*; IWA Scientific and Technical Report No.8, IWA, London.
- Kantawanichkul, S., Kladprasert, S., Brix, H.** 2009. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. *Ecological engineering*, 35:238-247.
- Karathanasis, A., Potter, C. L., Coyne, M. S.** 2003. Vegetation effects on fecal bacteria, BOD, and suspended solid removal in constructed wetlands treating domestic wastewater. Agronomy department. University of Kentucky, USA. En: *Ecological engineering*, 20:157-169.
- Kivaisi, A.K.** 2001. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering* 16:545–560
- Konnerup, D., Koottatep, T., Brix, H.** 2009. Treatment of domestic wastewater in tropical, subsurface flow constructed wetlands planted with *Canna* and *Heliconia*. *Ecological engineering*, 35:248-257.
- Kura, B., La Motta, E., Tittlebaum, M., Alawady M.** 1997. Macroscopic BOD Kinetic Model for Microbial Rock Plant Filter Design. *Advances in Environmental Research*, 1:36- 43.
- Lara, C. M.** 1999. Depuración de aguas residuales municipales con humedales artificiales. Instituto catalán de tecnología, Tesis de Maestría, Ingeniería y Gestión Ambiental, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España.
- Li, T., Yang, X., Lingli, L., Ejazul, I., He, Z.** 2009. Effects of zinc and cadmium interactions on root morphology and metal translocation in a hyperaccumulating species under hydroponic conditions. *Journal of hazardous materials*, 169:734-741.
- Lorenzen, B., Brix, H., Mendelssohn, I. A., McKee, K. L., Miao, S. L.** 2001. Growth, biomass allocation and nutrient use efficiency in *Cladium jamaicense* and *Typha domingensis* as affected by phosphorus and oxygen availability. *Aquatic botany*, 70:117-133.
- Madera-Parra C.A, Peña-Varón M.R, Peña S E.J, Lens J.P.N.** 2013. Phytoremediation of landfill leachate with *Colocasia esculenta*, *Gynerum sagittatum* and *Heliconia psittacorum* in constructed wetlands. *International journal of Phytoremediation*. DOI: 10.1080/15226514.2013.828014
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.** 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Pearson education, S.A. Madrid-España.
- Martínez, J. R.** 2008. Evaluación de la capacidad de remoción de nitrógeno y sus relaciones fisiológicas en *Heliconia psittacorum* (Heliconiaceae) expuesta a una carga orgánica de agua residual en un humedal artificial sub-superficial para el tratamiento de aguas residuales en el Municipio de Ginebra-Valle. Trabajo de grado, Biología. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Maza, V.** 2006. Cultivo, cosecha y poscosecha de Heliconias y flores tropicales. Jardín Botánico “Joaquín Antonio Uribe” 1ªedi. Medellín, Colombia. 220pp.
- Mbuligwe, S. E.** 2004. Comparative effectiveness of engineered wetland systems in the treatment of anaerobically pre-treated domestic wastewater. *Ecological engineering*, 23:269-284.
- Meuleman, A. F. M., Logtestijn, R., Rijs, G. B. J., Verhoeven, J. T. A.** 2003. Water and mass budgets of a vertical-flow constructed wetland used for wastewater treatment. *Ecological engineering*, 20:31-44.
- Mirza, N., Pervez, A., Mahmood, Q., Shah, M. M., Shafqat, M. N.** 2011. Ecological restoration of arsenic contaminated soil by *Arundo donax* L. *Ecological engineering*, 37:1949-1956.
- Montoya, J. I., Ceballos, L., Casas, J. C. and Morató, J.** (2010). Estudio comparativo de la remoción de materia orgánica en humedales construidos de flujo horizontal subsuperficial usando tres especies de macrófitas. In: *Revista EIA*, No 14, pp. 75-84. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia).
- Ospina-Álvarez, N., Peña-Salamanca, E. J., Benítez, R.** 2006. Efecto de la salinidad en la capacidad de bioacumulación de plomo en el alga verde *Rhizoclonium riparium* (Roth) Harvey (Chlorophyceae, Cladophorales). *Actual biol*, 28(84):17-25.
- Panich-Pat, T., Upatham, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Lanza, G. R.** 2010. Phytoextraction of metal contaminants by *Typha angustifolia*: interaction of lead and cadmium in soil-water microcosms. *Journal of environmental protection*, 1:431-437.
- Peña-Salamanca, E.J., Ospina-Alvarez, N., and Benítez, R.** 2004. Estudio de la contaminación por plomo, cobre y mercurio en la bahía de Buenaventura (Pacífico Colombiano) para la identificación de algas bénticas como organismos indicadores. *Pub. CYTED*, 10, 167–176.
- Peña-Salamanca, E. J.** 2005. Las plantas que limpian. Uso de la biodiversidad de la flora local para aplicaciones en biorremediación. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 17:43-44.
- Peña-Salamanca, E., M. L. Palacios, N. Ospina-Álvarez.** 2005. Algas como indicadores de contaminación. Universidad del Valle, Cali. pp. 75–146.
- Peña-Salamanca, E. J., Sandoval, H., Zuñiga, O., Torres, M.** 2009. Estimates of carbon reservoirs in high-altitude wetlands in the Colombian Andes. *Journal of agriculture and rural development in the tropics and subtropics*, 110(2):103-114.
- Peña-Salamanca, E. J., Rengifo-Gallego, A. L., Benitez-Campo, N.** 2011. Detoxification mechanisms of heavy metals by algal-bacteria

- consortia. Cap. 28, p. 441-452. En: Se-Kwon Kim (Ed.), Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology. Wiley-Blackwell. 592p.
- Pérez A., J. M., Peña S., E. J., Torres G., C.** 2007. Efecto del nitrógeno y la irradiación en la eficiencia fotosintética del anamú *Petiveria allicea* (Phytolaccaceae). Revista de la academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, 31(118):49-55.
- Pilon – Smits, E.** 2005. Phytoremediation. Annual review of plant biology, 56:15-39.
- Prasad, M. N. V.** 2004. Fitorremediación. Aplicaciones, ventajas e inconvenientes. En: Reigosa, M. J., Pedrol, N. & Sánchez, A (Ed.), La Ecofisiología Vegetal. Thomson Editores. España. 1197p.
- Quipuzco, E.** 2002. Evaluación del comportamiento de dos pantanos artificiales instalados en serie con *Phragmites australis* para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Revista del instituto de investigación de la facultad de ingeniería geológica, minera, metalúrgica y geográfica de la UNMSM, 5:52-57.
- Raskin, P., Gleick, P. H., Kirshen, P., Pontius, R. G. Jr, Strzepek, K.** 1997. Comprehensive assessment of the freshwater resources of the world. Stockholm Environmental Institute, Sweden. Document prepared for UN Commission for Sustainable Development 5th Session 1997 – Water stress categories. p. 27-29.
- Reed, S. C., Crites, R. W., Middlebrooks, E. J.** 1995. Natural systems for waste management and treatment. 2da Edición. McGraw Hill, New York, USA.
- Rodríguez, T. and Ospina, I. M.** (2005). Constructed wetland of vertical flow to improve Bogotá river water quality. In: *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, No 15, pp. 74-84. Facultad de Ingeniería. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá D.C Colombia.
- Rotkittikhun, P., Chaiyarat, R., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Baker, A. J. M.** 2007. Growth and lead accumulation by the grasses *Vetiveria zizanioides* and *Thysanolaena maxima* in lead-contaminated soil amended with pig manure and fertilizer: a glasshouse study. Chemosphere, 66:45-53.
- Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P.** 2002. Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and nontolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Link, Chemosphere, 40:855-859.
- Sánchez, J. M.** 2011. Diseño y puesta en marcha de una organización intensiva en conocimiento para el impacto del desarrollo humano, social y ambiental del nor-oriente del valle: caso parque nacional de las Heliconias. Tesis de Maestría, Salud Pública. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Sandoval, J. J.** 2009. Evaluación del desempeño de humedales subsuperficiales para el tratamiento de aguas residuales domésticas: aplicación de algunos modelos existentes. Tesis de Maestría, Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-TAvera, H., Avudainayagam, S.** 2005. Chromium toxicity in plants. Environment international, 31:739-753.
- Skinner, K., Wright, N., Porter-Goff, E.** 2007. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. Environmental pollution, 145(1):234-237.
- Steinbachová-Vojtísková, L., Tylová, E., Soukup, A., Novická, H., Vostrubová, O., Lipavská, H., Cízková, H.** 2006. Influence of nutrient supply on growth, carbohydrate, and nitrogen metabolic relations in *Typha angustifolia*. Environmental and experimental botany, 57:246-257.
- Stottmeister, U., Wiebner, A., Kuschik, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., Müller, R., Moormann, H.** 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. Biotechnology advances, 22:93-117.
- Tanner, C. C.** 2001. Plants as ecosystems engineers in sub-surface flow treatment wetlands. Water Science and Technology, 44(11-12):9-17.
- Tanner, C. C., Clayton, J. S., Upsdell, M. P.** 1995. Effect of loading rate and planting on treatment of dairy farm wastewaters in constructed wetlands II. Removal of nitrogen and phosphorus. Water research, 29:27-34.
- Torres Z., S. I., Vásquez V., R. A.** 2010. Estudio de la potencialidad de crecimiento de once especies vegetales nativas tropicales regadas con lixiviados de rellenos sanitarios. Trabajo de grado, Ingeniería Sanitaria. Universidad del Valle. Cali – Colombia.
- Vymazal, J.** 2008. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. Science of the total environment. 380:48-65.
- Wei, S., Zhou, Q., Srivastava, M., Xiao, H., Yang, C., Zhang, Q.** 2009. *Kalimeris integrifolia* Turcz, ex DC.: An accumulator of Cd. Journal of hazardous materials, 162:1571:1573.
- Wei Zhi, Guodong Ji,** 2012. Constructed wetlands, 1991–2011: A review of research development, current trends, and future directions. Journal Science of Total Environment, 441, 19-27.
- Xiao, W., Bao-ping, H., Ying-zheng, S., Zong-qiang, P.** 2009. Advanced wastewater treatment by integrated vertical flow constructed wetland with *Vetiveria zizanioides* in north China. DOI: 10.1016/j.proeps.2009.09.194. Procedia Earth and Planetary Science, 1:1258-1262.
- Yang, L., Chang, H. T., Lo Huang, M. T.** 2001. Nutrient removal in gravel – and soil – based wetland microcosms with and without vegetation. Ecological engineering, 18:91-105.
- Zhang, Z., Rengel, Z., Meney, K.** 2008. Interactive effects of N and P on growth but not on resource allocation of *Canna indica* in wetland microcosms. Aquatic Botany, 89(3):317-323.
- Zhi-xin, N, Li-na, S., Tie-heng, S., Yu-shuang, L., Hong, W.** 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. Journal of environmental sciences, 19:961-967.

Recibido: 21 de marzo de 2013

Aceptado: 14 de noviembre de 2013

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ASCOSPORAS DE MICROLÍQUENES CORTICÍCOLAS DEL CARIBE COLOMBIANO

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CORTICOLOUS LICHEN ASCOSPORES IN THE COLOMBIAN CARIBBEAN

Angélica Rincón-Espitia*

RESUMEN

Rincón-Espitia A.: Caracterización morfológica de las ascosporas de microlíquenes corticícolas del caribe colombiano. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 483-498, 2013. ISSN 0370-3908.

Se describen las ascosporas 92 especies de líquenes corticícolas, agrupadas en 38 géneros y 18 familias, distribuidas en la región Caribe de Colombia. Las ascosporas estudiadas presentaron una afinidad por la morfología elipsoide y fusiforme, con septos transversales junto con paredes gruesas; el tamaño común fue entre siete a 25 μm y la coloración estuvo ausente en la mayoría de las mismas.

Palabras clave: ascosporas, Líquenes corticícolas, Caribe colombiano.

ABSTRACT

92 ascospores are described corticolous lichen species, grouped in 38 genera and 18 familism, distributed in the Caribbean region of Colombia. Ascospores studied had an affinity for the ellipsoid and spindle-shaped morphology with transverse septa with thick walls, the common size was between seven to 25 μm and staining was absent in most of them.

Key words: ascospores, corticolous lichen, colombian Caribbean.

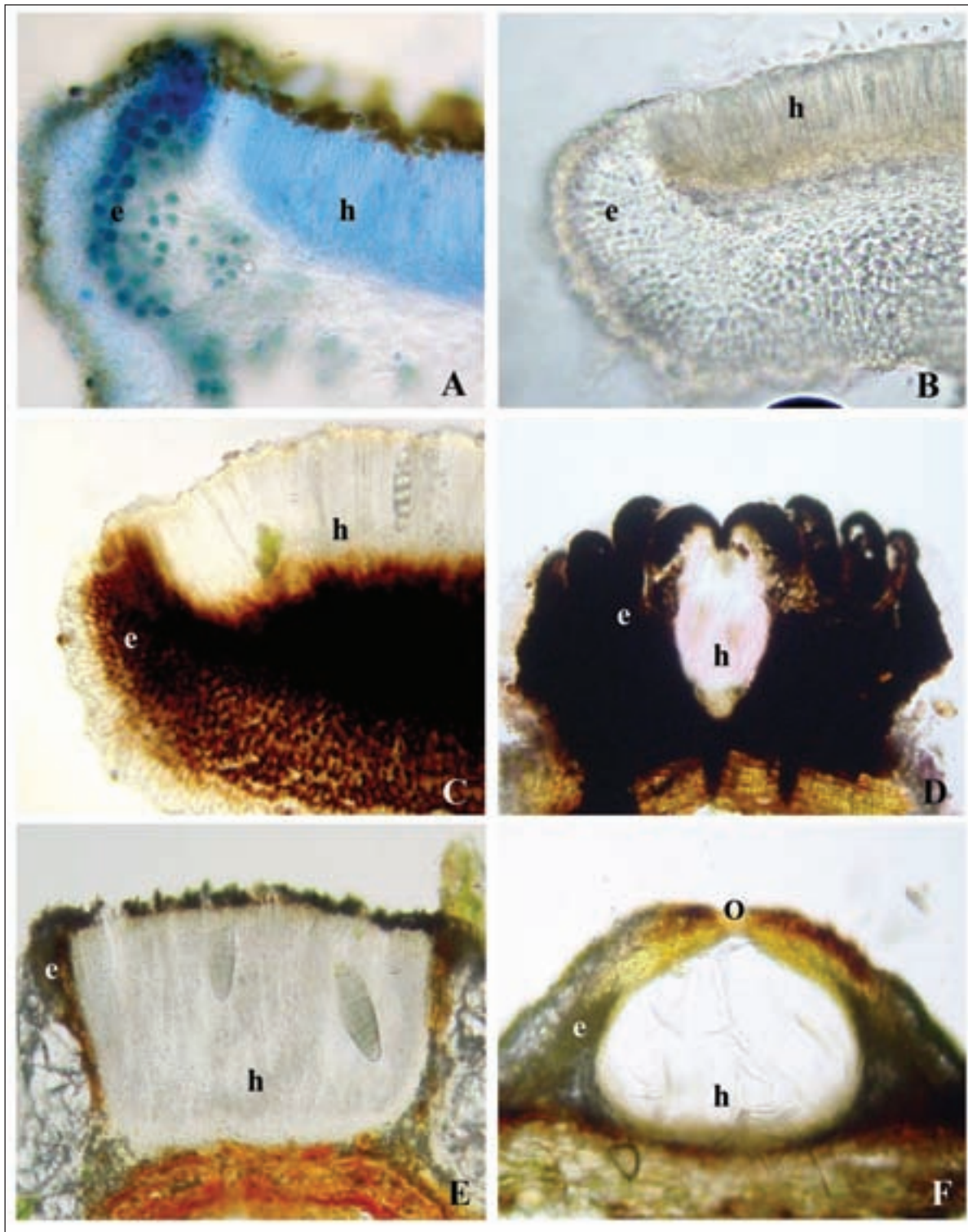
Introducción

En el estudio de los microlíquenes es esencial el análisis microscópico del ascoma junto con muchas de sus estructuras, la asca, las ascosporas y el himenio, al igual que las posibles coloraciones y/o tinciones en algunas de estas partes (Barreno-Pérez-Ortega 2003; Sipman 2005; Cáceres

2007). Entre los ascomas más comunes en los microlíquenes se encuentran los apotecios, las lirelas (apotecios alargados) y los peritecios, los cuales varían de acuerdo a su morfología y anatomía (Figura 1).

La estructura de las ascas, órganos que originan las ascosporas, presentan una marcada importancia en la identificación.

* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Magister en Ciencias-Biología. E-mail: ajrincone@unal.edu.co; angelica.rincon@yahoo.es



Figuras 1. Corte transversal de ascomas. **A.** Apotecio lecanorino en *Leptogium* sp. **B.** Apotecio biatorino en *Coenogonium linkii*. **C.** Apotecio lecideino en *Malmidea psychotroides*. **D.** Lirela de *Graphis macella*. **E.** Lirela de *Phaeographis scalpturata*. **F.** Peritecio de *Porina nucula* e. Excípulo (carbonizado en *M. psychotroides* y *G. macella*). h. Himenio (insperso en *P. scalpturata*). o. ostiolo. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 796/ COL 1029/ COL 383/ COL 926/ COL 851/ COL 742, respectivamente.

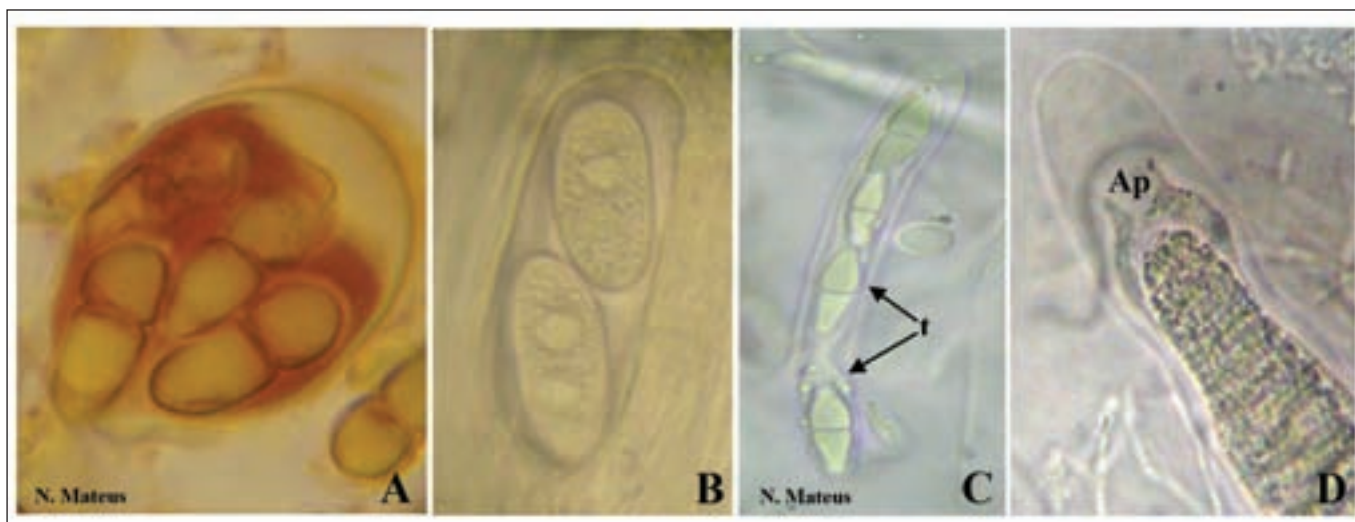


Figura 2. Características generales de las ascas. **A.** Asca globosa de *Arthonia*. **B.** Asca elipsoidal de *Lopezaria*. **C.** Asca cilíndrica bitunicada de *Strigula*. **D.** Asca con aparato apical de *Graphis*.

Entre los caracteres más relevantes se encuentran la forma, las paredes (túnicas) y los mecanismos de apertura (aparato apical) (Figura 2). Las ascosporas, al igual que las ascas, constituyen un carácter diagnóstico en la determinación a nivel de género y especie, además son más fáciles de visualizar al microscopio que las ascas. Estas presentan una gran variación de caracteres, como la forma (desde aciculares a elipsoides), la cantidad de células (simples a pluricelulares), la coloración (hialinas a marrones o verde parduzcas), las paredes (ornamentadas hasta rodeadas por halos), la cantidad de septos (uniseptada a pluriseptada o muriforme) (Brodo *et al.* 2001; Barreno & Pérez-Ortega 2003; Nash III 2008). Esta variedad de características en las ascosporas de microlíquenes corticícolas, probablemente se deba asociar a las diferentes estrategias de dispersión, en las que se incluyen factores como el viento, el agua y/o los animales (Sipman & Harris 1989; Nash III 2008).

Esta contribución presenta las descripciones de las ascosporas de 92 especies correspondientes a 38 géneros y 18 familias de microlíquenes corticícolas. Las especies aquí descritas son el resultado del inventario y descripción de los líquenes corticícolas presentes en cinco áreas de la región Caribe de Colombia (Rincón-Espitia 2011).

Área de estudio

La zona Norte de Colombia comprende la región Caribe, cuenta con una extensión aproximada de 142.000 km², que

corresponde al 11,6% de la superficie total del territorio nacional (Rangel-Ch. *et al.* 1997; Rangel-Ch. & Carvajal-Cogollo 2009). Las áreas de muestreo se concentraron en cuatro departamentos:

1. Departamento del Atlántico, municipio de Juan de Acosta, Localidad La Batatilla. Bosque seco tropical. Altura promedio de 120 a 141 m. Coordenadas 10° 46' 39,6" N y 75° 02' 40,4" W.
2. Departamento del Cesar, municipio de Río de Oro, Veredas: Garaguya, El Gitano y Santa María. Bosque húmedo (Serranía del Perijá). Altura promedio de 1500-1546 m. Coordenadas 08° 15.9' 0.9" N y 73° 25.0' 12" W.
3. Departamento de Córdoba, municipio Los Córdoba, vereda Santa Rosa de la caña. Bosque de semihúmedo. Altura promedio de 90 a 100 m. Coordenadas 08° 47' 42.5" N y 76° 19' 24.6" W.
4. Departamento de Córdoba, municipio de Tierralta, vereda Tuis Tuis. Bosque húmedo- pluvial. Altura promedio de 160 a 190 m. Coordenadas 08° 02' 20.1" N y 76° 05' 40.3" W.
5. Departamento La Guajira, municipio Urumita, vereda Tierra Nueva. Bosque húmedo. Serranía del Perijá. Altura promedio de 1800- 1870 m. y coordenadas 10° 27' 25.1" N, 72° 57' 20.7" W.

Materiales y métodos

Fase de campo

El material líquénico fue colectado en cinco salidas de campo, llevadas a cabo entre agosto de 2009 y septiembre de 2010.

Fase de laboratorio

El material colectado se determinó en el Herbario Nacional Colombiano (COL) y en el Herbario Emilio-Mahecha-sección criptógamas, de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (UDBC). Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas, mediante el uso de un estereoscopio (Cambridges Instruments) y un microscopio (Olympus BX40), se describieron los caracteres morfológicos y anatómicos, estos últimos generalmente de ascomas (apotecios, peritecios o lirelas), cuando estaban presentes. La identificación se llevó a cabo mediante el uso de literatura disponible, claves y descripciones. Simultáneamente, se llevó a cabo un registro fotográfico de los ejemplares estudiados junto con algunos caracteres anatómicos, específicamente de las ascosporas.

La descripción de las ascosporas de líquenes, es mucho más sencilla que las desarrolladas en el campo de la palinología tanto para pteridófitos como para angiospermas. Al efectuar la descripción morfológica de las ascosporas, se tuvieron en cuenta caracteres como el tamaño, el tipo de septación, la coloración, la forma y la amiloidea (reacción positiva azul, con Lugol) ya que son los caracteres fundamentales utilizados en las claves taxonómicas. Se midieron por lo menos 10 esporas, se determinaron los promedios y las desviaciones estándar. Todas las medidas expresan en primer lugar la longitud y posteriormente el ancho y fueron tomadas en micrones (μ).

Resultados

Se describen a continuación las características principales de las ascosporas (coloración, forma, septación, cantidad de septos, tamaño y amiloidea) de 92 microlíquenes del Caribe colombiano (Tabla 1). El material estudiado se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano COL bajo la numeración de Rincón-Espitia.

Especie	Coloración	Forma	Septación	N° Septos	Tamaño	Amiloidea	Fig.
<i>Arthonia</i> aff. <i>bessalis</i> Nyl.	Marrón	Elipsoidal	Muriforme	-	33.3 (\pm 7.8) x 14.0 (\pm 1.5)	Ausente	3
<i>Arthonia complanata</i> Fée	Hialina	Macrocefálica	Transversal	3 a 5	20.3 (\pm 2.0) x 7.8 (\pm 0.8)	Ausente	3
<i>Arthonia cinnabarina</i> (DC.) Wallr	Hialina	Macrocefálica	Transversal	4 a 5	27.7 (\pm 1.5) x 9.8 (\pm 2.0)	Ausente	3
<i>Helminthocarpon leprevostii</i> Fée	Hialina	Elipsoidal	Muriforme	-	98.8 (\pm 8.6) x 33.8 (\pm 4.8)	Ausente	3
<i>Brigantiaea leucoxantha</i> (Spreng.) R.Sant. & Hafellner	Hialina	Elipsoidal	Muriforme	-	82.3 (\pm 14.6) x 27.5 (\pm 4.2)	Ausente	3
<i>Coenogonium linkii</i> Ehrenb	Hialina	Elipsoidal	Transversal	1	7.5 (\pm 1.6) x 2.5 (\pm 0.5)	Ausente	3
<i>Coenogonium magdalenae</i> Rivas-Plata, Lücking & Lizano	Hialina	Fusiforme	Transversal	1	9.3 (\pm 0.8) x 2.3 (\pm 0.5)	Ausente	3
<i>Dyplolabia afzelii</i> (Ach.) A. Massal.	Hialina	Elipsoidal	Transversal	3	17.5 (\pm 2.2) x 7.3 (\pm 3.3)	Ausente	3
<i>Fissurina deficiens</i>	Hialina	Elipsoidal	Transversal	3	22.0 (\pm 2.9) x 8.8 (\pm 1.4)	Presente	3
<i>Fissurina hyalinella</i> Müll. Arg.	Hialina	Elipsoidal	Transversal	3	14.2 (\pm 1.3) x 5.0 (\pm 0.0)	Ausente	3
<i>Fissurina incrustans</i> Fée	Hialina	Ovalada	Muriforme	-	19.7 (\pm 5.7) x 7.8 (\pm 2.8)	Presente	3
<i>Fissurina pseudostromatica</i> Lücking & Rivas Plata	Hialina	Ovalada	Transversal	3	18.3 (\pm 2.0) x 9.2 (\pm 1.8)	Presente	3
<i>Glyphis scyphylifera</i> (Ach.) Staiger	Hialina	Elipsoidal	Muriforme	-	20.2 (\pm 3.1) x 11.3 (\pm 1.0)	Ausente	4
<i>Graphis acharii</i> Fée	Hialina	Fusiforme	Muriforme	-	142.4 (\pm 24.1) x 20.8 (\pm 2.7)	Presente	4
<i>Graphis argentia</i> Makhija & Patw	Hialina	Fusiforme	Transversal	5 a 7	17.8 (\pm 4.4) x 5.8 (\pm 1.3)	Presente	4
<i>Graphis comma</i> (Ach.) Spreng.	Hialina	Elipsoidal	Muriforme	-	24.3 (\pm 4.6) x 9.3 (\pm 0.8)	Presente	4
<i>Graphis daintriensis</i> (A. W. Archer) A. W. Archer	Hialina	Fusiforme	Muriforme	-	74.2 (\pm 12.3) x 19.6 (\pm 3.3)	Presente	4
<i>Graphis dendrogramma</i> Nyl.	Hialina	Elipsoidal	Transversal	6 a 8	23.3 (\pm 4.1) x 6.1 (\pm 1.2)	Presente	4

<i>Graphis dupaxana</i> Vain.	Hialina	Elipsoidal	Transversal	8 a 12	37.0 (±4.0) x 5.3 (±0.5)	Presente	4
<i>Graphis furcata</i> Fée	Hialina	Elipsoidal	Transversal	6 a 9	24.2 (±2.6) x 5.0 (±0.0)	Presente	4
<i>Graphis illinata</i> Eschw.	Hialina	Fusiforme	Muriforme	-	168.7 (±24.5) x 19.8 (±1.0)	Presente	4
<i>Graphis macella</i> Kremp.	Hialina	Fusiforme	Muriforme	-	208.3 (±9.8) x 34.3 (±3.7)	Presente	4
<i>Graphis miniata</i> Redinger	Hialina	Fusiforme	Term. Muriformes	-	89.2 (±11.6) x 12.1 (±1.9)	Presente	4
<i>Graphis pinicola</i> Zahlb.	Hialina	Fusiforme	Transversal	6 a 8	26.0 (±3.1) x 6.3 (±0.5)	Presente	4
<i>Graphis proserpens</i> Vain.	Hialina	Fusiforme	Transversal	7 a 10	34.2 (±7.9) x 5.8 (±1.3)	Presente	5
Especie	Coloración	Forma	Septación	N° Septos	Tamaño	Amiloidea	Fig.
<i>Graphis rhizocola</i> (Fée) Lücking & Chávez	Hialina	Fusiforme	Transversal	15 a 18	72.9 (±4.6) x 10.0 (±1.3)	Presente	5
<i>Hemithecium balbisii</i> (Fée) Trevis.	Hialina	Elipsoidal	Submuriforme	-	26.3 (±1.4) x 8.3 (±1.3)	Presente	5
<i>Phaeographis</i> cf. <i>decipiens</i> Müll. Arg.	Marrón	Elipsoidal	Transversal	7 a 9	33.7 (±3.8) x 9.7 (±1.5)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Phaeographis haematites</i> (Fée) Müll. Arg.	Marrón a gris	Oblonga	Transversal	5	26.8 (±1.9) x 8.0 (±0.9)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Phaeographis intricans</i> (Nyl.) Staiger	Hialina	Fusiforme	Transversal	5 a 7	23.2 (±1.2) x 7.2 (±0.4)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Phaeographis lepieurii</i> (Mont.) Staiger	Hialina	Oblonga	Transversal	5 a 6	21.7 (±2.0) x 7.9 (±1.9)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Phaeographis</i> cf. <i>oscitans</i>	Marrón	Ovalada	Submuriforme	-	30.4 (±4.3) x 5.8 (±1.3)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Phaeographis platycarpa</i> Müll. Arg.	Marrón a gris	Elipsoidal	Transversal	6 a 7	29.5 (±2.2) x 7.5 (±0.5)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Phaeographis sculpturata</i> (Ach.) Staiger.	Marrón	Fusiforme	Muriforme	-	133.7 (±10.4) x 36.5 (±1.2)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Sarcographa tricolor</i> (Ach.) Müll. Arg.	Marrón	Ovalada	Transversal	3	18.8 (±4.1) x 8.1 (±5.9)	Ausente (I+ rojizo)	5
<i>Lopezaria isidiza</i> (Makhija & Nagarkar) Aptroot & Sipman	Hialina	Elipsoidal	Transversal	1	37.5 (±3.3) x 17.5 (±3.0)	Ausente	5
<i>Lopezaria versicolor</i> (Fée) Kalb & Haf	Hialina	Elipsoidal	Transversal	1	47.3 (±3.3) x 16.7 (±0.5)	Ausente	6
<i>Ramboldia russula</i> (Ach.) Kalb, Lumbsch & Elix	Hialina	Elipsoidal	Ausente	-	8.7 (±1.0) x 3.3 (±0.5)	Ausente	6
<i>Letrouitia domingensis</i> (Pers.) Haf. & Bellem	Hialina	Fusiforme	Transversal	3	13.3 (±1.4) x 5.5 (±0.5)	Ausente	6
<i>Malmidea fuscilla</i> (Müll. Arg.) Kalb & Lücking	Hialina	Elipsoidal	Ausente	-	8.5 (±2.2) x 5.3 (±0.8)	Ausente	6
<i>Malmidea granifera</i> (Ach.) Kalb & Lücking	Hialina	Elipsoidal	Ausente	-	12.8 (±2.3) x 8.3 (±1.4)	Ausente	6
<i>Malmidea leptoloma</i> (Müll. Arg.) Kalb & Lücking	Hialina	Elipsoidal	Ausente	-	10.3 (±2.0) x 4.4 (±0.7)	Ausente	6
<i>Malmidea psychotroides</i> Kalb & Lücking	Hialina	Elipsoidal	Ausente	-	8.1 (±1.0) x 5.3 (±1.6)	Ausente	6
<i>Megalospora tuberculosa</i> (Fée) Sipman	Hialina	Oblonga	Transversal	10 a 12	114.2 (±4.9) x 22.8 (±4.0)	Ausente	6
<i>Melaspilea</i> sp.	Hialina	Elipsode constreñida	Transversal	1	18.8 (±1.3) x 7.8 (±1.2)	Ausente	6
<i>Anisomeridium</i> aff. <i>subprostans</i> (Nyl.) R. C. Harris	Hialina	Fusiforme	Transversal	1	18.8 (±1.8) x 4.3 (±0.5)	Ausente	6

<i>Monoblastia rappii</i> Zahlbr.	Hialina	Oblonga	Ausente	-	15.4 (±1.6) x 7.5 (±0.3)	Ausente	6
<i>Pertusaria</i> sp.	Hialina	Elipsoidal	Ausente	-	82.8 (±9.5) x 26.1 (±3.5)	Ausente	6
<i>Amandinea</i> sp.	Marrón	Elipsoidal	Transversal	1	9.8 (±0.8) x 3.3 (±0.8)	Ausente	7
<i>Buellia</i> sp.	Marrón	Elipsoidal	Transversal	3	22.3 (±2.3) x 8.5 (±1.6)	Ausente	7
<i>Porina americana</i> Fée	Hialina	Fusiforme	Transversal	11 a 14	63.7 (±13.4) x 7.3 (±0.5)	Ausente	7
<i>Porina</i> aff. <i>exasperatula</i> Vain.	Hialina	Acicular	Transversal	15 a 19	50.5 (±22.4) x 4.8 (±0.8)	Ausente	7
<i>Porina imitatrix</i> Müll. Arg.	Hialina	Fusiforme	Transversal	7	44.7 (±5.8) x 7.5 (±0.4)	Ausente	7
Especie	Coloración	Forma	Septación	Nº Septos	Tamaño	Amiloidea	Fig.
<i>Porina melanops</i>	Hialina	Fusiforme	Transversal	3	28.5 (±1.9) x 4.3 (±0.4)	Ausente	7
<i>Porina nucula</i> Ach.	Hialina	Fusiforme	Transversal	6 a 7	49.3 (±10.4) x 10.5 (±1.2)	Ausente	7
<i>Porina rhodostomoides</i> Vain	Hialina	Acicular	Transversal	15 a 19	78.0 (±8.6) x 4.7 (±0.5)	Ausente	7
<i>Porina simulans</i> Müll. Arg.	Hialina	Fusiforme	Transversal	6 a 8	48.3 (±5.3) x 5.8 (±1.3)	Ausente	7
<i>Porina subnucula</i>	Hialina	Fusiforme	Transversal	7	38.4 (±5.2) x 6.0 (±1.1)	Ausente	7
<i>Lithothelium obtectum</i> (Müll. Arg.) Aptroot	Hialina	Fusiforme	Transversal	3	14.3 (±2.5) x 7.6 (±1.2)	Ausente	7
<i>Pyrenula anomala</i> (Ach.) Vain.	Marrón	Fusiforme	Transversal	3	19.2 (±3.4) x 7.8 (±1.3)	Ausente	7
<i>Pyrenula cubana</i> (Müll. Arg.) R. C. Harris	Marrón	Fusiforme	Transversal	3	24.0 (±2.5) x 9.5 (±1.7)	Ausente	8
<i>Pyrenula erumpens</i> R.C. Harris	Marrón	Fusiforme	Transversal	3	50.8 (±4.9) x 17.5 (±2.2)	Ausente	8
<i>Pyrenula laii</i> Aptroot	Marrón	Fusiforme	Transversal	3	52.8 (±2.5) x 22.7 (±2.0)	Ausente	8
<i>Pyrenula macrocarpa</i> A. Massal.	Marrón	Oblonga	Transversal	3	29.7 (±2.9) x 15.2 (±1.2)	Ausente	8
<i>Pyrenula mamillana</i> (Ach.) Trevis.	Marrón	Fusiforme	Transversal	3	20.5 (±2.1) x 7.7 (±0.5)	Ausente	8
<i>Pyrenula</i> aff. <i>microcarpa</i> Müll. Arg.	Marrón	Oblonga	Transversal	3	25.0 (±1.1) x 9.9 (±1.4)	Ausente	8
<i>Pyrenula ochraceoflava</i> (Nyl.) R.C. Harris	Marrón a gris	Elipsoidal	Muriforme	-	18.8 (±2.1) x 8.3 (±2.3)	Ausente	8
<i>Pyrenula papilligera</i> (Leight.) Müll. Arg.	Marrón	Globosa	Transversal	3	10.8 (±1.3) x 10.2 (±4.4)	Ausente	8
<i>Pyrenula quassiaecola</i> Fée	Marrón	Fusiforme	Transversal	3	31.8 (±3.7) x 13.5 (±1.6)	Ausente	8
<i>Pyrenula</i> aff. <i>subferruginea</i> (Malme) R. C. Harris	Marrón	Fusiforme	Transversal	4	15.0 (±2.4) x 6.0 (±1.1)	Ausente	8
<i>Cresponea melanocheleoides</i> (Vain.) Egea & Torrente	Hialina	Fusiforme	Transversal	14 a 15	77.2 (±5.5) x 7.0 (±1.9)	Ausente	8
<i>Erythrodecton granulatum</i> (Mont.) G. Thor	Hialina	Biclavada	Transversal	3 a 4	44.6 (±6.0) x 3.7 (±1.2)	Ausente	8
<i>Opegrapha difficilior</i> Nyl.	Hialina	Fusiforme	Transversal	7	32.1 (±6.4) x 3.8 (±1.4)	Ausente	9
<i>Opegrapha irosina</i> Vain.	Hialina	Fusiforme	Transversal	7 a 10	34.0 (±4.5) x 5.0 (±0.9)	Ausente	9
<i>Leucodecton occultum</i> Eschw.) Frisch	Marrón	Oblonga	Muriforme	-	18.3 (±1.4) x 11.2 (±1.3)	Ausente	9
<i>Melanotrema platystomum</i> (Mont.) Frisch	Hialina	Elipsoidal	Transversal	4 a 6	16.8 (±3.5) x 6.2 (±1.3)	Presente	9
<i>Ocellularia cavata</i> (Ach.) Müll. Arg.	Hialina	Oblonga	Transversal	6 a 9	31.3 (±4.1) x 6.7 (±1.3)	Presente	9
<i>Ocellularia gracilis</i> Müll. Arg.	Hialina	Elipsoidal	Transversal	15 a 20	105.4 (±14.5) x 21.5 (±2.7)	Presente	9
<i>Ocellularia laeviusculoides</i>	Hialina	Elipsoidal	Transversal	4 a 5	21.8 (±5.3) x 6.7 (±0.5)	Presente	9

<i>Ocellularia</i> sp.	Hialina	Oblonga	Transversal	7 a 8	24.3 (±4.2) x 7.5 (±0.5)	Presente	9
<i>Thelotrema expallescens</i>	Hialina	Elipsoidal	Submuriforme	-	33.2 (±2.2) x 7.7 (±1.0)	Presente	9
<i>Thelotrema</i> sp.	Hialina	Oblonga	Transversal	7 a 8	15.8 (±1.0) x 7.4 (±0.5)	Presente	9
<i>Trinathotrema</i> aff. <i>stictideum</i>	Hialina	Fusiforme	Transversal	20	54.5 (±12.4) x 6.3 (±0.8)	Ausente	9
<i>Astrothelium cinnamomeum</i> (Eschw.) Müll.Arg.	Hialina	Elipsoidal	Transversal	3	24.2 (±1.3) x 7.2 (±0.3)	Ausente	9
<i>Bathelium degenerans</i> (Vain.) R. C. Harris	Hialina	Oblonga	Transversal	3	21.8 (±3.1) x 5.8 (±1.0)	Ausente	10
Especie	Coloración	Forma	Septación	N° Septos	Tamaño	Amiloidea	Fig.
<i>Bathelium madreporiforme</i> (Eschw.) Trevis.	Hialina	Elipsoidal	Muriforme	-	44.5 (±6.4) x 12.0 (±1.0)	Ausente	10
<i>Laurera phaeomelodes</i> (Müll. Arg.) Zahlbr.	Hialina	Elipsoidal	Muriforme	-	32.5 (±5.7) x 9.8 (±1.6)	Ausente	10
<i>Pseudopyrenula subnudata</i> Müll. Arg.	Hialina	Fusiforme	Transversal	3	21.8 (±2.7) x 6.3 (±0.5)	Ausente	10
<i>Trypethelium aeneum</i> (Eschw.) Zahlbr.	Hialina	Oblonga	Transversal	3	24.5 (±3.5) x 7.7 (±0.5)	Ausente	10
<i>Trypethelium eluteriae</i> Spreng.	Hialina	Fusiforme	Transversal	9 a 12	42.0 (±2.4) x 7.7 (±0.5)	Ausente	10
<i>Trypethelium platystosum</i> Mont.	Hialina	Fusiforme	Transversal	12 a 16	59.8 (±16.4) x 8.8 (±1.3)	Ausente	10
<i>Trypethelium tropicum</i> (Ach.) Müll. Arg.	Hialina	Oblonga	Transversal	3	23.2 (±2.1) x 6.0 (±0.6)	Ausente	10

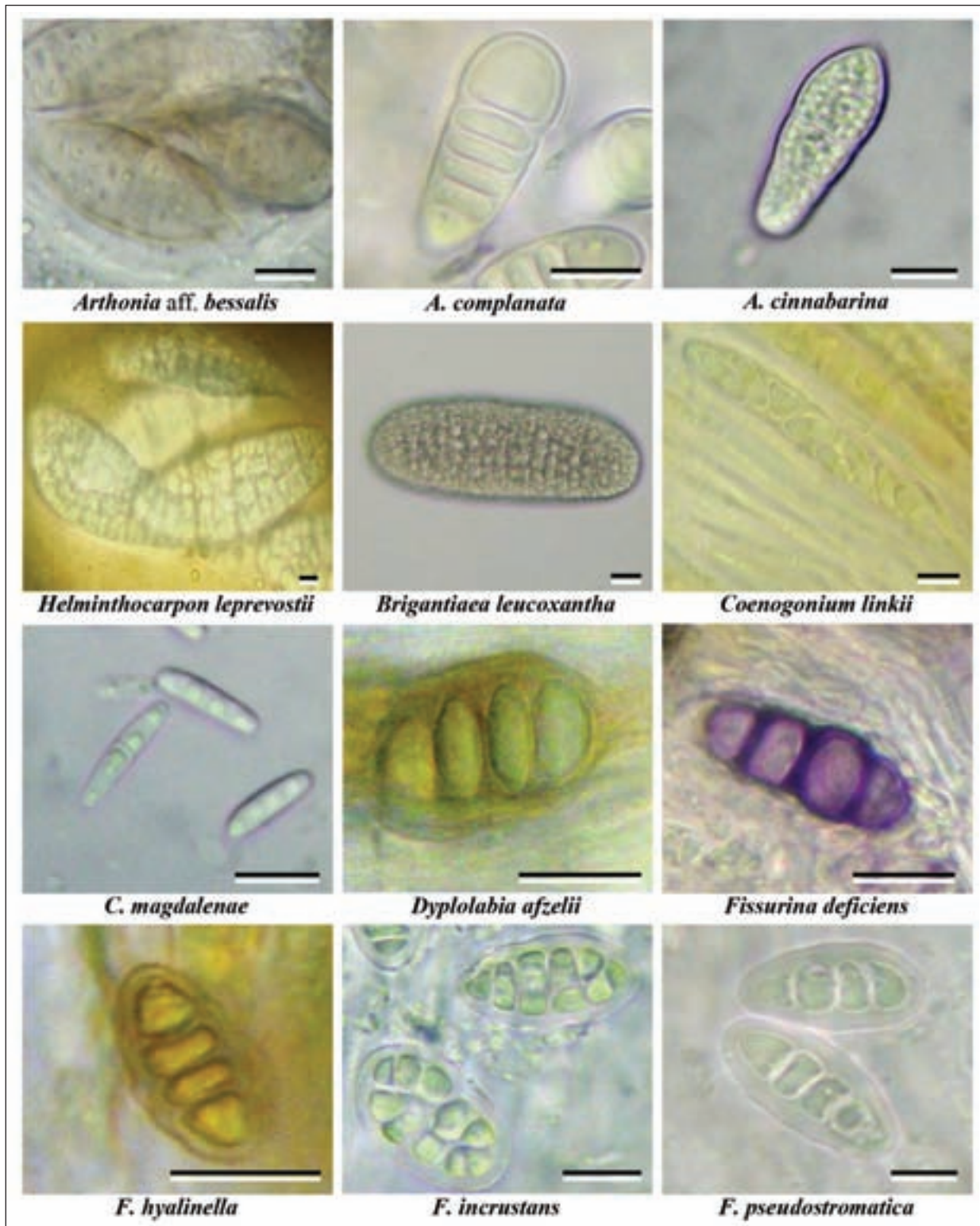


Figura 3. Ascosporas de las familias Arthoniaceae, Brigantiaeaceae, Coenogoniaceae y Graphidaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 350/ COL 777/COL 918/ COL 481/ COL 1080/COL 301/ COL 879/COL 1060/ COL 403/ COL 487/COL 730/COL 786, respectivamente. Escala =10µm.

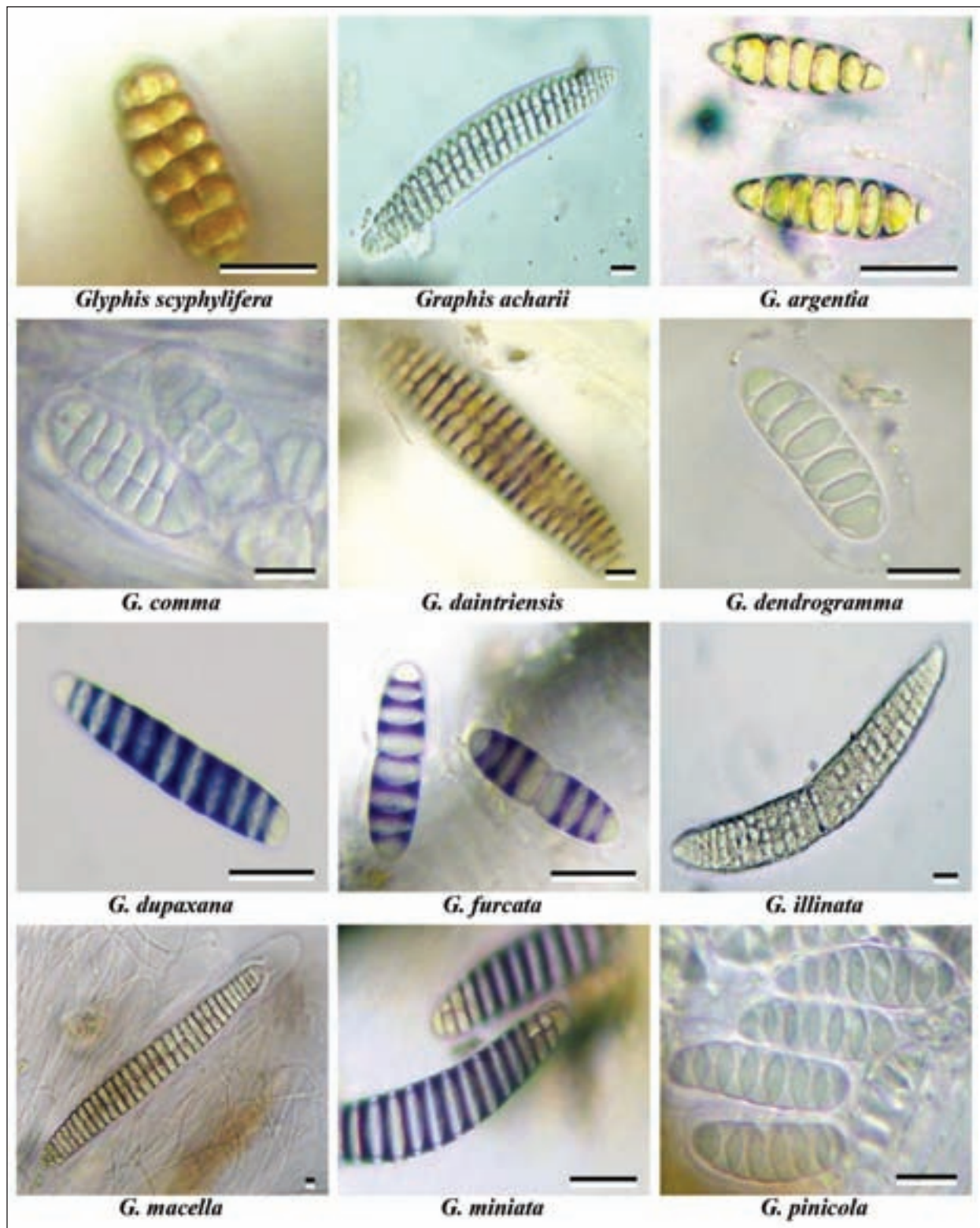


Figura 4. Ascosporas de la familia Graphidaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 776/ COL 1037/ COL 300/ COL 844/ COL 215/ COL 021/ COL 1040/ COL 282/ COL 826/ COL 851/ COL 363/ COL 354, respectivamente. Escala =10µm.

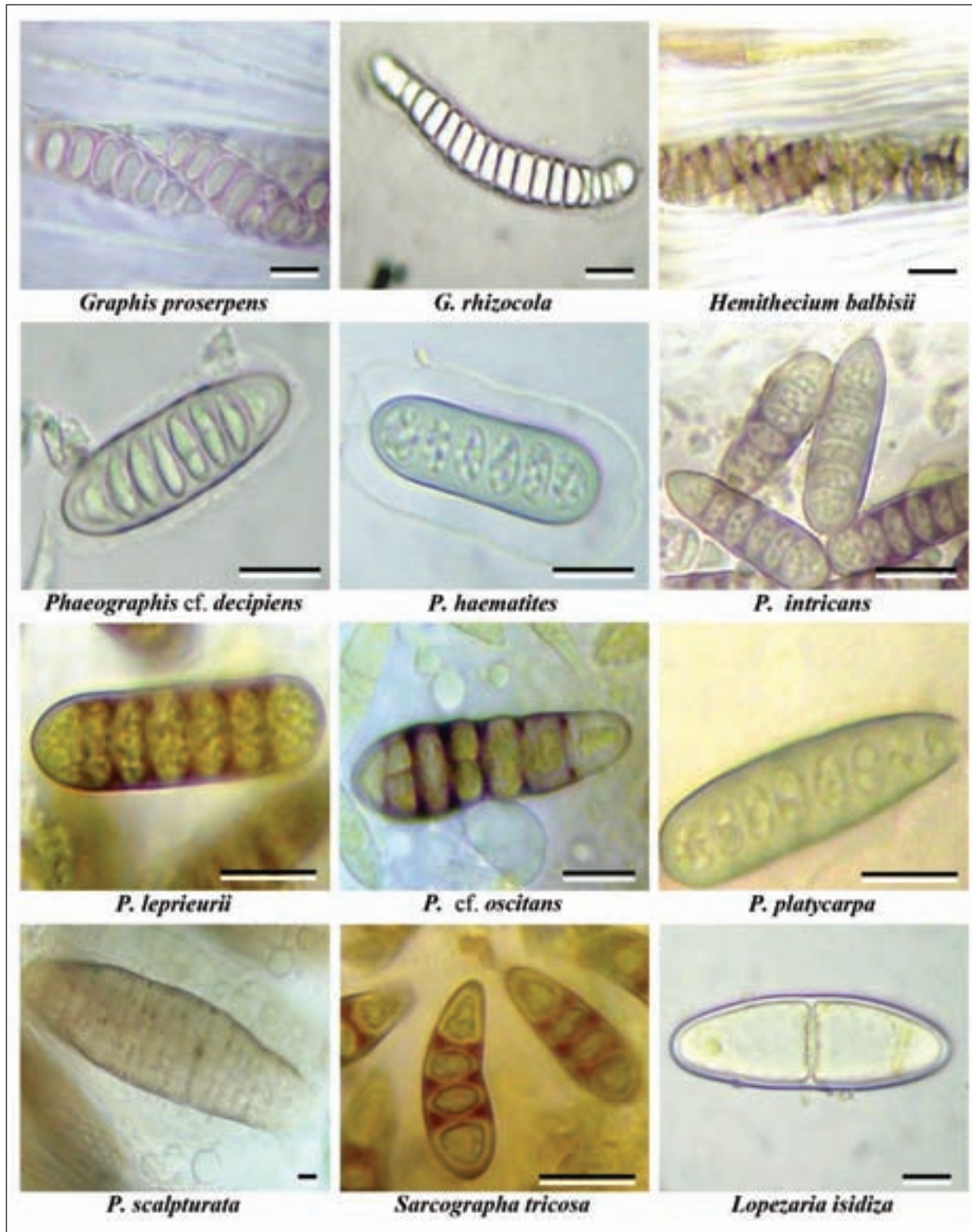


Figura 5. Ascosporas de la familia Graphidaceae e Incertae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 146/ COL 813/ COL 002/ COL 788/ COL 1045/ COL 707/ COL 375/ COL 012/ COL 823/ COL 823/ COL 017/ COL 957, respectivamente. Escala =10µm.

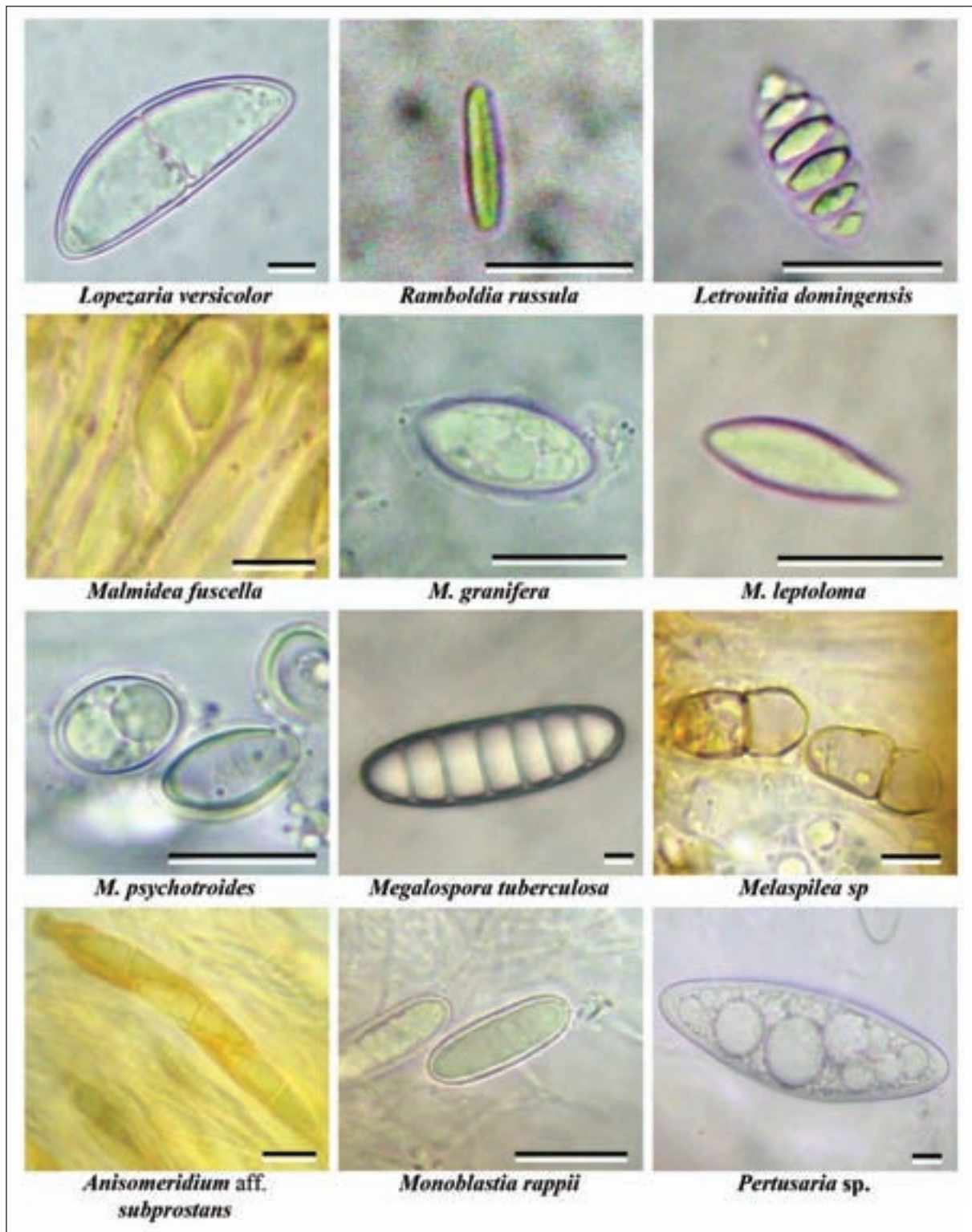


Figura 6. Ascosporas de las familias Lecanoraceae, Letrouitiaceae Malmideaceae, Megalosporaceae, Melaspileaceae, Monoblastaceae y Pertusariaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 817/ COL 987/ COL 251/ COL 450/ COL 409/ COL 440/ COL 460/ COL 418/ COL 866/ COL 495/ COL 397/ COL 897, respectivamente. Escala =10µm.

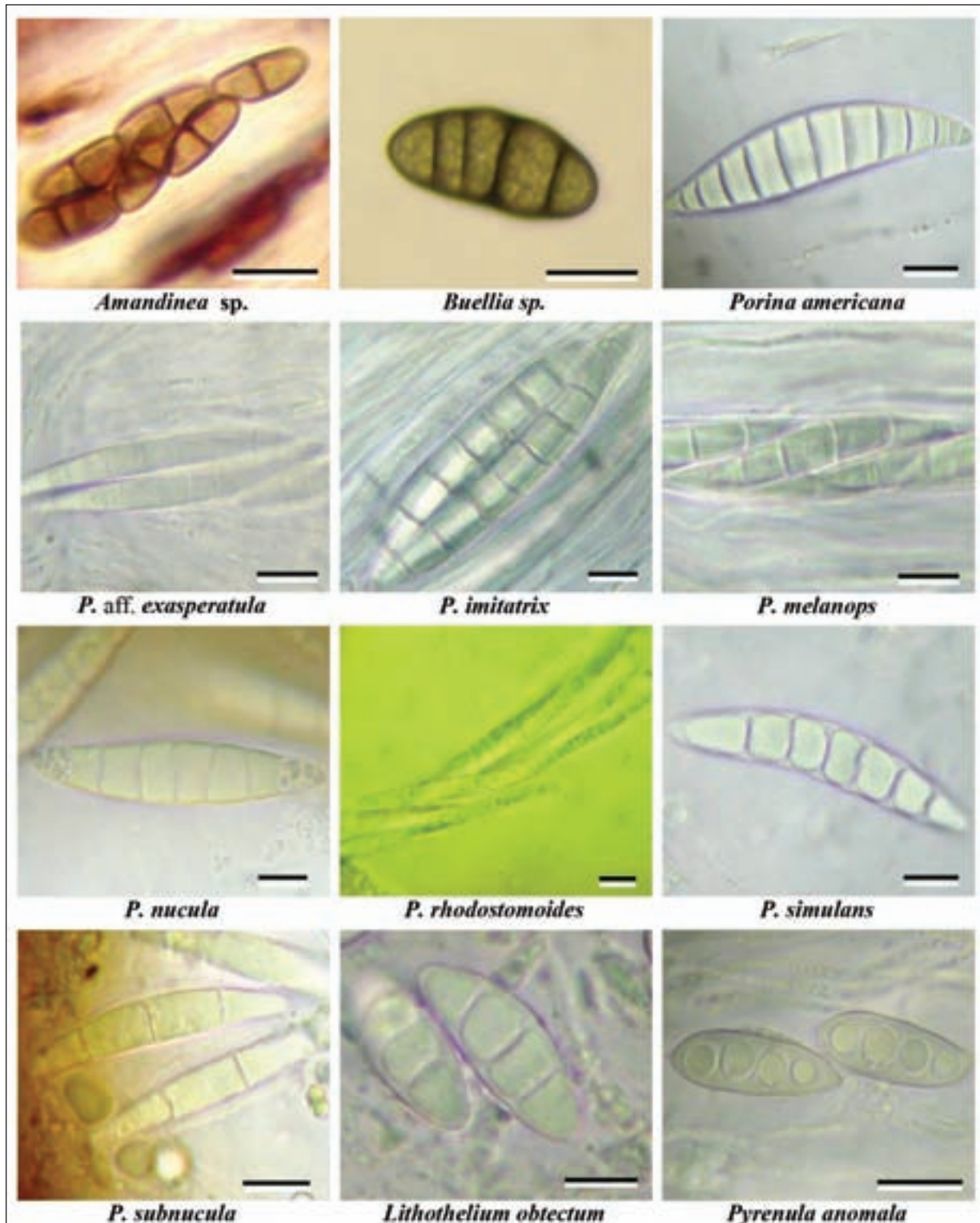


Figura 7. Ascosporas de las familias Physciaceae, Porinaceae y Pyrenulaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 434/ COL 912/ COL 840/ COL 110/ COL 755/ COL 279/ COL 802/ COL 246/ COL 571/ COL 569/ COL 598/ COL 975, respectivamente. Escala =10µm.

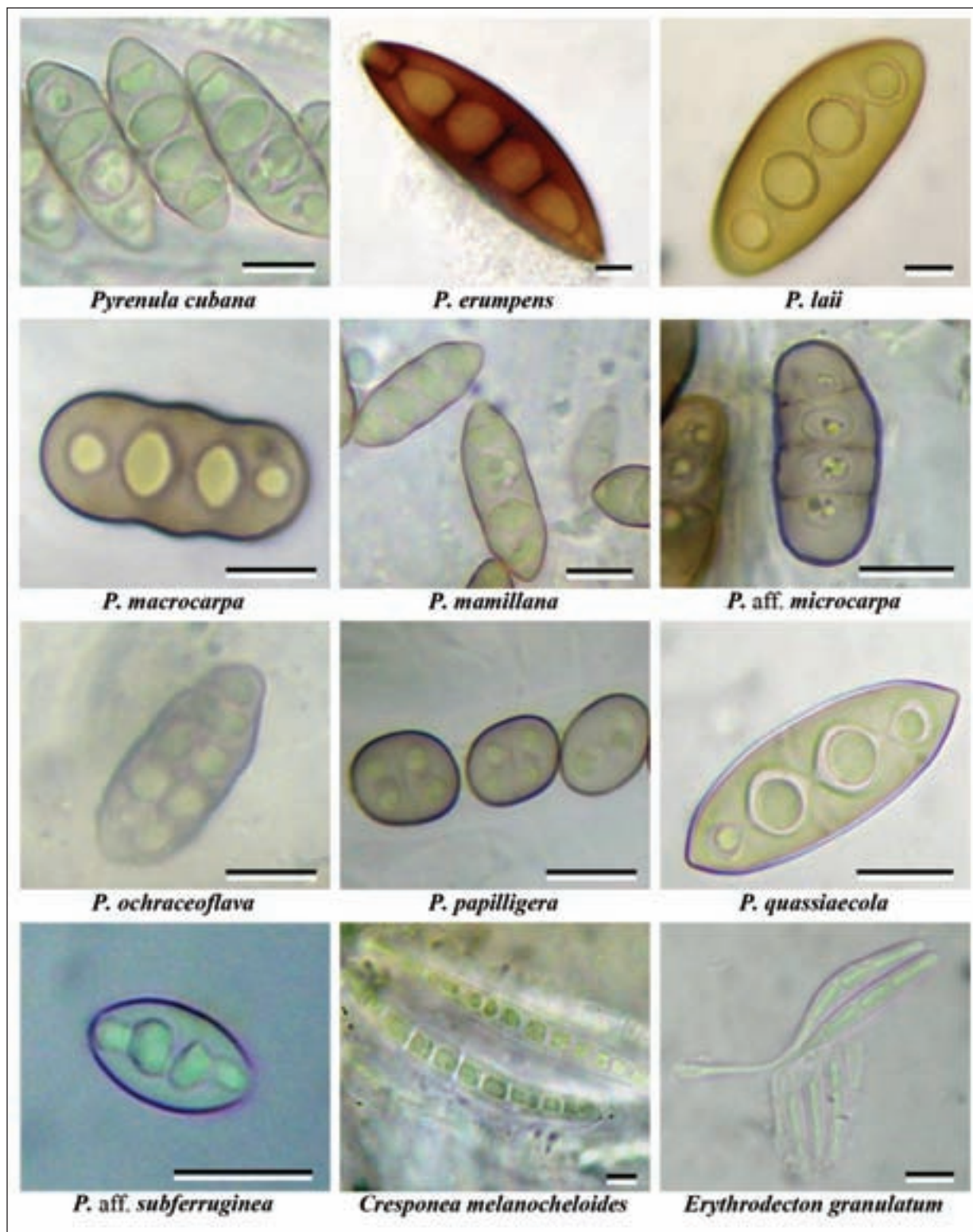


Figura 8. Ascosporas de las familias Pyrenulaceae y Roccellaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 523/ COL 401/ COL 905/ COL 726/ COL 306/ COL 357/ COL 540/ COL 521/ COL 846/ COL 650/ COL 032/ COL 022, respectivamente. Escala =10µm

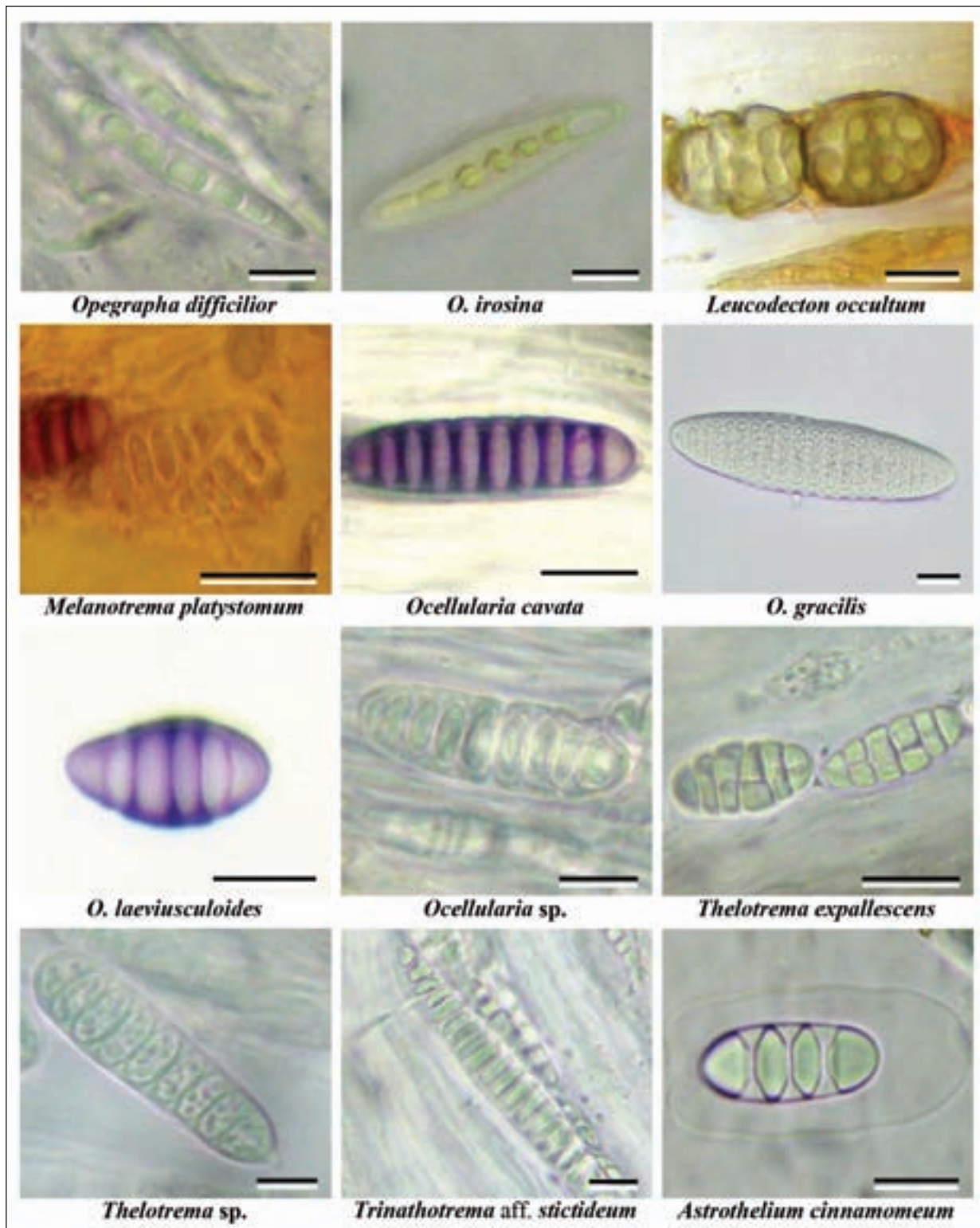


Figura 9. Ascosporas de las familias Roccellaceae, Thelotremataceae y Trypetheliaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 412/ COL 269/ COL 479/ COL 352/ COL 395/ COL 775/ COL 274/ COL 109/ COL 158/ COL 708/ COL 551/ COL 406, respectivamente. Escala =10µm.

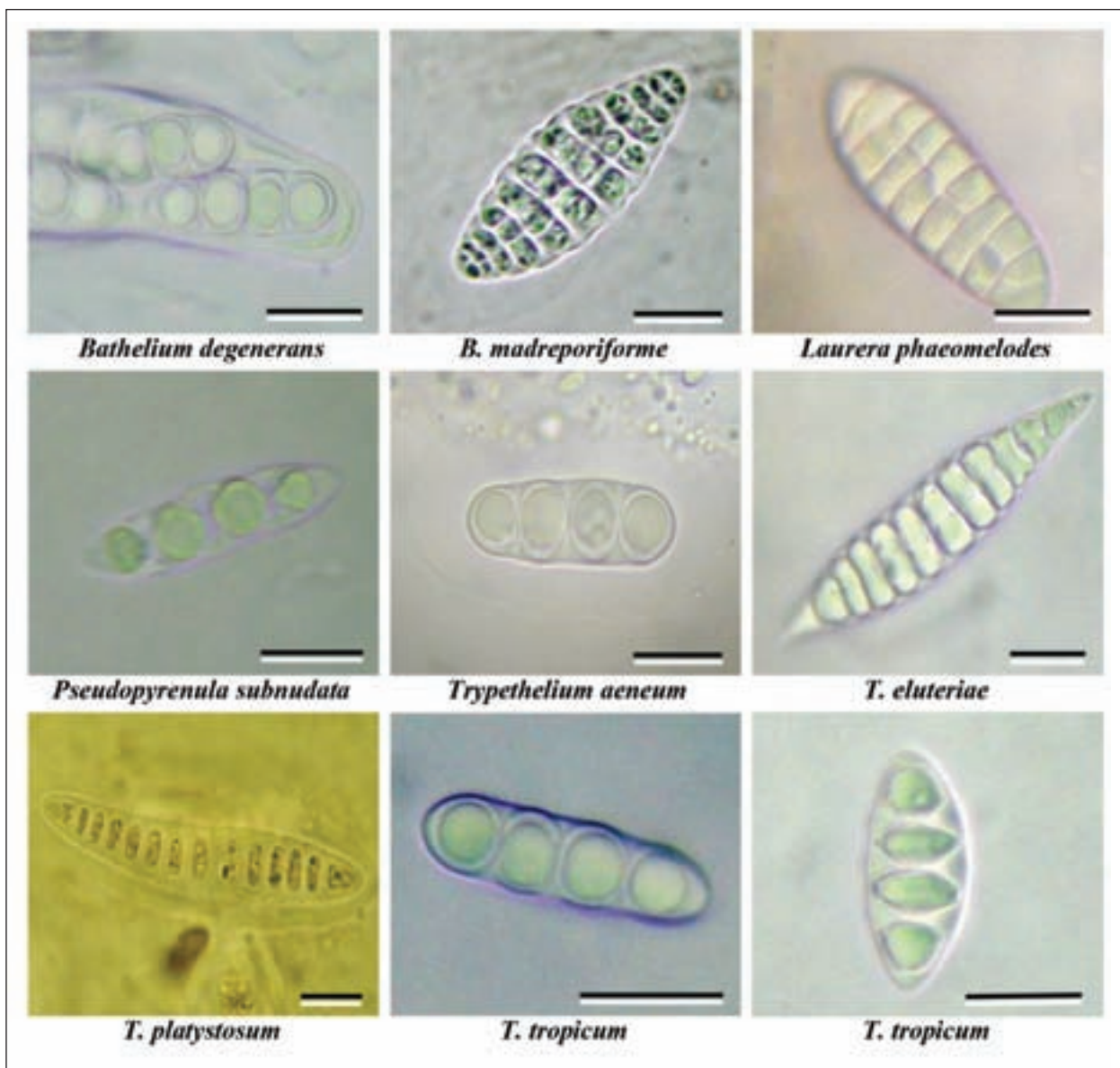


Figura 10. Ascosporas de la familia Trypetheliaceae. Tomadas de A. Rincón-Espitia: COL 783/ COL 026/ COL 595/ COL 477/ COL 989/ COL 838/ COL 819/ COL 1054, respectivamente. Escala =10 μ m.

Consideraciones finales

Las ascosporas encontradas en los líquenes corticícolas del Caribe colombiano, se caracterizaron por ser hialinas en su mayoría (68 especies). Según Cáceres *et al.* (2007), la pigmentación de las ascosporas se genera como una estrategia ante algunas condiciones ambientales, como la fuerte intensidad lumínica y las prolongadas sequías. Estas particularidades se presentaron exclusivamente en un sitio de muestreo (Juan de Acosta, atlántico), donde existe dominancia

de especies de *Pyrenula*, caracterizadas por sus ascosporas marrones.

Las formas más frecuentes de las ascosporas fueron elipsoidales (35 especies) y fusiformes (35 especies), las otras formas estuvieron constituidas por trece o menos especies. En cuanto al tipo de septación, la mayoría de especies presentaron septos transversales (66 especies), seguido de septos muriformes (16 especies), el resto de las especies no presentaron ascosporas septadas (7 especies) o fueron submuriformes.

mes (3 especies). Aún no existen estudios que intenten relacionar la forma y la disposición de los septos como estrategia de dispersión de los microlíquenes.

La mayoría de las ascosporas, 46 especies, estuvieron en un rango de los 7 a los 25 µm, encontrándose menor número de especies a medida que se incrementaba del tamaño de las ascosporas. Esta dominancia por parte de las ascosporas de menor tamaño, se explica como una estrategia de dispersión, ya que las ascosporas pequeñas y livianas son fácilmente transportadas por el viento y pueden alcanzar largas distancias (Sipman & Harris 1989; Nash III 2008). Finalmente, se observó una dominancia por parte de las ascosporas con paredes gruesas (66 especies) en comparación con las ascosporas de paredes delgadas o finas (21 especies). Esta característica es frecuente en los líquenes de bosques tropicales y se infiere que es una función de almacenaje del material extracelular (Sipman & Harris 1989).

Agradecimientos

Al proyecto “Síntesis de la Biodiversidad del Caribe colombiano” del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por el profesor Orlando Rangel-Ch. Al Herbario Emilio Mahecha- sección criptógamas de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas a cargo de la doctora Bibiana Moncada y al Herbario Nacional Colombiano (COL). A Msc. Nancy Mateus por la colaboración con algunas de las fotografías.

Bibliografía

- Aptroot, A., R. Lücking, H. J. M. Sipman, L. Umaña & J. L. Chaves. 2008. Pyrenocarpous lichens with bitunicate asci. A first assessment of the lichen biodiversity inventory in Costa Rica. *Bibliotheca Lichenologica* 97: 1-162.
- Barreno, E. & S. Pérez-Ortega. 2003. Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias. KRK Ediciones, España.
- Cáceres, M. 2007. Corticolous crustose and microfoliose lichens of northeastern Brazil. *Libri Botanici. Brasil* 22: 1-168.
- Cáceres, M. S., R. Lücking & G. Rambold. 2007. Corticolous microlichens in northeastern Brazil: habitat differentiation between coastal Mata Atlántica, Caatinga and Brejos de Altitude. *The Bryologist* 111 (1):1-20.
- Del Prado, R., I. Schmitt, S. Kautz, Z. Palice, R. Lücking & H. T. Lumbsch. 2006. Molecular data place Trypetheliaceae in Dothideomycetes. *Mycological Research* 110: 511-520.
- Hafellner, J. 1997. A world monograph of *Brigantiaea* (lichenized Ascomycotina, Lecanorales). In: Tibell, L. & Hedberg, I. (eds): *Lichen studies dedicated to Rolf Santesson*. – *Symbolae Botanicae Upsalenses* 32 (1): 35-74.
- Lücking, R. 2008b. Foliicolous Lichenized Fungi. *Flora Neotropica Monograph* 103. Organization for Flora Neotropica by The New York Botanical Garden Press. 873 pp.
- Lücking, R. 2009. The taxonomy of the genus *Graphis sensu* Staiger (Ascomycota: Ostropales: *Graphidaceae*). *The Lichenologist* 41 (4): 319:362
- Lücking, R. & E. Rivas Plata. 2008. Clave y Guía Ilustrada para géneros de *Graphidaceae*. *Glalia* 1: 1-41.
- Mangold, A., J. A. Elix & H. Thorsten Lumbsch. 2008. The lotremataceae in Australia.
- NASH III, T. 2008. *Lichen Biology*. Second Edition. Arizona State University. University Press. USA-Cambridge.
- Nelsen, M. P., R. Lücking, M. Grube, J. S. Mbatchou, L. Muggia, E. Rivas Plata & H. T. Lumbsch. 2009. Unravelling the phylogenetic relationships of lichenised fungi in Dothideomyceta. *Studies in Mycology* 64: 135-144.
- Rangel-Ch. J. O., P. D. Lowy-C y M. Aguilar-P. 1997. Distribución de los tipos de vegetación en las regiones naturales de Colombia. Pp. 383-402. En Rangel-Ch, O, P. D. Lowy-C y M. Aguilar-P. (Ed.). *Colombia Diversidad Biótica II, Tipos de vegetación en Colombia*. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Medio Ambiente.
- Rangel-Ch. J. O. & J. Carvajal-Cogollo. Clima de la Serranía de Perijá. En: J. O. Rangel-Ch. (ed.). *Colombia Diversidad Biótica VIII. Media y baja montaña de la Serranía del Perijá*. Universidad Nacional de Colombia. 3-49.
- Rincón-Espitia, A. 2011. Composición de la flora líquénica corticícola en el Caribe colombiano. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- Rivas-Plata, E., Lücking, R., Aptroot, A., Sipman, H. J. M., Chaves, J. L., Umaña, L. & D. Lizano. 2006. A first assessment of the Ticolichen biodiversity inventory in Costa Rica: the genus *Coenogonium* (Ostropales: Coenogoniaceae), with a world-wide key and checklist and a phenotypebased cladistic analysis. *Fungal Diversity* 23: 255-321.
- Sipman, H. Lichen determination keys -Neotropical genera -. Última actualización: 3 noviembre de 2005. Disponible en Internet: <http://www.bgbm.fu-berlin.de/sipman/keys/neokeyA.html>
- Sipman, H. J. & R. C. Harris. 1989. Lichens. En: Lieth, H. & M. J. A. Werger (eds). *Tropical rain forest ecosystems*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 302-308.
- Staiger, B. 2002. Die Flechtenfamilie *Graphidaceae*. *Studien in Richtung einer natürlicheren Gliederung*. *Bibliotheca Lichenologica* 85:1-526.
- Tehler, A. 1990. A new approach to the phylogeny of euascomycetes with a cladistic outline of Arthoniales focusing on Roccellaceae. *Canadian Journal of Botany* 68: 2458-2492.

Recibido: 1 de febrero de 2013

Aceptado para publicación: 10 de diciembre de 2013

***EONATATOR COELLENSIS* NOV. SP. (SQUAMATA:
MOSASAURIDAE), NUEVA ESPECIE DEL CRETÁCICO SUPERIOR
DE COLOMBIA**

***EONATATOR COELLENSIS* NOV. SP. (SQUAMATA: MOSASAURIDAE),
A NEW SPECIES FROM THE UPPER CRETACEOUS OF COLOMBIA**

María Eurídice Páramo-Fonseca*

RESUMEN

Páramo-Fonseca M.E.: *Eonatator coellensis* nov. sp. (Squamata: Mosasauridae), a new species from the Upper Cretaceous of Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 499-518, 2013. ISSN 0370-3908.

En este artículo se da a conocer un nuevo mosasaurio hallado en Colombia. El fósil fue extraído de capas del Campaniano, al norte de la población de Coello, departamento del Tolima. Se trata de un esqueleto casi completo y articulado, en cuyas cavidades se preservaron restos de tejidos blandos. Se ha determinado como una nueva especie del género *Eonatator*, *E. coellensis*, con base en la sistemática propuesta en 2005 por Bardet y otros. La anatomía de la parte anterior del cráneo, así como la morfología y las inter-relaciones de los huesos de la cintura pélvica y de los miembros, constituyen un nuevo aporte a la definición del género. El espécimen colombiano representa el mosasaurio halisaurino más completo conocido hasta ahora en el mundo y ofrece posibles evidencias de gestación interna en los mosasaurios.

Palabras clave: *Eonatator*, Mosasauridae, Campaniano, Colombia

ABSTRACT

In this study a new mosasaur found in Colombia is given out. The fossil was extracted from Campanian rocks, North of the town of Coello, Tolima Department. It is a nearly complete articulated skeleton with soft tissue remains preserved in its cavities. It was determined as a new species of the genus *Eonatator*, *E. coellensis*, based on the systematics proposed in 2005 by Bardet and others. The anatomy of the anterior part of the skull, as well as the morphology and the inter-relationships of the bones of the pelvic girdle and limbs, constitute a new contribution to the genus definition. The Colombian specimen represents the most complete halisaurine mosasaur known so far in the world, and provides new evidences of ovoviviparity in mosasaurs.

Key words: *Eonatator*, Mosasauridae, Campanian, Colombia

* Departamento de Geociencias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia, meparamof@unal.edu.co

Introducción

La familia Mosasauridae está representada ampliamente en el mundo por restos encontrados en sedimentos de edades que van desde el Turoniano hasta el Maastrichtiano. En Colombia se han hallado varios fósiles de esta familia. Los más antiguos corresponden a restos encontrados en capas turonianas del Valle Superior del Magdalena, que fueron incluidos en el género *Yaguarasaurus* Páramo, 1994 (Páramo, 1994; 1997 y 2000). Se conoce también un cráneo procedente de capas del Coniaciano Inferior de Santander, el cual está actualmente en estudio, y un esqueleto hallado en rocas del Campaniano del Tolima cuyo estudio es presentado en este artículo.

Dentro de los mosasaurios conocidos en el mundo, los halisaurinos son considerados representantes basales (DeBraga y Carroll, 1993; Bell, 1997). Sus restos comprenden: un esqueleto relativamente completo y articulado y restos fragmentarios, provenientes de rocas del Santoniano, del Campaniano y del Maastrichtiano de Estados Unidos (Wiman, 1920; Russell, 1970; Baird, 1986; Bell 1997; Holmes y Sues, 2000; Bardet y Pereda-Suberbiola, 2001; Kierman, 2002); restos vertebrales encontrados en capas del Cretácico Superior (¿Santoniano?) de Perú (Caldwell y Bell, 1995); material fragmentario del Campaniano y Maastrichtiano de Europa (Lingham Soliar, 1991; Lindgren y Siverson, 2005) y numerosos restos desarticulados del Maastrichtiano de África (Azzaroli et al., 1975; Lingham Soliar, 1991; Bardet et al., 2005; Díez Díaz y Ortega, 2007; Polcyn et al., 2012).

El espécimen colombiano descrito en este artículo es, entre los Halisaurinae, el ejemplar más completo conocido hasta ahora y ofrece evidencias de gestación interna en el grupo de los mosasaurios. En el contexto nacional, se trata del primer registro de reptiles marinos del Campaniano hecho en Colombia y es hasta ahora el único mosasaurio colombiano que presenta el esqueleto post-craneano.

El espécimen fue reportado por Ricardo Calderón al Museo Geológico del Servicio Geológico Colombiano (anteriormente INGEOMINAS) en 2004 y su excavación se realizó en 2005. Fue encontrado en el lecho de la quebrada El Cajón, pequeña quebrada de aguas intermitentes del municipio de Coello (fig. 1), y fue extraído de capas de la unidad geológica denominada Nivel de Lutitas y Arenas, de edad Campaniano (de Porta, 1965; Montes et al., 2005). En este artículo se ofrece una descripción del espécimen, se propone su ubicación sistemática y se exponen algunas observaciones tafonómicas del hallazgo. El estudio de este ejemplar se realizó en el marco de un convenio de Cooperación establecido entre el

Servicio Geológico Colombiano y la Universidad Nacional de Colombia.

Materiales y Métodos

El fósil fue hallado en una capa de limolita calcárea fósil, en el lecho de una quebrada de una región montañosa, en un sitio ubicado a una hora de camino desde la vía con paso vehicular más cercana. Bajo estas condiciones y por el considerable tamaño, el espécimen fue extraído en 6 bloques transportables. La preparación se realizó en el laboratorio de microfósiles del Servicio Geológico Colombiano, en Bogotá. Dada la alta fragilidad que adquirió la roca durante el transporte debido a su densa fisilidad, fue necesario realizar un previo tratamiento de consolidación, aplicando poliacrilato B-72 en todas y cada una de las diaclasas y fisuras detectadas. Con este procedimiento se logró dar a cada bloque la consistencia necesaria para soportar la vibración del proceso mecánico, el cual, después de varias pruebas, fue el seleccionado para la limpieza del fósil. En la preparación mecánica se utilizaron martillos neumáticos de calibres medio y fino y, en ciertos puntos, se implementó el ataque químico local para limpiar pequeños restos ubicados en lugares de difícil acceso.

Todas las partes del esqueleto fueron protegidas con B-72 y despojadas de la roca sobre la superficie expuesta. A través del ataque químico se preparó una columna vertebral pequeña y articulada ubicada por debajo de la columna vertebral del espécimen. Dado que el fósil conserva el esqueleto casi en su totalidad y corresponde a una nueva forma, el énfasis del estudio se dirigió a ofrecer a la comunidad paleontológica una completa y detallada descripción del espécimen. En la elaboración de los esquemas interpretativos se tuvieron en cuenta observaciones y fotografías tomadas en campo, antes de la extracción, con lo cual se identificaron rasgos conservados solamente como siluetas en la roca. La determinación del espécimen se basó en la sistemática propuesta por Bardet et al. (2005), la cual se apoya en una extensa revisión de los mosasaurios halisaurinos.

Marco geológico

Las rocas que afloran en la región en la que se encontró el fósil corresponden a sedimentos de origen marino depositados durante la ingresión marina que inundó la región occidental del territorio colombiano durante una parte del Cretácico (Etayo-Serna et al., 1976; Cáceres et al., 2005). Los restos fósiles se encontraron en una capa de limolita calcárea fósil que buza hacia el sureste con una inclinación menor a 5°. Esta capa hace parte de la unidad denominada Nivel de Lutitas y Arenas, de edad Campaniano (de Porta, 1965; Montes

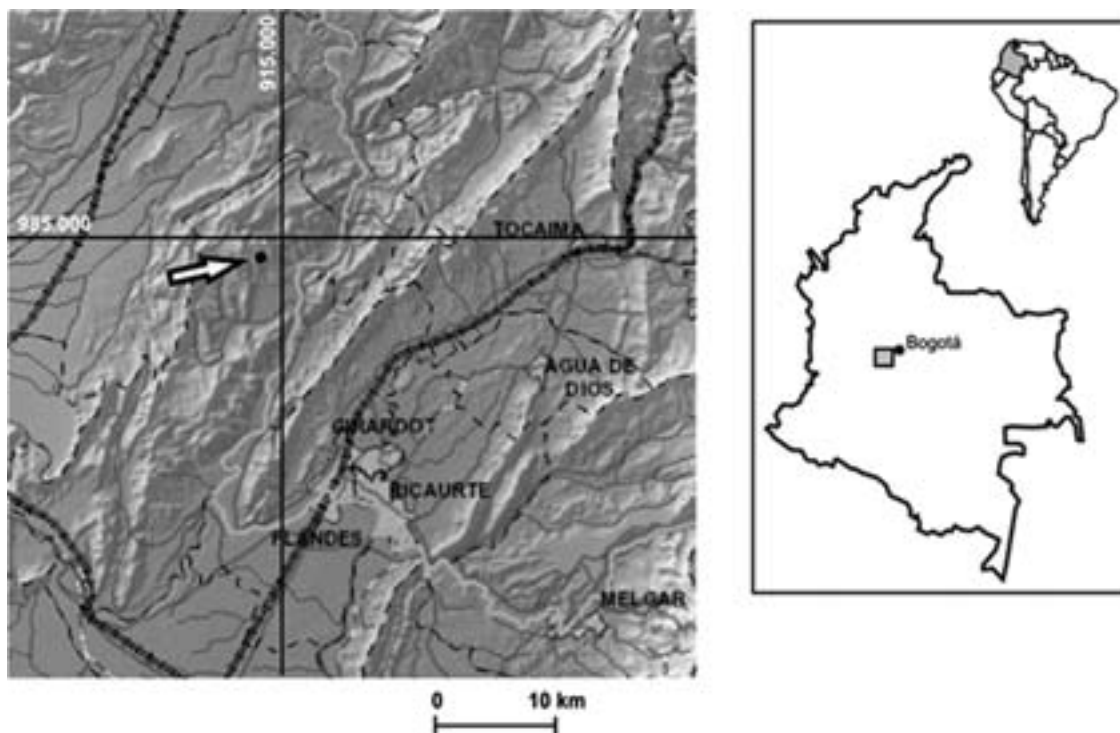


Figura 1. Localización geográfica del sitio de hallazgo. Adaptado de IGAC, mapa de cartografía básica con relieve, escala 1:500.000 (<http://mapascolombia.igac.gov.co/wps/portal/mapasdecolombia>)

et al., 2005). La unidad fue definida por de Porta (1965) en la sección Piedras-La Tabla, en la misma región en la que se encontró el mosasaurio (fig. 1). El autor la define como un conjunto de lutitas que alternan con bancos de arenitas y que hacia el techo presenta concreciones calcáreas de hasta 1 m de diámetro. En la cartografía del Servicio Geológico Colombiano (anteriormente INGEOMINAS) la unidad se describe con base en una sección medida al occidente de la población de Coello, a unos 18 kilómetros al sur del lugar de hallazgo del mosasaurio, como una secuencia alternante de lodolitas y limolitas calcáreas con paquetes de arenitas de cuarzo y cemento calcáreo en su parte media (Acosta et al., 2002). En el segmento superior, mencionan los autores, las lodolitas y limolitas muestran fisilidad. Es en este segmento en el que se encontró el fósil en estudio. Las características litológicas de esta unidad apuntan a un ambiente de plataforma clástica y calcárea. En la región del hallazgo la distribución litofacial sugiere una plataforma intermedia, somera y de aguas calmas.

En la capa en que se encontró el mosasaurio no se hallaron amonitas. Sin embargo, en la misma zona y en capas correspondientes a la parte superior de la unidad infrayacente (Lidita Superior del Grupo Olini) (fig. 2) se encontraron amonitas correspondientes a *Reginaites* sp. aff. *leei* (Reside)

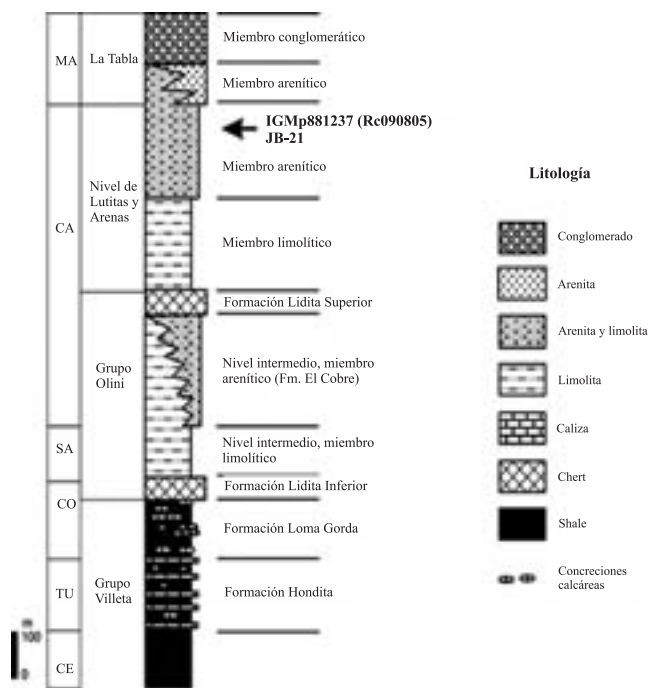


Figura 2. Procedencia estratigráfica del fósil. Columna estratigráfica adaptada y modificada de Montes et al., 2005.

(según identificación de Etayo-Serna, comunicación verbal en **Montes et al.**, 2005, muestra 10). Así mismo, en la misma zona, en los niveles arenosos de la parte superior del Nivel de Lutitas y Arenas se ha registrado la aparición de amonitas correspondientes a *Exiteloceras* cf. *jennyi* (Whitfield) (según identificación de Etayo-Serna, comunicación verbal en **Montes et al.**, 2005, muestra 11 y según identificación de Etayo-Serna para este trabajo, muestra JB-21). De acuerdo con la posición estratigráfica de estas amonitas, la edad de las capas portadoras del mosasaurio se establece como Campaniano (**Montes et al.**, 2005; **Etayo-Serna**, comunicación verbal).

La región corresponde a una zona tectónicamente compleja (**Acosta et al.**, 2002; **Montes et al.**, 2005), con una densa distribución de pliegues y fallas de tendencia noreste-suroeste que evidencian el alto grado de deformación sufrido por los sedimentos durante finales del Cretácico y Cenozoico y que se relacionan con la actividad tectónica del extremo noroccidental de Suramérica (**Montes et al.**, 2005). El esqueleto se encontró con la columna vertebral orientada en dirección Este-Oeste y muestra una deformación que se ajusta al análisis de esfuerzos que **Montes et al.** (2005) proponen para la zona. De esta forma, la distorsión que presentan los restos fósiles del mosasaurio estudiado corresponde probablemente a deformación post-fosilización, producida por los esfuerzos tectónicos que afectaron la región.

Conservación del fósil

Los huesos del esqueleto del espécimen se encuentran en posición boca abajo, con los miembros en posición relajada y extendidos hacia atrás (fig. 3). Aunque el cráneo está articulado, se evidencia una dislocación ocurrida por gravedad antes de la fosilización, que produjo un giro del cráneo hacia el costado izquierdo, desplazándolo levemente de su posición original con relación a las ramas mandibulares y produciendo torsión en la región posterior. Un corte transversal realizado en la parte anterior del rostro permitió corroborar esta dislocación, mostrando los huesos del paladar desplazados hacia la cavidad bucal (fig. 6D). La columna vertebral presenta también inclinación hacia el costado izquierdo. Dada esta inclinación, los miembros izquierdos, junto con sus correspondientes huesos de las cinturas se hallan parcialmente cubiertos por las vértebras, mientras que los derechos están completamente expuestos. Todas las vértebras articuladas se observan en vista lateral derecha, aunque las cervicales se encuentran ligeramente expuestas dorsalmente. Las costillas del costado derecho se conservan debidamente articuladas mientras que las del lado izquierdo se ven desviadas de su posición original y cubiertas por las vértebras.

Los huesos del espécimen muestran deformación. En el cráneo se evidencia deformación bidireccional y aplastamiento, de tal forma que su costado derecho se encuentra más expuesto y ligeramente desplazado hacia atrás con relación a su lado izquierdo. Su geometría sugiere la acción de fuerzas de compresión perpendicular a la laminación de la roca con componentes horizontales en dos direcciones. Aunque el cráneo muestra conservación tridimensional, el aplastamiento ha dejado el costado derecho expuesto en una vista latero-dorsal mientras el costado izquierdo sólo se aprecia parcialmente en vista dorsal o dorso-medial. Por esta razón las descripciones del cráneo se refieren mayormente a la vista dorsal y lateral de los huesos del costado derecho.

Es interesante destacar que el esqueleto no se encuentra extendido en posición completamente paralela a la laminación. La forma en que la laminación de la roca se ve interrumpida por los huesos indica que el eje sagital del esqueleto está más elevado anteriormente. El cráneo muestra con mayor evidencia esta relación oblicua con respecto a la laminación. En un corte transversal hecho en la parte anterior del hocico se aprecia la laminación curvada, contorneando los restos óseos (fig. 6D). En la cavidad bucal y en las demás cavidades del cráneo la roca presenta color y textura diferentes, no está laminada y su dureza es superior a la de la roca circundante.

En el proceso de preparación se hizo notable una diferencia de preservación en los huesos del cráneo. En las superficies dorso-laterales derechas los huesos tienen una densa red de fisuras que les confiere mayor fragilidad al momento de prepararlos. En contraste, ventralmente los huesos conservan una superficie más homogénea y resistente. La diferencia se aprecia incluso en un mismo hueso, por ejemplo en el maxilar y en la rama mandibular derechos. En el corte transversal de la parte anterior del hocico se ve claramente este contraste (fig. 6D).

Inmediatamente por debajo de la columna vertebral, entre la vértebra dorsal 17 y la segunda pigal, se encuentra una serie, de 25 cm de largo, de centros vertebrales pequeños, relativamente articulados, que miden entre 0,9 y 1,2 cm de largo (fig. 4). Se encuentran exhibidos 20 de estos centros vertebrales en los espacios intercostales. La serie se dispone paralela a la columna vertebral del espécimen excepto en su sección posterior, entre las dos vértebras pigales, en donde se observan vértebras ubicadas en sentido perpendicular, dirigidas ventralmente. El tamaño de los pequeños centros vertebrales es regular aunque se percibe un ligero aumento de tamaño en los de la parte anterior del espécimen. En ninguna de estas pequeñas vértebras se aprecian apófisis. Se observa claramente que la superficie articular que se dirige hacia la parte posterior del espécimen es cóncava y en algu-

nas se insinúa la del extremo opuesto ligeramente convexa. Algunos de estos pequeños centros vertebrales se hacen levemente más anchos hacia el lado en que se encuentra la superficie articular cóncava, lo cual evoca la morfología de las vértebras procélicas de los mosasauroides (integrantes del clado Mosasauroidea). De esta manera la serie vertebral pequeña está orientada con su parte anterior dirigida en la dirección posterior del espécimen. La superficie de estos centros vertebrales es relativamente lisa aunque en los posteriores de la serie se insinúan crestas longitudinales separando depresiones. Por detrás de esta serie de centros vertebrales se encuentran, bajo las vértebras dorsales 14 y 15 del espécimen, algunos huesos no identificables, que por su tamaño parecen relacionados con la pequeña serie vertebral descrita. Igualmente asociado a este pequeño esqueleto se encuentra un hueso aplanado junto a los pequeños centros vertebrales posteriores. Las características descritas sugieren que estos pequeños restos esqueléticos pertenecieron a un embrión. Además, por delante de la cintura pélvica del espécimen se observa una aglomeración desordenada de restos óseos pequeños entre los cuales se insinúa un gran número de centros vertebrales en cortas series semi-articuladas (fig. 5). La mayoría de estas vértebras está expuesta en corte lon-

gitudinal y, aunque su morfología no es precisa, no presentan la forma bicóncava típica de las vértebras de peces. Se destaca una fila de tres vértebras caudales, con arcos hemales y centros procélicos, lo cual apoya la idea de la presencia de restos de embriones. Sin embargo, no se ha detectado hasta el momento restos que pertenezcan claramente a elementos esqueléticos diagnósticos, como cráneo o dientes, por lo cual no se puede establecer con seguridad si los restos vertebrales pequeños asociados al espécimen corresponden a vestigios de embriones.

La ovoviviparidad es conocida en escamados actuales y ha sido reportada en mosasauroides (Bell et al., 1996; Caldwell y Lee, 2001; Bell y Sheldon, 2004; Houssaye & Bardet, 2013). Sin embargo, sólo en un par de publicaciones se establece una relación de restos de adultos con embriones. Bell et al. (1996) dan a conocer la presencia de restos desarticulados de dos embriones asociados a huesos de la región sacra de un espécimen del mosasaurio *Plioplatecarpus primaevus*. Los autores basan su interpretación en la identificación de dos espleniales izquierdos. Caldwell y Lee (2001) describen un espécimen articulado de una hembra de un mosasaurio primitivo, identificado como un aigialosaurio del género

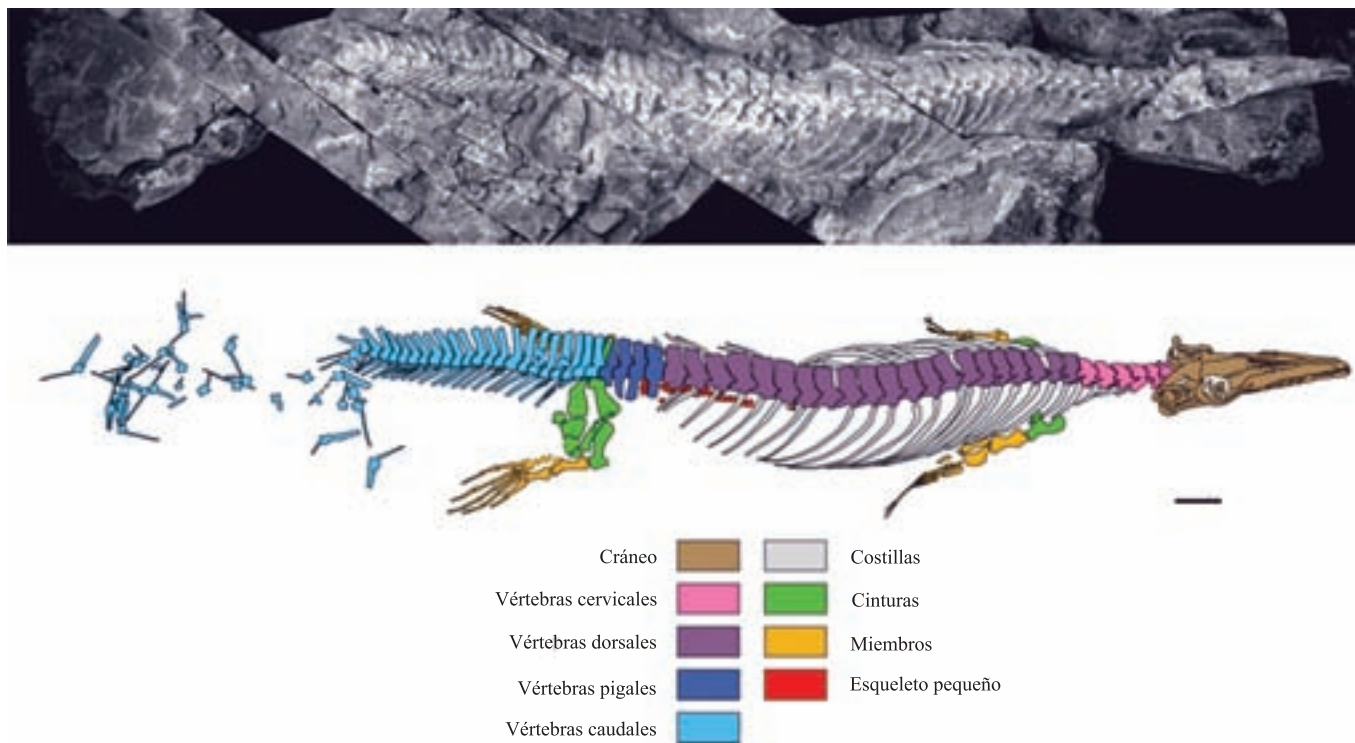


Figura 3. *Eonator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Fotografía general del fósil y esquema interpretativo.

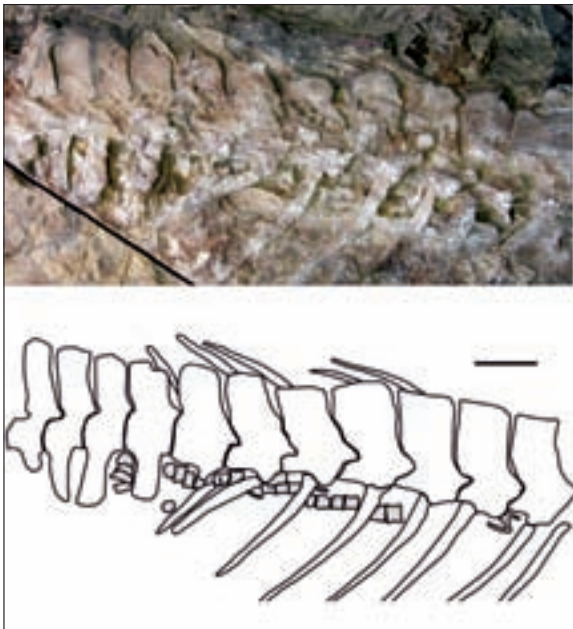


Figura 4. *Eonatator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Restos óseos pequeños encontrados bajo las vértebras dorsales posteriores y las vértebras pigales del espécimen. Fotografía y esquema interpretativo. Barra de escala: 5 cm



Figura 5. *Eonatator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Restos óseos de pequeño tamaño conservados en la región anterior a la cintura pélvica y entre las costillas posteriores. Barra de escala: 10 cm.

Carsosaurus, que contiene cuatro embriones, parcialmente desarticulados, distribuidos en los dos tercios posteriores de la región dorsal del espécimen. Las evidencias descritas en estas publicaciones se basan en la presencia de material diagnóstico.

Consideraciones tafonómicas

En este aparte se analizan algunos aspectos relacionados con la historia tafonómica del espécimen. Se han considerado los siguientes aspectos: la posición y el grado de articulación de los huesos que conforman el esqueleto; la conservación de restos de tejidos en las cavidades internas del esqueleto; la relación geométrica entre la laminación de la roca portadora del fósil y la posición del esqueleto; las diferencias texturales que presenta la roca en las proximidades de los huesos; la conservación variable que presentan algunas superficies de los huesos; y la deformación que se aprecia en la geometría de los huesos.

La conservación de tejidos blandos se manifiesta en la presencia de manchas fosfáticas, de color comparable al de los huesos, no calcáreas y de textura diferenciable, que se encuentran ubicadas en las cavidades torácica y abdominal. Se observan manchas de estas, con una coloración uniforme, una textura densa y cubriendo superficies definidas, en la posición correspondiente a los pulmones y al hígado y, algo más atrás, en la posición del páncreas o de los riñones y las gónadas (Kardong, 2012). Cerca de la columna vertebral, en posición ventral a ésta y medial a las costillas, se observan manchas con textura fibrosa en dirección longitudinal, que sugieren la preservación de fibras musculares correspondientes al sistema muscular hipoaxial, probablemente a músculos intercostales dorsales (Kardong, 2012). En posición ventral a las vértebras cervicales y con una textura menos densa, se encuentra una de estas manchas, cuya ubicación sugiere la conservación de la piel de la zona ventral del cuello. En la observación directa de esta mancha no se aprecian escamas. Lo anteriormente descrito es evidencia de la preservación de tejidos blandos en el espécimen.

Por delante de la cintura pélvica se conserva una densa concentración de pequeñas manchas y restos óseos indeterminables, desordenados, desarticulados o parcialmente articulados que sugieren la preservación de restos semi-descompuestos. La morfología de restos vertebrales identificables en esta región, junto con la presencia y morfología de la serie de vértebras pequeñas conservada longitudinalmente por debajo de las vértebras del espécimen, permite proponer que los elementos que se encuentran en esta región pertenecen a restos de embriones. No obstante, la falta de elementos diagnósticos abre también la posibilidad de que se trate de material en digestión.

Durante el proceso de preparación se pudo percibir una mayor dureza de la roca en zonas correspondientes a cavidades internas, como las de las órbitas, las comprendidas entre las ventanas temporales, o la cavidad bucal, al igual que en algunas franjas próximas a los huesos, en donde la extracción mecánica de roca resultó más difícil. En estas partes, la roca presentó con una coloración ligeramente más clara y sin laminación (véase fig. 6D). Estas condiciones reflejan una diferencia textural y composicional de la roca en lugares en los que se encontraban tejidos blandos y sugieren que una lenta descomposición y rápida mineralización de estos tejidos, obstaculizó el depósito de sedimentos en los lugares que ellos ocupaban.

La conservación de tejidos y otros restos, anteriormente descrita, junto con el excelente grado de articulación que muestra el esqueleto y las diferencias texturales que muestra la roca en las proximidades de los huesos, sugieren que el cadáver del mosasaurio se depositó en un ambiente de baja energía y de baja actividad biológica, que refrenó los procesos de descomposición y favoreció la mineralización temprana por fosfatización. Estas condiciones apuntan a un ambiente de depósito restringido, relativamente quieto, anóxico y con alta concentración de fosfatos. De otra parte, la condición desarticulada del extremo posterior de la cola, con las vértebras desplazadas de su posición original, sugiere la presencia de leves corrientes locales, de energía limitada pero suficiente para movilizar pequeños huesos de peso ligero y débilmente articulados como es el caso de las vértebras caudales más posteriores.

La disposición de los huesos, con el esqueleto en posición predominante boca abajo y parcialmente girado hacia el costado izquierdo, permite inferir que el cadáver quedó inicialmente depositado con el vientre hacia abajo, lo cual sugiere que no hubo inversión del cuerpo por flotación previa debida a la acumulación de gases de descomposición en el vientre. Esta condición permite proponer que el cuerpo del animal quedó inicialmente varado boca abajo en un fondo poco profundo. Posteriormente, cuando los tejidos blandos se encontraban semi-descompuestos, el esqueleto axial se volcó por gravedad hacia el costado izquierdo, produciendo un leve giro del cráneo. Teniendo en cuenta que la posición del cráneo no se encuentra con el eje sagital paralelo a la laminación de la roca, se plantea la posibilidad de que la cabeza permaneciera ligeramente levantada en su parte anterior durante el enterramiento.

La calidad de la preservación de los huesos del cráneo muestra diferencias entre las superficies dorso-laterales, con denso fisuramiento, y las superficies ventrales mejor preservadas. Esta circunstancia permite inferir que los restos del mosasaurio

saurio sufrieron un enterramiento progresivo en un fondo lodoso, que permitió una mejor preservación de los huesos que quedaron en posición más profunda, sumergidos en el sedimento desde el inicio del enterramiento y una alteración superficial de los restos que permanecieron descubiertos de lodo un mayor tiempo.

La deformación por compresión que se evidencia en la geometría de los huesos, principalmente en los del cráneo, sugiere que los restos se vieron sometidos a presión vertical y horizontal, esta última en dos direcciones. Las componentes de deformación horizontal coinciden con las fuerzas tectónicas que afectaron la región. De esta manera, la deformación que exhibe el fósil permite inferir que, después de acomodarse por gravedad, el esqueleto sufrió la acción de la presión lito-estratigráfica y de las fuerzas compresivas regionales.

Sistemática

REPTILIA Linnaeus, 1758

SQUAMATA Oppel, 1811

MOSASAUROIDEA Camp, 1923

MOSASAURIDAE Gervais, 1853

HALISAURINAE Bardet y Pereda Suberbiola, 2005

Eonatator Bardet y Pereda Suberbiola, 2005

Diagnosis enmendada: Halisaurinae de cráneo alargado; frontal sin área triangular postero-medial diferenciada; márgenes laterales del frontal cóncavos; parietal corto, con un área triangular anterior definida y posteriormente extendida hasta o cerca del borde posterior medial del parietal; nasales ampliamente extendidos en la barra internarinal; cuadrado redondeado con ala timpánica regularmente convexa; borde postero-lateral de la fosa glenoidea mandibular con protuberancia leve; longitud de la cola menor que la longitud del tronco y la cabeza juntos; cuatro vértebras pigales; cuerpos vertebrales caudales más largos que altos; tubérculo del isquion medianamente desarrollado y de posición distal; cóndilos de los propodios esféricos; largo del femur equivalente a cerca del doble de su ancho distal; largo del húmero equivalente a entre 2,2 y 2,5 veces su ancho distal; dígitos sin hiper-falangia.

Eonatator coellensis sp. nov

Holotipo: RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237), Cráneo y esqueleto casi completo, sin el extremo posterior de la cola. Colecciones paleontológicas del Museo Geológico José Royo y Gómez del Servicio Geológico Colombiano (anteriormente INGEOMINAS), Colombia.

Etimología: *coellensis* de Coello, municipio en el que fue hallado el ejemplar.

Diagnosis: *Eonator* con narinas en posición retraída (las reconstrucciones de *E. sternbergii* muestran las narinas en una posición más avanzada en relación con el extremo anterior del maxilar y la sutura fronto-parietal), ubicadas entre el séptimo y diecisieteavo dientes maxilares y de forma bilobulada, siendo el lóbulo anterior ligeramente más ancho que el posterior; premaxilar y dentarios con corto rostro anterior a los primeros dientes; septomaxilares presentes; prefrontal con amplia participación en el borde posterior de la narina externa, formando todo el borde lateral del lóbulo posterior de ésta; frontal corto y ancho, con una marcada cresta medial en casi toda su longitud (en *E. sternbergii* el frontal es largo y angosto y la cresta dorsal se extiende en los 2/3 anteriores de su superficie dorsal); foramen parietal ubicado cerca de la sutura fronto-parietal (en *E. sternbergii* el foramen parietal se ubica a una distancia igual a dos veces su diámetro); superficie triangular anterior del parietal portando dos depresiones mediales (la superficie triangular del parietal de *E. sternbergii* lleva una depresión longitudinal angosta anterior y posterior al foramen parietal); 21 vértebras dorsales (mínimo 22 en *E. sternbergii*).

Procedencia geográfica: Quebrada El Cajón, Vega de los Padres, Municipio de Coello, Tolima, Colombia (fig. 1).

Posición litoestratigráfica y cronoestratigráfica: Unidad geológica denominada Nivel de Lutitas y Arenas (de Porta, 1965; Montes et al., 2005.), piso Campaniano (Etayo-Serna en Montes et al., 2005 y Etayo-Serna, comunicación verbal) (fig. 2).

Descripción

Se trata de un esqueleto casi completo, al cual sólo le falta el extremo posterior de la cola (fig. 3). Se conservó articulado, excepto en el extremo posterior en donde varias de las vértebras caudales conservadas se encuentran desarticuladas y desplazadas de su posición original. La longitud del fósil, medida desde el extremo anterior del hocico hasta la vértebra caudal 21, última articulada, es de 2,8 m, siendo el cráneo de 41,5 cm de largo. Se han conservado restos de tejidos dentro de las cavidades torácica y abdominal y en la región del cuello. Todos los huesos y restos de tejidos son de un color crema-rosa que contrasta con el gris oscuro de la roca, por lo que sus contornos son claramente diferenciables.

Cráneo (Figs. 6 y 7)

El cráneo es alargado y presenta una región parietal relativamente corta, la cual corresponde a 0,21 (prácticamente una quinta parte) de la longitud total del cráneo. Las narinas tienen una posición retraída siendo la longitud del rostro an-

terior a éstas equivalente a 0,26 (algo más de una cuarta parte) del largo total del cráneo. Las narinas externas se extienden entre el séptimo y el diecisieteavo diente maxilar. Son alargadas, bilobuladas, acuminadas adelante y redondeadas atrás, ligeramente más anchas en los lóbulos anteriores (fig. 7).

El premaxilar exhibe una superficie dorsal anterior corta y un proceso inter-maxilar largo. Su borde anterior, redondeado, proyecta medialmente un ligero rostro anterior a los dientes que le produce, en vista dorsal, un contorno suavemente anguloso. Dorsalmente forma hacia atrás una barra medial relativamente ancha, de bordes paralelos, que se extiende entre los maxilares por un considerable tramo. En el borde anterior de las narinas externas esta barra se estrecha rápidamente, forma sólo el primer cuarto anterior de la barra internarinal y termina en un vértice que contacta los nasales. En vista lateral, la sutura pmx-mx dibuja una línea que inicia anteriormente en posición vertical por un corto tramo, se arquea hacia atrás en una curva amplia y continúa horizontal hasta el vértice anterior de la narina externa. La superficie anterior dorsal del premaxilar tiene tres pares de forámenes. Los forámenes anteriores son más grandes que los posteriores.

Cada maxilar es largo y estrecho. El derecho lleva 20 alveolos y ha conservado 15 dientes. En la superficie del corte hecho en la parte anterior del hocico se observa que el borde del parapeto interno que bordea a los alveolos es ligeramente más corto que el borde lateral del maxilar. El maxilar forma el borde antero-lateral del lóbulo anterior de la narina externa. Posteriormente se separa de ésta formando la sutura con el prefrontal que sigue un recorrido prácticamente paralelo al eje sagital adelante y atrás se abre diagonalmente hasta encontrar el lagrimal. El límite posterior del maxilar no se puede determinar con claridad porque está extensamente cubierto por el extremo anterior del yugal.

Apoyados sobre la superficie medial de los maxilares, en la región anterior interna de las narinas, se observan los septomaxilares como delgadas láminas que se extienden medialmente en contacto con la barra internarinal del premaxilar adelante y con los nasales atrás. En las superficies del corte transversal del hocico se ven los septomaxilares en la cavidad oral, el izquierdo entre el premaxilar y el maxilar y su par, más bajo, desplazado medioventralmente por gravedad. Aquí los septomaxilares muestran mayor volumen, se presentan como una barra de sección poligonal.

Los nasales son grandes, alargados y forman la mayor parte de la barra internarinal. En vista dorsal se encuentran anteriormente unidos y, en su región posterior separados en la línea media por una prolongación anterior del frontal. Se extienden más atrás del borde posterior de las narinas exter-

nas, formando un corto proceso dorsal a los lados de la barra media del frontal.

El frontal es relativamente corto y ancho. Lleva una pronunciada cresta dorsal, aplastada hacia el costado izquierdo por deformación, que se extiende en casi la totalidad de la superficie dorsal del hueso. Se pierde adelante formando una estrecha barra entre los nasales y atrás se atenúa insinuando, muy ligeramente, un ensanchamiento posterior en la línea media que sugiere el desarrollo de una corta superficie triangular aunque no claramente diferenciable. El frontal forma una pequeña porción del borde posterior de las narinas externas. Desde este borde, su límite se proyecta, a cada lado, diagonalmente hacia atrás en contacto con el prefrontal hasta alcanzar el borde antero-dorsal de la órbita. En vista dorsal se observa levemente recortado sobre las órbitas. En vista lateral se percibe que los extremos del prefrontal y del postorbitofrontal no están en contacto por debajo del frontal. La sutura fronto-parietal es uniforme, ligeramente ondulada y se extiende en todo el ancho del frontal.

Los prefrontales son alargados, se extienden considerablemente hacia adelante, formando más de la tercera parte del borde lateral de la narina externa. Muestran una cresta longitudinal que se hace más evidente adelante, en la región cercana a la narina y atrás, en el borde de la órbita, en donde forma un pequeño proceso supraorbital. En vista dorsal participan ampliamente en el borde anterior de la órbita y muy poco en el borde dorsal de la misma. Medialmente se extienden por debajo del frontal formando una lámina post-narinal

El lagrimal forma el borde antero-ventral de la órbita y se extiende hacia adelante entre el maxilar y el prefrontal formando un agudo vértice en dirección dorso-medial. Su porción ventral está ampliamente cubierta por el yugal. Este último es angosto y muy extendido hacia adelante. Su forma es suavemente arqueada, no presenta proceso postero-ventral y su proceso dorsal es corto, mientras su rama horizontal se extiende considerablemente hacia adelante pasando sobre el lagrimal y cubriendo el maxilar.

El parietal es corto. Aunque se encuentra distorsionado y fuertemente fracturado en su superficie dorsal, se percibe en su morfología la presencia de una tabla triangular anterior claramente diferenciada, protuberante y elevada, cuyo vértice posterior no se cierra. Ligeramente por debajo de este vértice y por encima de las ramas suspensorias dicha tabla se proyecta posteriormente formando una estrecha superficie bifurcada atrás. La superficie de la tabla triangular anterior muestra irregularidades que representan un par de hundimientos mediales bordeados lateralmente por suaves crestas y separados en la línea media por otra suave cresta. Por delante de la cresta medial se ubica una oquedad que

probablemente alberga un pequeño foramen parietal, el cual no es claramente visible. Antero-lateralmente el parietal se proyecta formando a cada lado un ala redondeada que se articula con el postorbitofrontal. Lateralmente y ligeramente por debajo de la prolongación posterior de la tabla triangular se extienden las ramas suspensorias, las cuales son cortas y comprimidas en sentido latero-dorsal. Pese a la deformación se puede deducir que su contacto con el supratemporal es amplio y de posición vertical.

El postorbitofrontal muestra un considerable desarrollo del proceso ventral. A pesar de la deformación y dislocación se puede inferir que en su posición original el proceso ventral cubría ampliamente al yugal en su porción dorsal. Hacia atrás el postorbitofrontal se prolonga contactando internamente una gran parte del escamoso pero sin alcanzar el borde posterior de la ventana temporal.

En el costado izquierdo se aprecia el supratemporal separado del escamoso, ubicado en posición ligeramente elevada contra la rama suspensoria del parietal. Su forma es semicircular comprimida. En el costado derecho se ve, por debajo del escamoso y detrás del cuadrado, un fragmento de la superficie lateral del supratemporal, con su borde posterior convexo. La posición en que se encuentran los supratemporales sugiere una articulación estrecha de estos huesos con los parietales y suelta con los escamosos. Estos últimos muestran una forma de coma, regularmente curvada. Su relación articular con los supratemporales y con las ramas suspensorias del parietal no se puede establecer con precisión debido a la deformación y dislocación de los huesos en esta región.

No se observa ninguno de los huesos occipitales. En el costado derecho, entre la rama descendente del postorbitofrontal y el cuadrado, están expuestas las superficies laterales de una porción del proceso posterior del proótico y de una parte del proceso postero-lateral del pterigoides.

El cuadrado derecho se ve en vista lateral, articulado con el escamoso y la mandíbula, mientras que el cuadrado izquierdo, que está separado del escamoso, sólo exhibe una porción en vista medial. Al parecer el cuadrado derecho está aplastado y su morfología algo distorsionada (fig. 6C). Sin embargo, es seguro que los procesos supra e infrastapedial están muy desarrollados y en contacto, cerrando la cavidad timpánica. Dentro de esta cavidad se han conservado un huesecillo que podría corresponder a la extracolumella o a la columela y, distalmente a ésta, restos de la membrana timpánica. Al parecer la cresta timpánica está aplastada de tal manera que se encuentra desplazada hacia la cresta alar. Esta última se expresa medialmente como un saliente anterior, de forma circular, aplastado contra el proótico y la rama postero-lateral del pterigoides.

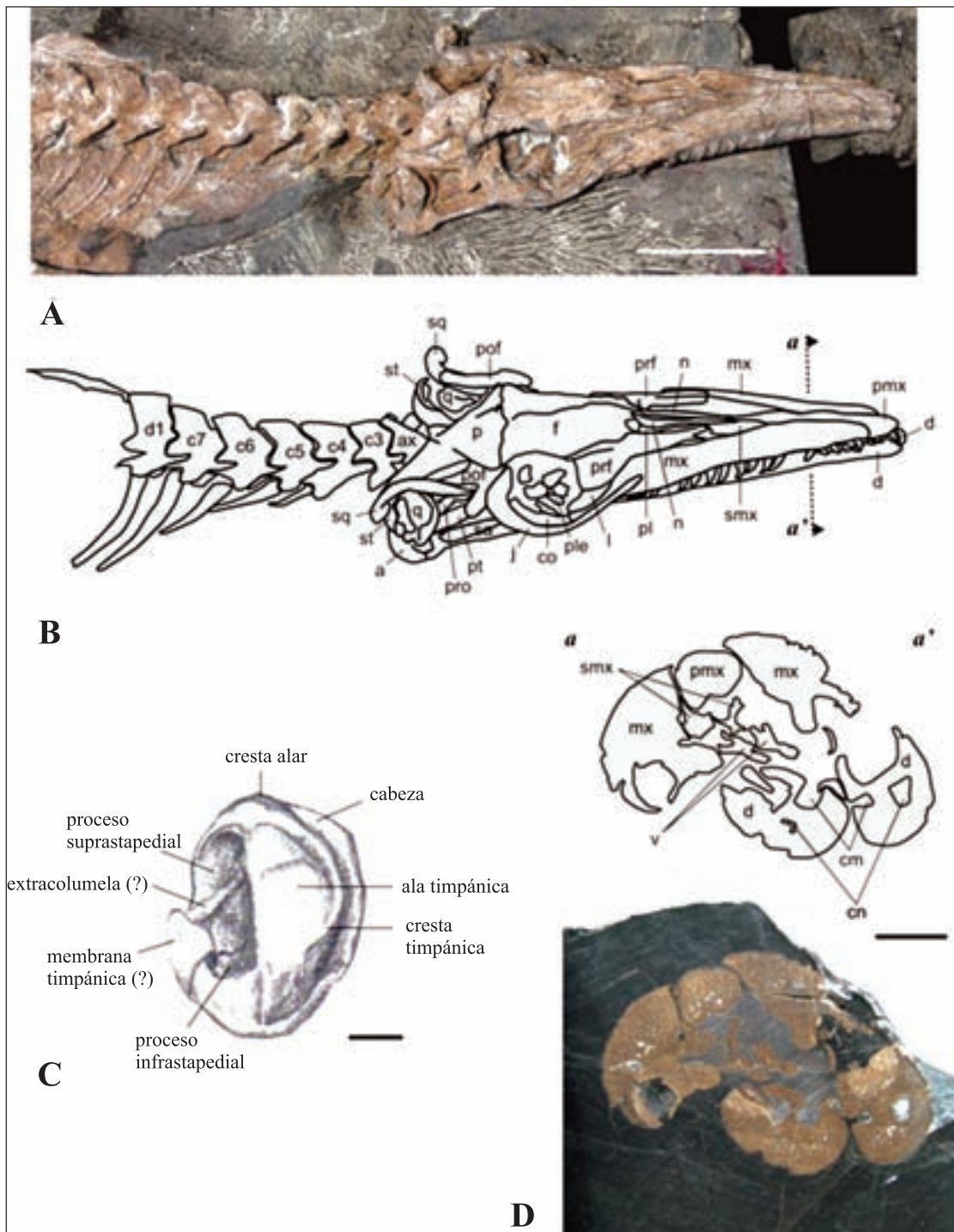


Figura 6. *Eonator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Cráneo y vértebras cervicales. A y B: fotografía y esquema interpretativo; C: Cuadrado derecho, vista exhibida; D y E: Fotografía y esquema interpretativo del corte transversal *a-a'* indicado en B. Barras de escala: 10 cm en A y B; 1 cm en C y D. **Abreviaturas:** ax: axis; c3-7: vértebras cervicales; cm: canal mandibular; cn: canal nervioso de la mandíbula; co: coronoides; d1-2: vértebras dorsales; d: dentario; f: frontal; j: yugal; l: lagrimal; mx: maxilar; n: nasal; p: parietal; pl: palatino; ple: placas escleróticas; pmx: premaxilar; pof: postorbitofrontal; prf: prefrontal; pro: proótico; pt: pterigoides; q: cuadrado; sa: surangular; smx: septomaxilar; sq: escamoso; st: supratemporal; v: vómer.

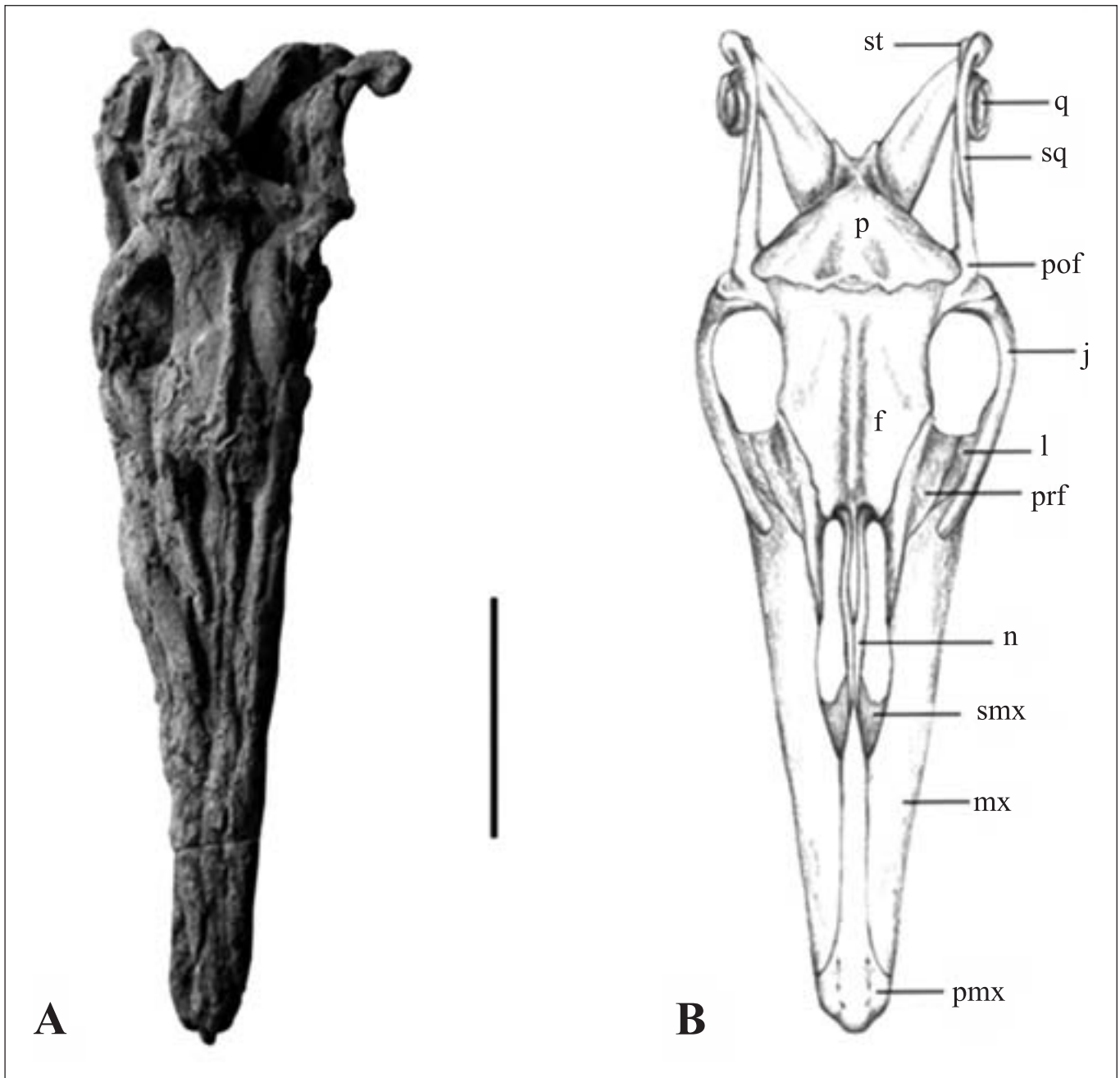


Figura 7. *Eonatator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Cráneo. A: Vista dorsal. B: Reconstrucción en vista dorsal. Barra de escala: 10 cm. Abreviaturas: **f**: frontal; **j**: yugal; **l**: lagrimal; **mx**: maxilar; **n**: nasal; **p**: parietal; **pmx**: premaxilar; **pof**: postorbitofrontal; **prf**: prefrontal; **q**: cuadrado; **smx**: septomaxilar; **sq**: escamoso; **st**: supratemporal.

De los huesos del paladar sólo se aprecia una pequeña porción del palatino derecho, expuesto en el interior de la narina por debajo del nasal, y los vómeres, expuestos en sección en el corte transversal del hocico. Estos últimos se encuentran

en medio de la cavidad oral, desprendidos del paladar y desplazados hacia la mandíbula derecha. Su sección los muestra latero-medialmente comprimidos y dorsalmente curvados y bifurcados, formando dos crestas dorso-laterales (fig. 6D).

En la órbita derecha se aprecian claramente restos del anillo esclerótico. Se ven restos de seis placas escleróticas desarticuladas.

La rama mandibular derecha está exhibida por partes. Adelante se observa la porción anterior del dentario en vista lateral, en la órbita se ve el coronoides expuesto parcialmente y detrás de ésta se presentan varios huesos posteriores en vista dorsal. Esta disposición coincide con la deformación por torsión que parece haber afectado la parte posterior del cráneo. De la rama mandibular izquierda sólo se aprecia el extremo anterior del dentario. Los dentarios muestran una corta proyección anterior al primer alveolo. La superficie lateral del dentario es longitudinalmente estriada y exhibe una marcada fila lateral de forámenes alargados que corresponden a las salidas del nervio V. Sólo se ven tres dientes anteriores del dentario derecho.

En las superficies del corte transversal realizado en la región anterior del hocico (fig. 6D), se puede apreciar con claridad, en el dentario izquierdo, dos pequeñas hendiduras laterales, una correspondiente a la fila de forámenes que se observa lateralmente en el dentario derecho y otra más, debajo de ésta, que evidencia la presencia de otra fila de forámenes en esta región. Se observa igualmente el canal nervioso que atraviesa longitudinalmente al dentario. En el derecho este canal se encuentra casi cerrado. La superficie lateral del dentario es convexa y la medial lo es en menor grado. Esta última está fuertemente disectada por el canal mandibular, el cual se encuentra más estrecho en el dentario izquierdo. También en el corte se ve claramente que el parapeto que bordea lingualmente los alveolos es más bajo que la pared lateral del dentario.

Del coronoides, cubierto por el yugal, no se alcanza a ver más que su porción posterior dorsal fracturada. Por detrás del yugal está expuesta la región posterior dorsal de la rama mandibular. Se distinguen un segmento posterior del surangular, una parte de la superficie medial del prearticular y la región dorsal del articular. El surangular lleva una marcada cresta en su borde dorso-lateral que se curva medialmente atrás formando una arista en el margen anterior de la fosa glenoidea, de la cual participa mínimamente. A pesar de que una parte de la fosa glenoidea está cubierta por el cuadrado, su parte expuesta muestra que está formada casi en su totalidad por el articular. Por detrás de la fosa glenoidea se exhibe la superficie dorsal del proceso retroarticular, amplia, aplanada y de contorno circular (en su porción visible) y separada de la fosa glenoidea por un abultamiento dorso-lateral.

Se observan del lado derecho un diente premaxilar, uno mandibular y los 15 maxilares que son los mejor expuestos. Su tamaño disminuye hacia atrás. Los dientes exhiben una

corona posteriormente curvada, de sección ovalada y con una ligera carena posterior en su extremo distal.

Esqueleto axial (Figs. 3, 4, 6A, B y 8)

La columna vertebral está expuesta en su mayoría en vista lateral. Las vértebras más anteriores se exhiben laterodorsalmente y las caudales en corte sagital. El atlas no está expuesto. Se observan el axis, otras 5 vértebras cervicales, 21 dorsales, 4 pigales y 58 caudales. De éstas últimas sólo las primeras 21 están articuladas. De acuerdo con la cantidad, la morfología y la longitud de las vértebras caudales desarticuladas conservadas, se estima que la cola fue de largo similar al tronco. El aplastamiento general del fósil ha deformado los centros vertebrales, por lo que la relación entre ancho y alto de los mismos no se puede establecer. La primera vértebra visible se considera el axis por su ubicación inmediatamente por debajo del extremo posterior medial del parietal y por presentar en su morfología la base del arco neural más larga que en las siguientes vértebras y su postzigapófisis más pequeña. No se observa ningún fragmento anterior que pueda relacionarse con el atlas.

Las primeras cinco vértebras posteriores al axis exhiben claramente un pedúnculo para la hipapófisis, el cual se encuentra ubicado en la región posterior ventral de cada cuerpo vertebral (figs. 6A y B). En todas estas vértebras la articulación pre-post zigapófisis dibuja lateralmente una línea horizontal. La sinapófisis, de posición anterior, es alargada ventralmente, parte desde la prezigapófisis, se dirige posteriormente formando una afilada cresta lateral y desciende sobrepasando notablemente el borde ventral del cuerpo vertebral. En las primeras vértebras cervicales la sinapófisis desciende en una magnitud equivalente a la de la altura de la espina neural, mientras que en las posteriores esta magnitud disminuye. La espina neural en las vértebras cervicales es más baja y más inclinada que en las dorsales. A pesar de la deformación por compresión, en las vértebras cervicales se marca una cresta longitudinal lateral en la base de la espina neural. Se observan costillas articuladas desde la segunda vértebra cervical posterior al axis, más cortas en las 2, 3 y 4. A los extremos distales de estas últimas costillas se asocian huesos de la cintura escapular.

En la serie dorsal las vértebras exhiben la espina neural proporcionalmente más alta que en la serie cervical. Las zigapófisis son menos pronunciadas que en las cervicales y las sinapófisis, aunque siguen en una posición baja, sobrepasan mínimamente el borde ventral del cuerpo vertebral, siempre en posición anterior. La cresta longitudinal de la base del arco neural se torna menos pronunciada en estas vértebras. Todas las vértebras dorsales llevan costillas articuladas.

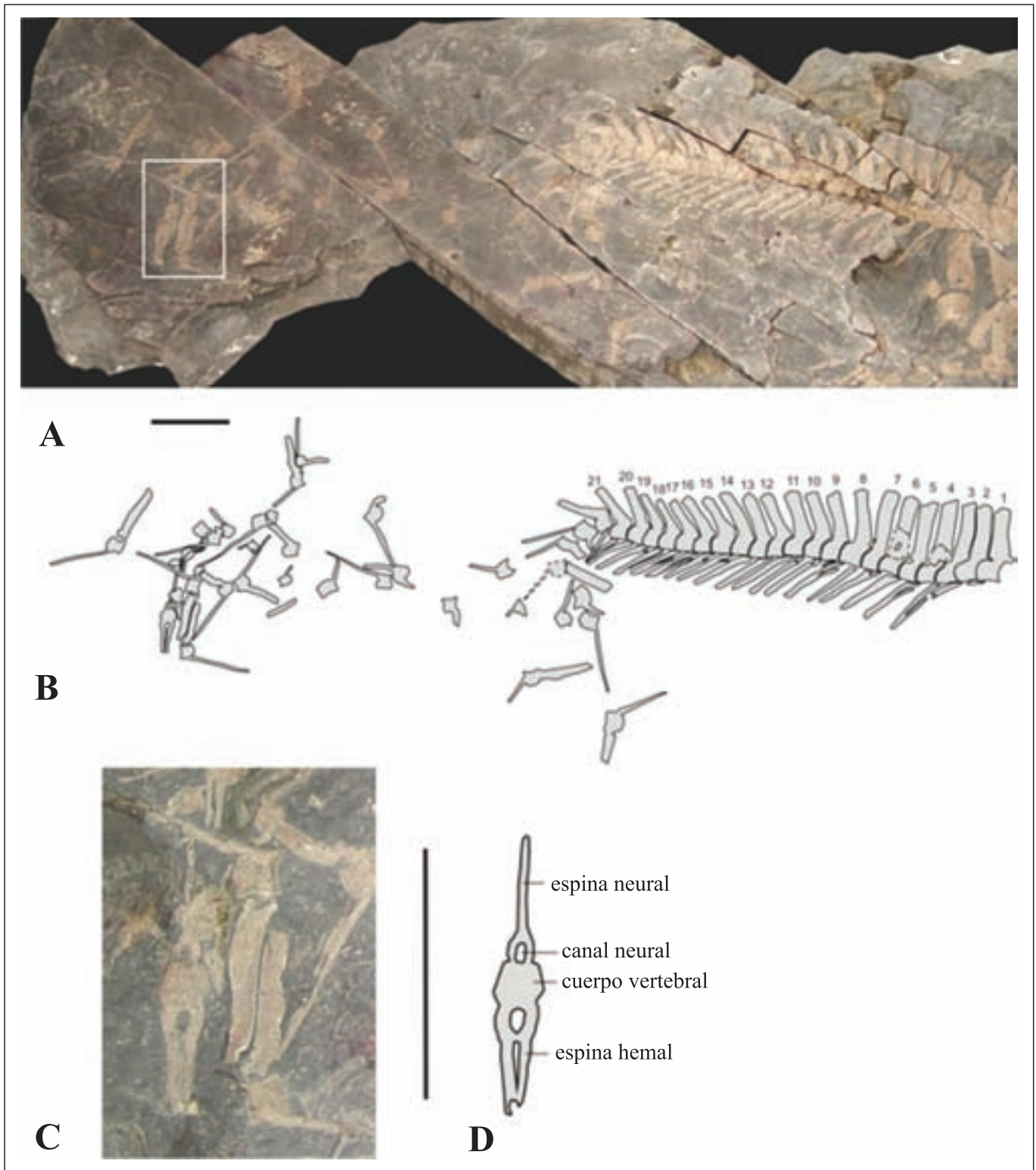


Figura 8. *Eonator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Vértebras caudales. A y B: fotografía y esquema interpretativo generales, las vértebras articuladas se han numerado; C: Detalle ampliado del área indicada en A con un rectángulo, en el que se observa una vértebra caudal terminal en sección transversal (esquemática en D). Barras de escala: 10 cm.

En las vértebras pigales (fig. 4), la espina neural es alta pero menos larga que en las dorsales. La sinapófisis está muy desarrollada en las primeras. En la segunda pigal la sinapófisis alcanza una longitud casi igual a la altura de la espina neural. En la cuarta no es claro el desarrollo de la sinapófisis debido a la compresión y a su posición coincidente con el extremo distal del pubis izquierdo. En esta región y en la caudal, el efecto de la erosión ha dejado expuestas las vértebras en corte, lo cual permite observar la articulación intervertebral procélica con la superficie articular ligeramente inclinada anterodorsalmente.

Las vértebras caudales (fig. 8) se observan en su mayoría seccionadas sagitalmente por la erosión. La primera no exhibe claramente los límites de su cuerpo vertebral, parece estar desplazada por los huesos de la cadera mostrándose muy unida a la segunda vértebra caudal. Las primeras 21 vértebras caudales están articuladas, las cuatro siguientes se encuentran desplazadas pero cercanas a su ubicación original. De éstas, las tres últimas presentan la espina neural dirigida en sentido opuesto. Las demás vértebras caudales se encuentran desarticuladas y desplazadas de su posición original. En las vértebras caudales la altura de la espina neural, con relación a la altura del centro vertebral, decrece inicialmente y a partir de la vértebra 18 (caudal) se hace mayor. En general los cuerpos vertebrales son más largos que altos, principalmente en las intermedias proximales, aunque en algunas posteriores desarticuladas, pero no las más pequeñas, esta proporción es opuesta. Las vértebras caudales tienen espinas neural y hemal bien desarrolladas y en su mayoría inclinadas posteriormente. La espina hemal se une bifurcada al extremo posterior del cuerpo vertebral. Se observa una vértebra caudal terminal en sección transversal que exhibe un contorno subhexagonal del cuerpo vertebral (Figs. 8C y D). Entre las vértebras desarticuladas se pueden identificar con claridad tres de ellas con la espina neural vertical, no inclinada hacia atrás como su espina hemal. Coincidentemente, la espina neural en estas vértebras es proporcionalmente más alta que en las demás vértebras caudales desarticuladas. La morfología de estas vértebras sugiere que la forma de la cola era más parecida a la de los mosasaurios que a la de los aigialosaurios.

Esqueleto apendicular (Figs. 9 y 10)

Los miembros se han conservado casi en su totalidad. Los dos izquierdos se encuentran parcialmente cubiertos por el esqueleto axial, mientras que los derechos están mejor exhibidos. En el miembro posterior derecho el zeugopodio y una parte del estilopodio se perdieron por erosión post-fosilización, al quedar expuestos en superficie. Sin embargo, su contorno quedó parcialmente insinuado sobre la roca.

De la cintura pectoral no es visible más que una pequeña porción de la escápula izquierda y una gran parte, aunque

mal preservada, de la escápula derecha. El mal estado de preservación de esta última no permite establecer con claridad la morfología de la escápula.

Los huesos del miembro anterior se observan en el apéndice derecho en vista extensora (fig. 9), mientras en el izquierdo parecen encontrarse ladeados. El húmero es más largo que ancho y de longitud similar a la del fémur. Sus extremos proximal y distal son análogamente expandidos. Se observa la cabeza del húmero redondeada y sobresaliente, de tal forma que el largo total del hueso equivale a 2,2 veces su ancho distal. El proceso post-glenoideo está poco desarrollado, al igual que los cóndilos distales. Se observa una hendidura estrecha y alargada sobre el epicóndilo (*ectepicondilar groove* en **Bardet et al., 2005**). El radio y el cúbito son alargados. El radio presenta gran expansión del proceso preaxial mientras su borde pos-axial es ligeramente cóncavo. En el cúbito se aprecia, aunque comprimido, el olecranon bien desarrollado. De los huesos del carpo sólo se distinguen tres en el miembro izquierdo que corresponden al cubital, al cuarto carpiano y un fragmento del intermedio. En el miembro derecho esta zona se encuentra intensamente fracturada y no puede distinguirse ninguno de ellos. Los metacarpianos y las falanges son notoriamente alargados y de extremos poco ensanchados. Sólo los metacarpianos 1 y 5 presentan su extremo proximal expandido. No se puede establecer el número exacto de falanges pero, por su conservación en posición de articulación, es evidente que no existe hiper-falanga. En el dígito más largo se cuentan cuatro falanges.

Los huesos de la cintura pélvica se conservaron en vista dorsal (fig. 10). Se observan los dos isquiones y los dos pubis en posición articulada y los iliones desplazados ligeramente pero conservando su ubicación de articulación. Los isquiones y los pubis son anchos y de cuerpo medialmente expandido. El tubérculo púbico se aprecia solamente como un ensanchamiento del extremo distal del pubis. El tubérculo isquiático no presenta proyección posterior, se manifiesta en el isquion izquierdo como un ángulo marcado en el borde posterior del hueso. Los iliones son muy poco curvados y se dirigen dorsalmente hacia adelante. El izquierdo, por la posición de reposo del esqueleto, se encuentra en contacto con la cuarta vértebra pigal y la primera caudal (figs. 3 y 10). Sin embargo, la posición del ilion derecho, ampliamente separado de las vértebras, sugiere que no existía ninguna conexión articulada entre los iliones y la columna vertebral.

Los huesos del miembro posterior izquierdo, los cuales pudieron observarse al levantar las espinas neurales de las primeras vértebras caudales (figs. 10B y C), están exhibidos en vista postero-lateral mientras los del derecho lo están en vista lateral. Todos son aplanados y están en varias partes



Figura 9. *Eonatator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Miembro anterior derecho con escápula. Fotografía y esquema interpretativo. Barras de escala: 10 cm. Abreviaturas: **c**: cúbito; **es**: escápula; **h**: húmero; **r**: radio; **I...V**: metacarpianos.

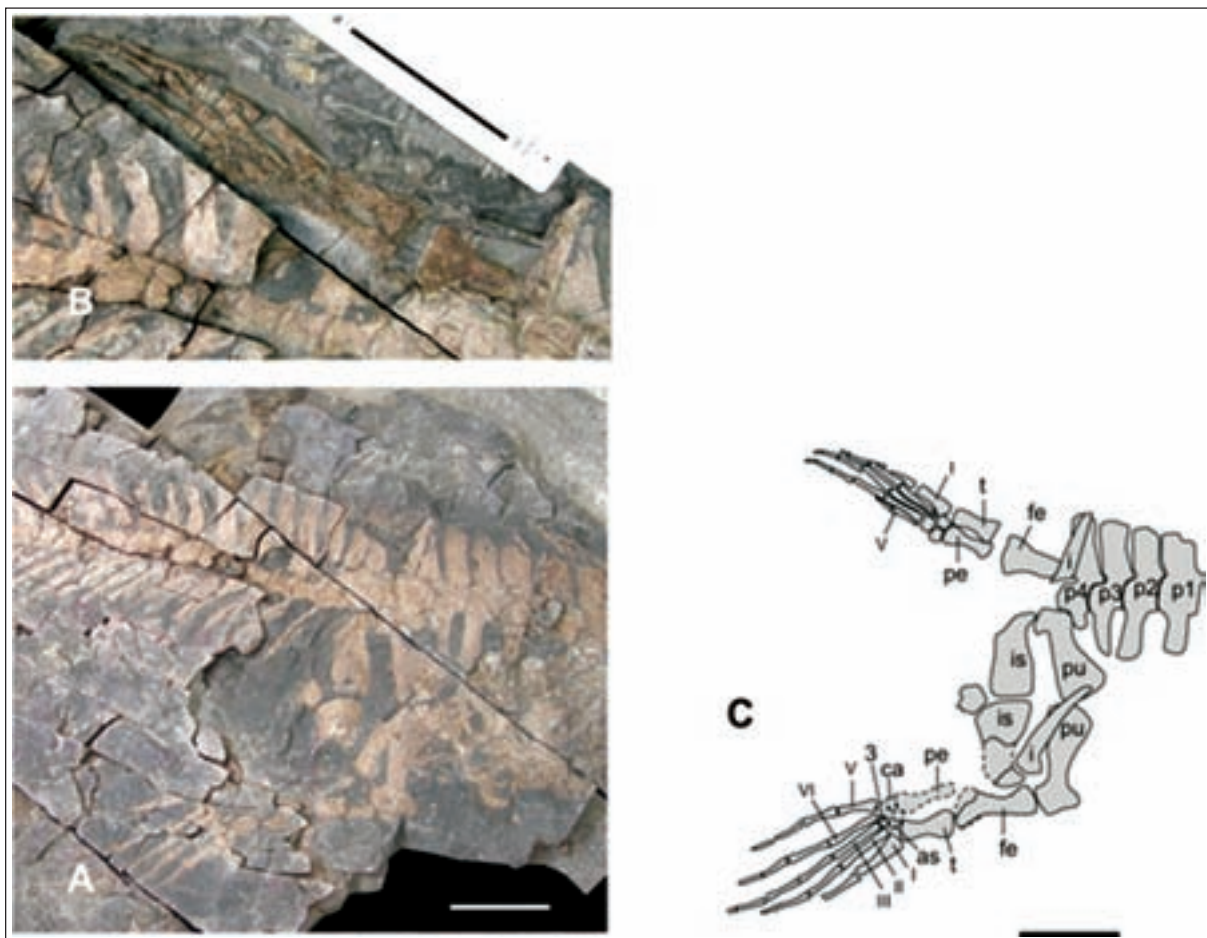


Figura 10. *Eonatator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Cintura pélvica y miembros posteriores con las vértebras pigales. A: Vista general con los arcos vertebrales que cubren el miembro izquierdo. B: Vista del miembro izquierdo sin los arcos vertebrales que lo cubren. C: Esquema interpretativo general sin los arcos vertebrales que cubren el miembro izquierdo. Barras de escala: 10 cm. Abreviaturas: **as**: astrágalo; **ca**: calcáneo; **fe**: fémur; **i**: ilion; **is**: isquion; **p1-4**: vértebras pigales; **pe**: peroné; **pu**: pubis; **t**: tibia; **I-V**: metatarsianos; **3**: tarsiano 3.

erosionados, por lo que varios de sus rasgos sólo se observaron en el momento del hallazgo como contornos visibles en la roca. El fémur es ligeramente más corto que el húmero. Su longitud es casi el doble de su ancho distal. Sus extremos proximal y distal son regularmente convexos. El contorno preservado en el fémur derecho sugiere una forma del cuerpo del hueso ligeramente curvada. La tibia es levemente más corta y más ancha que el peroné. Sus bordes anterior y posterior son cóncavos y su porción proximal más extendida que la distal. El peroné muestra más extendido su extremo distal. Se insinúa la presencia de cuatro huesos semicirculares en el tarso, uno de ellos articulados medialmente con el peroné (calcáneo), uno en posición media entre la tibia y el peroné (astrágalo) y dos distales. Los metatarsianos son notablemente alargados, siendo los tres del medio los más angostos. El I es el más ancho y su región proximal está ampliamente expandida. El V es el más corto y proximalmente es expandido. Las falanges, como en los miembros anteriores, se encuentran articuladas, son alargadas y de extremos poco ensanchados. No se presenta hiper-falanga en los dígitos. En el miembro derecho es claro que los dígitos II y III tienen en total 3 y 4 falanges respectivamente, mientras que en los demás dígitos no es claro el número total de falanges. En el I se conserva una falange y en los dígitos IV y V se insinúan 3. En el miembro izquierdo se puede observar claramente que el dígito II tiene 3 falanges, el dígito III tiene 4 falanges y el dígito IV tiene al menos 4 falanges. Las falanges ungulares conservadas son de extremidad aguda y ligeramente recurvadas.

Discusión

El registro fósil de halisaurinos se ha diferenciado en dos géneros, *Halisaurus* Marsh, 1869 y *Eonatator* Bardet y Pereda Suberbiola, 2005. El género *Halisaurus* fue propuesto con base en dos vértebras y dos fragmentos craneales (Marsh, 1869). *Eonatator* fue propuesto para separar la especie *H. sternbergii* (Wiman, 1920) del género *Halisaurus* (Bardet et al., 2005) sobre la base del estudio de un esqueleto relativamente completo. Inicialmente Wiman (1920) atribuyó el espécimen tipo de esta especie a *Clidastes sternbergii*, luego varios autores discutieron su atribución al género *Clidastes* (Russell, 1967; DeBraga y Carroll, 1993; Ligham-Soliar, 1996) y otros la incluyeron en el género *Halisaurus* (Caldwell y Bell, 1995; Caldwell, 1996; Bell, 1997; Holmes y Sues, 2000; Bardet y Pereda-Suberbiola, 2001). A partir de una amplia revisión del material conocido y nuevo material encontrado en el norte de África, Bardet et al. (2005) separan la especie *H. sternbergii* del género *Halisaurus* para incluirla en el nuevo género *Eonatator* (*E. sternbergii*). El nuevo género es considerado el grupo hermano de *Halisaurus*, conformando la subfamilia Halisaurinae Bardet et al.,

2005. Lindgren y Siverson (2005) presentan a *Eonatator* en la sinonimia de *Halisaurus* sin ofrecer mayor discusión. La mayor parte del material de halisaurinos conocidos en el mundo se ha atribuido al género *Halisaurus*, mientras que el género *Eonatator* está representado por dos especímenes recolectados en capas santonianas de Kansas (USA). El primero, el holotipo, un esqueleto relativamente completo y parcialmente reconstruido, y el segundo, un esqueleto incompleto (Wiman, 1920; Russell, 1967; Bardet y Pereda-Suberbiola, 2001; Bardet et al., 2005).

El género *Halisaurus* fue inicialmente diferenciado de otros mosasaurios por la forma ovalada del cuerpo vertebral (Marsh, 1869), rasgo que ha sido analizado y establecido por varios autores como útil para reconocer este género a partir de restos vertebrales (Baird, 1986; DeBraga y Carroll, 1993; Caldwell y Bell, 1995; Bell, 1997; Holmes y Sues, 2000; Bardet y Pereda-Suberbiola, 2001; Bardet et al., 2005). En el espécimen estudiado las vértebras se encuentran deformadas por aplastamiento por lo que las proporciones reales relacionadas con su sección transversal no son claras. Con la posterior aparición de restos más completos, la descripción de los halisaurinos ha sido ampliamente enriquecida (Wiman, 1920; Russell, 1967; Ligham-Soliar, 1996; DeBraga y Carroll, 1993; Caldwell, 1996; Holmes y Sues, 2000; Bardet y Pereda-Suberbiola, 2001; Bardet et al., 2005; Lindgren y Siverson, 2005) y otros rasgos relacionados con las vértebras han sido discutidos y diferenciados (Caldwell y Bell, 1995; Mulder, 2003; Lindgren y Siverson, 2005). Muchos de los rasgos craneanos y post-craneanos mencionados por los distintos autores para diferenciar estos mosasaurios se encuentran en el ejemplar de Coello. Así, por ejemplo, el frontal posee una marcada cresta medial; el proceso infrastapedia del cuadrado está muy desarrollado y hace contacto con el proceso supraestapedia; las sinapófisis de las vértebras cervicales se proyectan ventralmente sobrepasando el borde ventral del cuerpo vertebral; las sinapófisis de las vértebras dorsales posteriores se ubican anteriormente en el cuerpo vertebral; las vértebras caudales tienen las espinas hemales fusionadas; y el cuerpo vertebral de las caudales terminales es de sección sub-hexagonal. Los caracteres diagnósticos establecidos por Bardet et al. (2005) para diferenciar la subfamilia Halisaurinae se observan claramente en el ejemplar de Coello: 1- la forma lateral de la sutura mx-pmx encaja en la geometría descrita por los autores (vertical adelante, oblicua en su sección media y horizontal atrás) (fig. 6A,B); 2- la orientación de las ramas suspensorias del parietal es oblicua (figs 6A,B y 7); 3- la expansión preaxial del radio se extiende en los dos tercios distales del largo del hueso (fig. 9); y 4- la tibia y el peroné son alargados, angostos y con extremos expandidos (fig. 10).

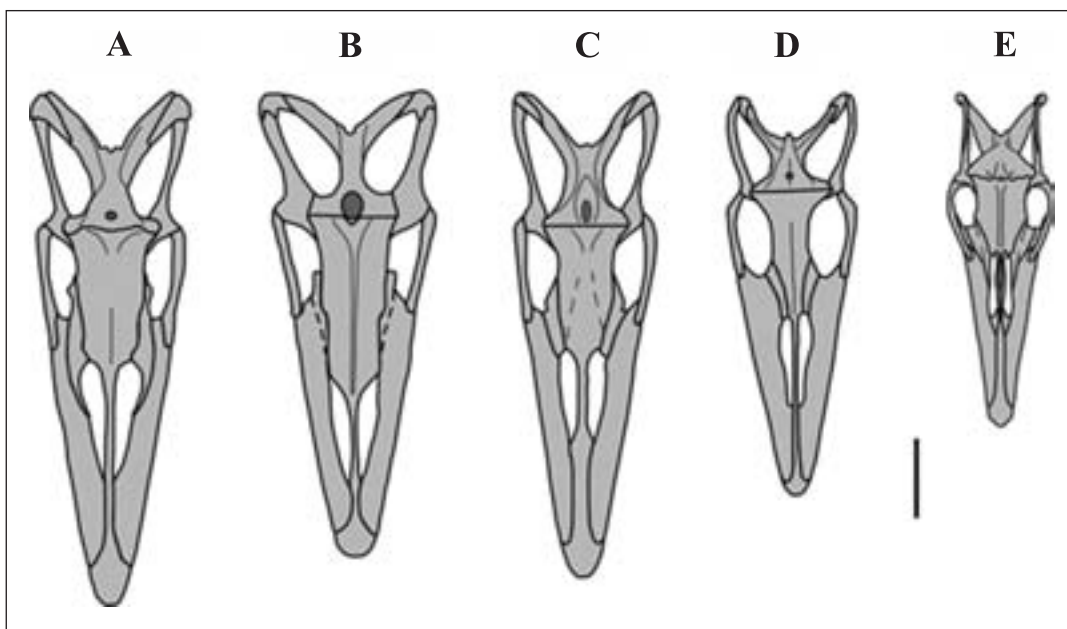


Figura 11. Gráfica comparativa de cráneos de halisaurinos reconstruidos, en vista dorsal. Tomado y modificado de Bardet et al., 2005. A, *Halisaurus platyspondylus* (tomado de Holmes & Sues, 2000); B, *Halisaurus ortliebi* (tomado de Lingham-Soliar, 1996); C, *Halisaurus arambourgi* (tomado de Bardet et al., 2005); D, *Eonatator sternbergii* (tomado de Bardet & Pereda Suberbiola, 2001); E, *Eonatator coellensis* sp. nov. RC090805 (nuevo número de catálogo: IGM p881237). Barra de escala: 10 cm.

De acuerdo con las sinapomorfías identificadas para cada género en el análisis de **Bardet et al.** (2005), *Halisaurus* se identifica por presentar un área triangular postero-medial en la superficie dorsal del frontal, exhibir un fuerte parapeto posterior a la fosa glenoidea en el articular y mostrar articulaciones vertebrales cervicales sub-rectangulares. A diferencia de *Halisaurus*, en el ejemplar colombiano el articular presenta sólo un ligero abultamiento posterior a la fosa glenoidea y el área postero-medial triangular en la superficie dorsal del frontal es prácticamente inexistente y en su lugar se observa extendida la cresta dorsal (fig. 7). En el halisaurino de Coello no se puede observar la forma de los centros vertebrales.

Por su parte, *Eonatator* es caracterizado en el estudio de **Bardet et al.** (2005) por presentar en el parietal una tabla triangular uniforme que se extiende considerablemente hacia atrás; por tener el foramen parietal de forma circular y de tamaño mediano, ubicado a una distancia igual a dos veces su tamaño desde la sutura fronto-parietal y rodeado anteriormente y posteriormente por dos crestas paralelas; por tener el cuadrado redondeado con el ala timpánica regularmente convexa; por poseer una fórmula vertebral consistente en 7 cervicales, 24 dorsales, 4 pigales, 28 caudales medianas y al menos 41 caudales terminales; y por presentar un húmero cuya longitud es equivalente a 2,5 veces su ancho distal. Como en *Eonatator*, el ejemplar colombiano exhibe el parietal con una

protuberante superficie triangular extendida hacia atrás y con crestas en su superficie (fig. 7), tiene el cuadrado redondeado y con el ala timpánica regularmente convexa (fig. 6C), el número de vértebras cervicales y pigales es coincidente (fig. 3), y las proporciones del húmero son similares (fig. 9). Sin embargo, ni la forma de las crestas de la superficie triangular del parietal, ni el número de vértebras dorsales del ejemplar colombiano coinciden con los mencionados por **Bardet et al.** (2005) para este género. En el halisaurino de Coello el foramen parietal no se observa, parece ser pequeño y, en cualquier caso, su posición es anterior.

Las diferencias de los rasgos superficiales del parietal encontradas entre el ejemplar de Coello y las establecidas para *Eonatator* pueden estar relacionadas con la fuerte deformación que presenta el ejemplar colombiano en la zona dorsal anterior de este hueso. Por otra parte, teniendo en cuenta que la preservación del espécimen tipo de *Eonatator sternbergii*, el más completo conocido, ha sido discutida por presentar partes reconstruidas, entre ellas algunas vértebras cervicales y dorsales (**Bardet y Pereda-Suberbiola**, 2001), el rasgo relacionado con la fórmula vertebral no se puede diferenciar con precisión. El número de vértebras dorsales en el holotipo de *E. sternbergii* se establece en 24, contando 2 anteriores reconstruidas y la última probablemente sin costillas (**Wiman**, 1920; **Bardet y Pereda-Suberbiola**, 2001). En el ejemplar colombiano se cuentan 21, todas ellas portando costillas.

Con respecto a los rasgos post-craneanos, conocidos sólo en *Halisaurus arambourgi* y *Eonatator sternbergii*, el ejemplar de Coello comparte la mayoría con el segundo: los centros vertebrales caudales son más largos que altos; los propodios presentan un cóndilo esférico; el fémur es alargado, de longitud cercana a las 2,5 veces su ancho distal; y las proporciones y la morfología de los huesos de la cadera y de los miembros son más parecidos a los de *E. sternbergii*. De esta manera, las variaciones que muestra el espécimen de Coello con respecto a los rasgos diagnósticos de *Eonatator* y de *Halisaurus* permiten relacionarlo más cercanamente con el primero.

Además de los rasgos mencionados, el ejemplar estudiado presenta un mosaico de caracteres que comparte con las distintas especies de halisaurinos y que, al mismo tiempo, lo diferencian de las demás (fig. 11). Con *H. ortliebi* comparte la prolongación posterior de la cresta frontal y la posición anterior del foramen parietal (Dollo, 1889; Lingham-Soliar, 1996); con *H. platyspondylus* comparte la amplia participación de los prefrontales en el borde posterior de las narinas externas y la geometría general del frontal (Holmes y Sues, 2000); con *H. arambourgi* comparte las proporciones relativas entre las longitudes del frontal, de las narinas externas y de la porción rostral anterior a las narinas y la presencia de una pequeña cresta del prefrontal sobre la parte anterior de la órbita (Bardet et al., 2005), además de la ancha barra posterior del premaxilar, rasgo sugerido también para *H. platyspondylus* por Polcyn y Lamb (2012). Finalmente, con *E. sternbergii* comparte la forma alargada del cráneo, las proporciones generales de la región parietal, los márgenes cóncavos del frontal y la presencia de grandes nasales (Wiman, 1920; Bell, 1997; Bardet y Pereda-Suberbiola, 2001), este último rasgo sugerido también para *H. arambourgi* por Polcyn et al. (2012).

El halisaurino colombiano difiere de *Eonatator sternbergii* por mostrar la terminación posterior de la sutura premaxilar-maxilar a la altura del séptimo diente maxilar. Aunque en el holotipo de *E. sternbergii* no se ha conservado el premaxilar, Bardet et al. (2005) establecen como carácter diagnóstico ambiguo del género la terminación de esta sutura detrás del noveno diente maxilar. El ejemplar de Coello difiere de todas las especies de halisaurinos en la forma del contorno de las narinas externas, en la posición retraída de las narinas con relación a la longitud total del cráneo y del maxilar, en la presencia de un corto rostro anterior a los dientes premaxilares y dentarios, en la corta longitud del frontal y en la presencia de dos depresiones mediales en la tabla triangular del parietal. La morfología de las vértebras caudales permite sugerir que la forma de la cola era similar a la de los mosasaurios más que a la de los aigialosaurios o a la de *E. sternbergii*.

El mosaico de caracteres analizados justifica ampliamente ubicar el espécimen de Coello en un nuevo taxón de la subfamilia Halisaurinae. De los dos géneros establecidos para la subfamilia, el ejemplar de Coello comparte caracteres diagnósticos sólo con *Eonatator*. La única especie de este género, *E. sternbergii*, difiere en varios rasgos del halisaurino de Coello. Lo anteriormente mencionado y la presencia de rasgos únicos en el ejemplar de Coello sustentan su ubicación en una nueva especie del género *Eonatator*. Su estudio aporta nuevos rasgos morfológicos del género, que no se conocían en su única especie *E. sternbergii*. La anatomía de la parte anterior del cráneo, así como la morfología y las interrelaciones de los huesos de la cintura pélvica y de los miembros, constituyen un nuevo aporte a la definición del género.

Conclusiones

Este estudio permite reportar el primer mosasaurio halisaurino conocido hasta ahora en Colombia. Por sus características anatómicas se le ubica dentro de una especie nueva del género *Eonatator* Bardet y Pereda Suberbiola, 2005, *E. coellensis* sp. nov. Su estudio aporta nuevas observaciones que complementan la definición del género. El espécimen constituye el primer registro de mosasaurios en capas del Campaniano de Colombia y representa el mosasaurio más tardío en el territorio colombiano.

En las cavidades del esqueleto del mosasaurio estudiado se identifican restos de tejidos blandos que, por su posición y morfología, se asocian a restos musculares y vestigios de órganos internos. En la región abdominal posterior se reconocen restos de otros individuos de tamaño pequeño que se interpretan como posibles restos de uno o varios embriones.

Un análisis tafonómico preliminar permite proponer que el cadáver del mosasaurio se depositó boca abajo en un ambiente que refrenó los procesos de descomposición y favoreció la mineralización temprana. Por la disposición y forma de preservación que presentan los restos, se sugiere que el enterramiento fue lento y progresivo.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado y financiado a través de un convenio interinstitucional establecido entre la Universidad Nacional de Colombia e INGEOMINAS (actualmente Servicio Geológico Colombiano, SGC). Ricardo Calderón y su padre, Luis Alfredo Calderón, merecen un especial agradecimiento por informar generosamente sobre el hallazgo del espécimen. A José Enrique Arenas, director del Museo Geológico José Royo y Gómez del SGC, expreso mis agradecimientos por facilitar el acceso al fósil. Agradezco a Gerardo Vargas

del Laboratorio de preparación paleontológica del SGC por su constante labor de preparación e incondicional colaboración en la manipulación del espécimen. Agradezco también a Natalie Bardet del Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris por facilitar el acceso a material de comparación y a Marta Fernández de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, por sus aportes y comentarios al manuscrito.

Bibliografía

- Acosta, J. E., Guatame, R., Caicedo, J. C. & Cárdenas, J. I.** 2002. Mapa Geológico de Colombia, Plancha 245 Girardot, Escala 1:100.000, Memoria Explicativa. Instituto de Investigación e Información Geocientífica, Minero-Ambiental y Nuclear, INGEOMINAS. 92 pp.
- Azzaroli, A., Giuli, C. De, Ficarelli, G. & Torre, D.** 1975. Late cretaceous mosasaurs from Sokoto District, Nigeria. Atti. Accad. Naz. Lincei, Mem. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat., Roma, **13** (2): 21-34.
- Baird, D.** 1986. *Halisaurus* and *Prognathodon*, two uncommon mosasaurs from the Upper Cretaceous of New Jersey. The Mosasaur **3**: 37-45.
- Bardet, N. & Pereda-Suberbiola, X.** 2001. The basal mosasaurid *Halisaurus sternbergii* from the Late Cretaceous of Kansas (North America): a review of the Uppsala type specimen. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Terre et des planètes / Earth and Planetary Sciences, **332**: 395-402.
- Bardet, N., Pereda Suberbiola, X., Iarochene, M., Bouya, B & Amaghaz, M.** 2005. A new species of *Halisaurus* from the Late Cretaceous phosphates of Morocco, and the phylogenetical relationships of the Halisaurinae (Squamata: Mosasauridae). Zoological Journal of the Linnean Society, **143**: 447-472.
- Bell, G. L. Jr.** 1997. A phylogenetic revision of North American and Adriatic Mosasauroida. In: J. M. Callaway & E. L. Nicholls (eds): Ancient Marine Reptiles. Academic Press (San Diego): 293-332.
- Bell, G.L. Jr., Sheldon, M.A., Lamb, J.P. & Martin, J.E.** 1996. The first direct evidence of live birth in Mosasauridae (Squamata): Exceptional preservation in Cretaceous Pierre Shale of South Dakota. Journal of Vertebrate Paleontology 16(suppl. to 3):21A.
- Bell, G.L. Jr. & Sheldon, M. A.** 2004. A gravid mosasaur (Plioplatecarpus) from South Dakota. Abstract book and field guide of the First Mosasaur Meeting, Schulp, A. S. and John W. M. Jagt (eds.), Natuurhistorisch Museum Maastricht, the Netherlands, pp. 16 (Abstract).
- Caceres, C., Cediell, F. & Etayo, F.** 2005. Guía introductoria de la distribución de facies sedimentarias de Colombia, Mapas de distribución de facies sedimentarias y amazón tectónico de Colombia a través del Proterozoico y del Fanerozoico. Maps of sedimentary facies distribution and tectonic setting of Colombia through the Proterozoic and Phanerozoic. Instituto Colombiano de Geología y Minería - INGEOMINAS, Bogotá. 43 p.
- Caldwell, M. W.** 1996. Ontogeny and phylogeny of the mesopodial skeleton in mosasauroids reptiles. Zoological Journal of the Linnean Society **116**: 407-436.
- Caldwell, M. & Bell, G. L.** 1995. *Halisaurus* sp. (Mosasauridae) from the Upper Cretaceous (?Santonian) of East-Central Peru, and the Taxonomic Utility of Mosasaur Cervical Vertebrae. Journal of Vertebrate Paleontology, **15** (3): 532-544.
- Caldwell, M.W. & Lee, M. S. Y.** 2001. Live bearing in Cretaceous marine lizards: first fossil record of viviparity in squamates. Proceedings of the Royal Society of London B, **268**: 2397-2401.
- Camp, C. L.** 1923. Classification of the lizard families. Bulletin of the American Museum of Natural History **48**:289-481
- DeBraga, M. & Carroll, R.** 1993. The origin of mosasaurs as a model of macroevolutionary patterns and processes. Evolutionary Biology, **27**: 245-322.
- Díez Díaz, V. & Ortega, F.** 2007. Un nuevo ejemplar de mosasaurio halisaurino del Cretácico Superior (Maastrichtiense) de la cuenca de Khouribga (Marruecos). In: O. Cambra-Moo, C. Martínez-Pérez, B. Chamero, F. Escaso, S. de Esteban Trivigno & J. Marugán-Lobón (Eds.), Cantera Paleontológica. Diputación Provincial de Cuenca: 143-155.
- Dollo, L.** 1889. Première note sur les mosasauriens de Mesvin. Société Belge de Géologie et de Minéralogie **3**: 271-304.
- Etayo-Serna, F., Renzoni, G. & Barrero, D.** 1976. Contornos Sucesivos del mar cretáceo en Colombia. Memoria del Primer Congreso Colombiano de Geología: 217-252.
- Gervais, P.** 1853. Observations relatives aux reptiles fossiles de France. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris **36**: 374-377, 470-474.
- Holmes, R. B., & Sues, H. D.** 2000. A partial skeleton of the basal mosasaur *Halisaurus platyspondylus* from the Severn Formation (Upper Cretaceous: Maastrichtian) of Maryland. Journal of Paleontology, **74**: 309-316.
- Houssaye, A. & Bardet, N.** 2013. A baby mosasauroid (Reptilia, Squamata) from the Turonian of Morocco – Tethysaurus 'junior' discovered? Cretaceous Research **46**: 208-215
- Kardong, K. V.** 2012. Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. Sixth edition. McGraw-Hill, New York. 794 pp.
- Kierman, C. R.** 2002. Stratigraphic distribution and habitat segregation of mosasaurs in the Upper Cretaceous of western and central Alabama, with an historical review of Alabama mosasaur discoveries. Journal of Vertebrate Paleontology, **22**: 91-103.
- Lindgren, J & Siverson, M.** 2005. *Halisaurus sternbergi*, a small mosasaur with an intercontinental distribution. Journal of Paleontology, **79** (4): 763-773.
- Lingham-Soliar, T.** 1991. Mosasaurs from the Upper Cretaceous of Niger. Palaeontology, London, **34** (3): 653-670.
- Lingham-Soliar, T.** 1996. The first description of *Halisaurus* (Reptilia Mosasauridae) from Europe, from the Upper Cretaceous of Belgium. Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Sciences de la Terre, **66**: 129-136.
- Linnaeus, C.** 1758. Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. 10th Ed. Laurentius Salvii, Stockholm. (1-4) 824 p.
- Marsh, O. C.** 1869. Notice of some new mosasauroid reptiles from the Greensand of New Jersey. American Journal of Science and Arts, **48**: 392-397.
- Montes, C., Hatcher Jr. R: D. & Restrepo-Pace, P.** 2005. Tectonic reconstruction of the northern Andean blocks: Oblique convergence and rotations derived from the kinematics of the Piedras-Girardot area, Colombia. Tectonophysics, **399**: 221-250.
- Mulder, E. W. A.** 2003. Chapter 8-On the alledged presence of *Halisaurus* (Squamata, Mosasauridae) in the Latest Cretaceous of Maastrichtian type area. In: E. W. A. Mulder (Ed.): On latest Cretaceous tetrapods from the Maastrichtian type area. Publicaties van het Natuurhistorisch Genootschap in Limburg, Reeks XLIV, aflivering 1. Stichting Natuurpublicaties Limburg (Maastricht): 145-147.
- Oppel, M.** 1811. Die Ordnung, Familien und Gattung der reptilian als Prodrom einer Naturgeschichte derselben. München. (1-12) 86 p.
- Páramo, M. E.** 1994. Posición sistemática de un reptil marino con base en los restos fósiles encontrados en capas del Cretácico superior en

- Yaguará (Huila). Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, **19** (72): 63-80.
- Páramo-Fonseca M. E.** 1997. Les vertébrés marins du Turonien de la Vallée Supérieure du Magdalena, Colombie, Systématique, Paléoécologie et Paléobiogéographie. Tesis doctoral, Université de Poitiers, Francia. - Referencia biblioteca Servicio Geológico Colombiano, Bogotá. 154 p.
- Páramo-Fonseca, M. E.** 2000. *Yaguarasaurus columbianus* (Reptilia, Mosasauridae), a primitive mosasaur from the Turonian (Upper Cretaceous) of Colombia. Historical Biology, **14**: 121-131.
- Polcyn, M. J. & Lamb, J.** 2012. The snout of *Halisaurus platyspondylus* MARSH 1869: phylogenetic and functional implications. Bull. Soc. géol. France, **183** (2): 137-143.
- Polcyn, J., Lindgren, J., Bardet, N., Cornelissen, D., Verding, L. & Schulp, A. S.** 2012. Description of new specimens of *Halisaurus arambourgi* BARDET & PEREDA SUBERBIOLA, 2005 and the relationships of Halisaurinae. Bull. Soc. géol. France, 2012, **183** (2): 123-136
- Porta de, J.** 1965. La Estratigrafía del Cretácico Superior y Terciario en el extremo Sur del Valle Medio del Magdalena. Universidad Industrial de Santander, Boletín Geológico, **19**: 5-50.
- Russell, D. A.** 1967. Systematics and morphology of American mosasaurs (Reptilia, Sauria). Peabody Museum of Natural History, Yale University, Bulletin **23**: 1-241.
- Russell, D. A.** 1970. The vertebrate fauna of the Selma Formation of Alabama. Pt. VII, The mosasaurs. Fieldiana: Geology Memoirs, **3**: 365-380.
- Wiman, C.** 1920. Some reptiles from the Niobrara Group in Kansas. Bulletin of the Geological Institute of Uppsala, **18**: 9-18.

Recibido: 17 de septiembre de 2013

Aceptado: 31 de diciembre de 2013

LA PROTECCIÓN DEL BANANO CONTRA LA SIGATOKA NEGRA POR MÉTODOS NO BIOCIDAS

THE PROTECTION OF BANANA AGAINST BLACK SIGATOKA DISEASE THROUGH NON BIOCIDAL METHODS

Fernando Echeverri*

RESUMEN

Echeverri F.: La protección del banano contra la Sigatoka Negra por métodos no biocidas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 519-525, 2013. ISSN 0370-3908.

La investigación básica es necesaria para crear bienes útiles a la sociedad o para mejorar procesos tecnológicos; actualmente se requieren nuevas alternativas para controlar microorganismos patogénicos a cosechas importantes. En este trabajo se reporta la búsqueda de nuevos métodos y moléculas contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis f. sp. difformis*, causante de la enfermedad conocida como Sigatoka Negra en banano y plátanos, que afecta las exportaciones colombianas y requiere la aplicación de altas cantidades de pesticidas sintéticos contaminantes. Mas allá de los conocimientos científicos y tecnológicos, otros hechos se deben considerar al desarrollar un producto para el mercado de los agroquímicos

Palabras Clave: banano; enfermedad, hongo, control, protección

ABSTRACT

Basic science research is necessary to create innovative goods for the society or to improve technological process; now, other alternatives are required to control pathogenic microorganism to important crops. In this paper, new methods and molecules are reported against the *M. fijiensis f. sp. difformis*, the causal agent of the disease named Black Sigatoka in banana and plantain, which affects colombian exports and requires the application of high amounts of synthetic pesticides. Beyond science and technology knowledge, other facts must be considered to develop a novel product for the agrochemical market.

Keywords: banana, disease, fungi, control, protection

Introducción

En los países en desarrollo, son usuales los reclamos de algunos sectores de la sociedad respecto a los reducidos aportes

que le generan la academia y la investigación, cuando hay graves problemáticas industriales, sanitarias, nutricionales y económicas que debe solucionarse urgentemente. De manera paralela a esos problemas, también hay una alto potencial

* Profesor, Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín-Colombia. Consultor Sustainable Agrosolutions SA, Ctra. N-240. Km 110, 25100 Almacelles, Lleida, España

de uso de la biodiversidad, que abunda en sus territorios. De manera similar, son comunes las mutuas recriminaciones de los sectores académico, gubernamental y empresarial, en cuanto al divorcio que existe entre ellos, aunque los dos últimos son ávidos de fomentar lo que se ha llamado Investigación Aplicada, pues conciben el proceso científico como una receta mágica que rápidamente y de manera muy barata, da lugar a productos y bienes apropiables, sin tener en cuenta que ese hipotético edificio de aplicaciones se construye con los conocimientos primigenios generados por silenciosos investigadores, dentro de lo que se conoce como Investigación Básica.

A continuación se reporta la búsqueda de una sustancia implicada en la protección del banano contra un hongo patógeno, de manera no biocida, y que fue concebida a partir de conocimientos básicos en química de productos naturales.

Resultados y discusión

Los orígenes

La química de orgánica de productos naturales involucra varias ramas del saber humano y ha sido el pilar fundamental en el desarrollo de la Farmacología, la Toxicología, la Química Orgánica y la Bioquímica, entre otras. De hecho, buena parte de los medicamentos fueron desarrollados con base en el efecto de varios productos naturales, pero otros campos, tales como la Agronomía, también han recibido el beneficio de antibióticos, insecticidas, herbicidas, fungicidas y reguladores del crecimiento (Dayan *et al.* 2011; Hütter, 2011).

Al respecto, entre el 20-40% de las cosechas, se pierde por efecto de microorganismos, bien sea en planta o durante el transporte y almacenamiento (Savary *et al.* 2012); para tratar de mantener la producción alimentos en los niveles que exige una creciente población, han sido aplicadas millones de toneladas de sustancias sintéticas, muchas de ellas cuestionadas desde los puntos de vista toxicológico y ecológico. Como consecuencia, entidades estatales y supranacionales, tales como la EPA en Estados Unidos y la EFSA en la Unión Europea, están imponiendo drásticas reglamentaciones al registro y uso de nuevos pesticidas y han reducido notablemente las materias primas necesarias para su elaboración (EPA 2010; European Commission, 2008; Nougadère *et al.*, 2011).

Una opción para protegerlas cosechas se relaciona con la inducción de mecanismos de defensa propios de la planta, específicamente con las Fitoalexinas, que podría ser mas efectiva y amigable con el medio ambiente. Sus orígenes datan de 1940, con el trabajo pionero Muller y Borger (1940), al observar en rodajas de papa, la generación de resistencia

contra una cepa compatible del hongo *Phytophthora infestans*, tratadas previamente con una cepa incompatible del mismo hongo Postularon que el contacto de la célula vegetal con el microorganismo hacía que la primera produjera una molécula de defensa, llamada por ellos Fitoalexina.

Varias alternativas se han propuesto para usar las fitoalexinas en el control de patógenos de cosechas, pero la que ha llamado la atención consiste en inducir en plantas la producción *in situ*, aplicando sustancias específicas y estructuralmente similares a las que se han aislado de hongos, llamadas Elicitores. El uso de esos Elicitores y de moléculas análogas tiene varias ventajas adicionales sobre los fungicidas sintéticos, como por ejemplo, aplicarse solo en el momento indicado, es decir cuando se prevea la aparición de circunstancias favorables al patógeno, como altas temperaturas y humedad. Adicionalmente, el tiempo de contacto entre la sustancia inductora y el patógeno es muy reducido, lo que implica menores riesgos de resistencia, contrario a los pesticidas sintéticos, que al actuar continuamente y con diferente residualidad favorecen la resistencia.

Las consideraciones anteriores fueron tenidas en cuenta para diseñar una estrategia con el fin de buscar una solución a una enfermedad de origen fúngico que afecta al Banano, un producto muy importante desde el punto de vista agroeconómico, no solo por su incidencia en el empleo y las exportaciones (cercanas a los US 700 millones/año), sino también por el volumen de pesticidas que normalmente se necesitan para su manejo (Rey 2011, Lombana 2012), con un costo cercano al 10% de las exportaciones. Pero previamente, se había llevado a cabo trabajos con fitoalexinas en Eucalipto, Tomate de Árbol, Papaya y Frijol, con los cuales se calibraron las posibilidades de las fitoalexinas en la Agronomía.

La Búsqueda

Para comienzos de la década de los 80s se generó en Colombia una alerta acerca de la futura presencia de un hongo patógeno al banano, causante de la enfermedad llamada Sibatoga Negra, producida por el hongo *Mycosphaerella fijensis*; este afectaba sus hojas y reducía total o parcialmente su capacidad fotosintética, traduciéndose en graves disminuciones de la productividad. Su control en algunos de los principales países productores (Costa Rica, Ecuador y Colombia) exige gastos cercanos a los 200 millones de dólares por año. A partir de entonces y por mas de 20 años, se desarrollaron varios proyectos de investigación básica para conocer la bioquímica de la relación planta-patógeno, en términos de la producción de fitoalexinas, como se describe a continuación.

- a. Análisis de varios carbohidratos aminados como la Kanamicina y la Gentamicina, químicamente relacio-

nados con sustancias presentes en algunos hongos (Figura 1), para determinar si podían simular la presencia del hongo y por tanto desencadenar la producción de fitoalexinas. Efectivamente, se apreció un cambio en la coloración de las soluciones aplicadas (Echeverri *et al.*, 1986).

- b. Inducción masiva en la superficie de centenares de hojas de banano, para obtener suficiente cantidad de las sustancias producidas por las células vegetales. Después de 2 años, se tuvieron disponibles aproximadamente 5mg de un sólido rojo, cuya cromatografía en

capa fina, indicó la presencia de una serie de sustancias similares a las que se producían en la hoja de banano en los primeros estadios de ataque de la Sigatoka Negra, aunque en concentraciones mucho menores

- c. Análisis estructural de las nuevas fitoalexinas, mediante técnicas bidimensionales de resonancia magnética nuclear (COSY, DEPT, APT, HMQC, HMBC, NOE, ROESY), espectrometría de masas de alta resolución y finalmente, difracción de rayos X. Esas moléculas correspondían a un sistema del tipo fenilfenalenonas, la primera de las cuales fue llamada irenolona (Luis *et al.* 1993) (Figura 2).

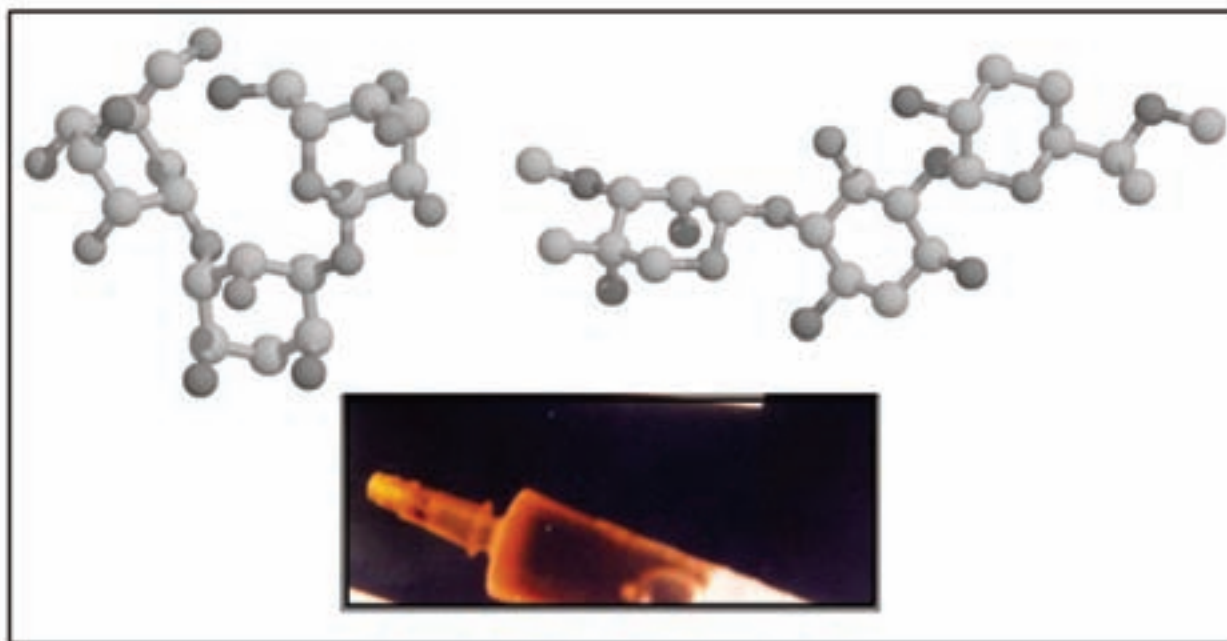


Figura 1. Inductores de fitoalexinas en banano. Izq. Kanamicina, Der. Gentamicina. Inferior: aspecto de las gotas de inductores colectadas a las 72 horas.

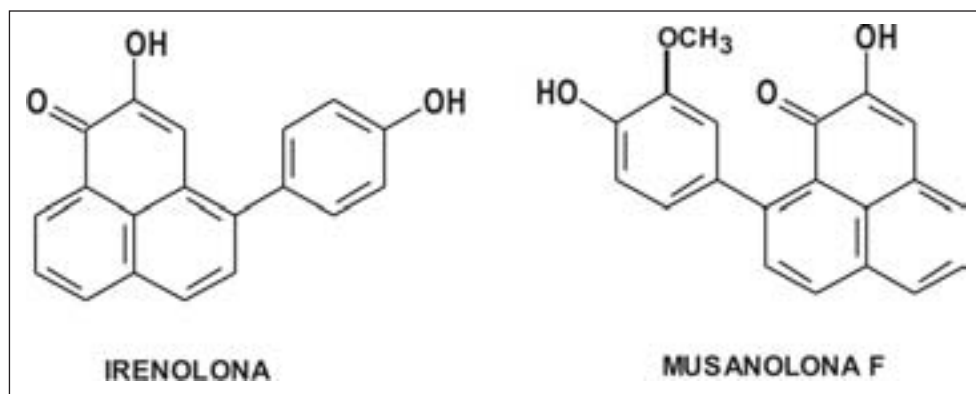


Figura 2. Estructuras de los dos principales grupos de fitoalexinasfenilfenalenónicas de banano.

- d. Aislamiento y purificación de otras fitoalexinas en hojas de banano tratadas con kanamicina, así como en rizomas infectados por el hongo *Fusarium oxysporum*, causante de la enfermedad conocida como Mal de Panamá; obtención de una subclase de fitoalexinas llamada Musanolonas (Luis *et al.* 1996), así como dímeros, alcoholes y anhídridos.
- e. Síntesis de las sustancias naturales y varios análogos estructurales; análisis de la actividad *in vitro* contra la Sigatoka Negra, obteniendo resultados antifúngicos importantes con sistemas del tipo perinaftenona y nitro derivados. (Escobar *et al.*, 2000; Escobar 2002)
- f. Correlaciones entre la fitopatología y la capacidad de generar fitoalexinas de variedades de banano y de plátano (Otálvaro *et al.* 2002).
- g. Análisis de la ruta biosintética, empleando precursores marcados, tales como fenilalanina, acetato y metionina.

A partir del conocimiento acumulado por más de 20 años, surgió una nueva perspectiva planteada por una industria:

tratar de controlar la Sigatoka Negra, apelando a métodos y sustancias no biocidas (Echeverri *et al.*, 2012), con la aplicación de inductores de fitoalexinas. Para ello, se diseñaron inicialmente los requisitos hipotéticos que debería tener una molécula para actuar como inductora en las hojas de banano, entre los cuales cabe resaltar su origen natural, la ausencia de toxicidad, su amigabilidad con el medio ambiente, disponibilidad para satisfacer un mercado del orden de toneladas, así como su carácter renovable.

De millones de sustancias candidatas se seleccionaron diez, de las cuales cinco fueron sometidas a ensayos en vivero en la zona de Urabá, con la colaboración de CENIBANANO. Tres moléculas mostraron una alta capacidad para controlar la Sigatoka Negra (Echeverri *et al.*, 2006); una de ellas se seleccionó entonces para estudios en plantaciones de banano de Colombia, durante dos años mas (Rodríguez *et al.*, 2010).

Los resultados hallados indicaron un nivel de protección similar o superior al de los fungicidas comerciales Tridemorf, Ditan y Clorotalonil, pero con frecuencias de aplicaciones reducidas a la mitad y concentraciones efectivas muy inferiores (Figura 3).

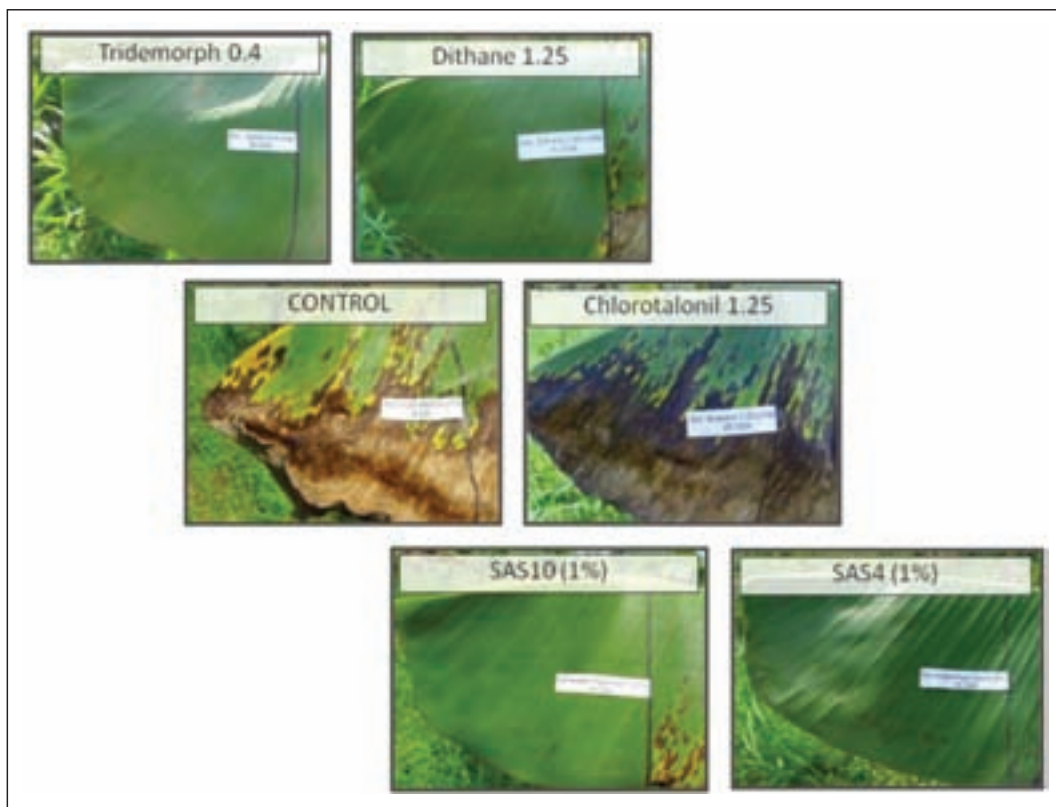


Figura 3. Efectos protectantes de dos inductores de fitoalexinas (SAS10 y SAS4) en hojas de banano, contra *M. fijensis* en el modelo de hoja simple. Parte izquierda de la hoja tratada con el inductor; parte derecha, sin tratar. Nótese la resistencia al clorotalonil.

La acción no biocida fue demostrada a partir de las siguientes evidencias:

- Prácticamente usencia de efectos de la sustancia inductora de fitoalexinas sobre la germinación de ascosporas y crecimiento del túbulo germinativo de *M. fijensis*, tanto de cepas de laboratorio, como colectados en plantaciones afectadas.
- Extractos de hojas tratadas con el inductor provocaron una reducción del crecimiento del túbulo germinativo de *M. fijensis* en un 70%, pero no hubo efectos sobre la germinación de las ascosporas. Esto explica porque en los cultivos siempre hay Sigatoka Negra, pero en niveles fitopatológica y económicamente manejables.
- Por CCF y HPLC/EM, se detectó la presencia de nuevas sustancias en extractos de hojas tratadas con el inductor, cuya estructura corresponde a fenalenonas reportadas como fitoalexinas.

Finalmente, para demostrar la inocuidad del inductor sobre la producción de fruto, se llevó a cabo un ensayo, desde plántula hasta planta con fruto; además de no afectar su calidad y productividad se observó que durante todo este período de tiempo (6 meses) había un nivel muy bajo de la enfermedad, con hojas fotosintéticamente viables y renovadas, a diferencia de las plantas no tratadas, en las cuales predominaban las hojas necrosadas por la Sigatoka Negra (Figura 4).

Posteriormente, y debido a que existen variantes en los cultivos de banano y cepas del hongo, se realizaron ensayos de campo adicionales en otros países productores de banano, como República Dominicana, Ecuador, Costa Rica y México; en 2010 se solicitó la patente (Echeverri *et al.* 2010) que ya esta aprobada en varios países. El rango de aplicabilidad abarca desde cultivos normales hasta aquellos que tienen certificación o que están en el rango de los orgánicos, y además se puede emplear intercalado con los pesticidas sintéticos.

El uso y la aplicación

No basta tener una buena idea, una estrategia investigativa impecable y unos resultados positivos, pues para poder comercializar el producto se necesitan varios requisitos adicionales:

- Tener el producto formulado, de tal manera que se garantice el máximo de efectividad y reproducibilidad de los resultados.
- Obtener el registro de venta en el país que se quiera comercializar. En Colombia, a grandes rasgos se requiere:
 - ♦ Validar los métodos químicos de análisis en un laboratorio acreditado ante la autoridad nacional competente.



Figura 4. Efecto protectante después de 6 meses de tratamiento. Izquierda plantas sin aplicaciones, con muchas hojas necrosadas; derecha, plantas tratada, menor incidencia de la enfermedad.

- ◆ Demostrar sus efectos biológicos, a través de ensayos de campo y de laboratorio. Esto último es relativamente fácil cuando se trata de un fungicida, pues los ensayos *in vitro* se ejecutan sobre cajas de petri, pero cuando es un inductor de defensas como en este caso, la situación es más compleja, ya que la respuesta, como ya se mencionó anteriormente, es indirecta: no es el inductor el responsable de la protección, sino las sustancias producidas por la planta, bien sea a través de fitoalexinas o activando otros mecanismo de defensa.
- ◆ Demostrar la inocuidad de los ingredientes.
- ◆ Usualmente, pueden surgir otros requisitos, como por ejemplo, un concepto de la autoridad ambiental sobre posibles riesgos asociados o derivados del uso y aplicación del producto que se desea registrar.
- Penetrar un mercado, en el cual hay cierta prevención por la innovación.

Hay un punto importante a resaltar; actualmente se prefieren las sustancias que no posean una acción biocida sobre aquellas que tengan ese mecanismo de acción y además que sean de origen natural. Si bien los productos naturales no están totalmente exentos de riesgo y toxicidad, el uso habitual documentado dentro de prácticas etnoculturales del tipo cosmético, alimenticio o terapéutico disminuye algunos ensayos y análisis asociados a la solicitud de registro. Sin embargo, bajo condiciones normales, los tiempos necesarios para cumplir esos requisitos pueden llegar a ser hasta casi el 50% de lo empleado en los ensayos de campo y de laboratorio, lo que indica que para un promedio de 4-5 años de investigación, puede haber más de 2 años de trámites. No importa que exista una evidente urgencia por nuevos productos para controlar una enfermedad que disminuye la producción, rebaja las importaciones, atente contra el medio ambiente y ponga en riesgo centenares de empleos.

Conclusiones

La ciencia siempre ha generado resultados tangibles y útiles para la sociedad, a corto, mediano o largo plazo; a la vez que crea nuevas preguntas e hipótesis concernientes a la investigación básica. Es la capacidad analítica de algunas personas y el olfato de oportunidad de otros, lo que permite definir cuando un resultado puede migrar de lo meramente científico hacia su uso y cuando hacia la generación de conocimiento.

A diferencia del proceso científico, varios interrogantes de la vida diaria se plantean antes de tratar de llenar un vacío técnico o tecnológico, que trascienden mas allá de la demostración científica de sus fundamentos y de su viabilidad:

- Que tan novedoso es el proceso o producto?
- Cual es la demanda actual y la potencial a mediano plazo?
- A quién le interesa?
- Cuales ventajas tiene sobre los productos actuales en el mercado?
- Que tan accesible es obtener la materia prima, a que costo, y con qué rapidez?
- En cuales otros campos tiene aplicación?

Burocráticamente no es fácil hacer investigación aplicada en las Universidades y centros de investigación, mas diseñados para lo que realmente son, centros de saber y formación. Demasiada burocracia, exceso o defecto de reglamentación, falta de directrices, distanciamiento con las empresas, ausencia de experiencia en apropiación del conocimiento, carencia de validación de oportunidades y ortodoxia. Y no solamente allí, pues otros centros de investigación, paradójicamente privados, mantienen altos niveles de autosuficiencia que les impide analizar nuevas perspectivas y estrategias para solucionar los problemas que deben acometer.

También dentro de ese contexto investigativo y tecnológico, muchos insumos de investigación (reactivos, medios de diagnósticos, kits, repuestos, solventes, equipos) y aún de producción son escandalosamente caros y difíciles de obtener. Los grandes laboratorios fabricantes de esos insumos están relativamente cerca: New York por ejemplo, está a sólo 6 horas de los laboratorios de investigación de Medellín, pero a meses y millones de la DIAN y de otros trámites institucionales y nacionales.

Otros casos similares en los cuales se hace efectivo el uso de la Biodiversidad y de los productos naturales están actualmente en desarrollo o son productos, contra Roya del café, Mildeo de flores y Pudrición Gris del Tomate. En alimentos y bebidas con nuevos Colorantes y Surfactantes, y en farmacología, con nuevas sustancias Leishmanicidas y Regeneradores Neuronales.

Agradecimientos

A los estudiantes y colegas del grupo QOPN, que de manera directa o indirecta han participado en momentos de creatividad. Y a las compañías Ecoflora (Colombia) y Sustainable Agro Solutions, por su constante optimismo e infinita paciencia.

Bibliografía

- Dayan, FE, Cantrell, CL, Duke SO. 2011. Natural products in crop protection protectionBioorg. Med.Chem. 17, 2009, 4022-4034.

- Echeverri, F., Lanau, J., Pelaez, C.** 1986. Inducción de fitoalexinas con aminoglicosidos en hojas de banano. *Actualidades Biológicas* 15,100–104
- Echeverri, F., Torres, F., Pineda, R., Zuleta, S.** 2006. Inducción de fitoalexinas en hojas de banano con varios agroquímicos. XVII Reunion ACORBAT 15-20 Octubre. Joinville (Brasil). 683-687.
- Echeverri, F., Justribo, X., Zanuy, C. WIPO.** 2010. Patente WO/2010/109290. Compositions for the protection of crops, method for the application thereof and use of said compositions for the protection of crops. Solicitada.
- Echeverri, F., Torres, F., Quiñones, W., Escobar, G., Archbold, R.** 2012. Phenylphenalenonephytoalexins, will they be a new type of fungicide? *PhytochemistryReviews* 11,1-14.
- Escobar, G.** 2002. Síntesis de fenilfenalenonas y analogos estructurales y su actividad frente a sigatoka negra. Tesis de doctorado, Universidad de Antioquia. Medellín.
- Escobar, G., Gallego, A., Quinones, W., Echeverri, F., Torres, F., Cardona, G., Rosero, F.** 2000. Synthesis and Antifungal Activity of Musa Phytoalexins and Structural Analogs. *Molecules* 5, 974–980.
- EPA.** 2010. Integrated Risk Information System (IRIS). Available from: <<http://www.epa.gov/iris/>>.
- European Commission,** 2008. New rules on pesticide residues in food, Fact sheet, p. 4.
- Hüter, O.** 2011. Use of natural products in the crop protection industry, *Phytochem. Rev.* doi:10.1007/s11101-010-9168-y.
- Luis, J-G., Echeverri, F., Torres, F., Quiñones, W., Cardona, G., Gonzalez, A., Rojas, M., Lopez, M., Aguiar, Z. Brito, I.** 1993. Irenolone and Emenolone: two new types of phytoalexin from *Musa paradisica*. *J. Org Chem* 58, 4306–4308
- Luis, J., Kishi, Garcia, F, Abad, T, Cardona, G, Torres, F, Quiñones, W, Echeverri, F.** 1996. Musanolones: Four 9-Phenylphenalenones from rhizomes of *M. acuminata*. *Phytochemistry* 41,753-755
- Lombana, J.** 2012. Desarrollos y Estructuras del Mercado del Banano de Exportación en Colombia (1995 - 2010). Ed. Universidad del Norte. Barranquilla. ISBN 978-958-99167-7-3. 39p.
- Müller, KO, Borger H.** 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora infestans-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft.* 23,189–31.
- Nougadère, A., J Reninger, J-C., Volatier, J-L., Leblanc, J-C.** 2011. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: A ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. *Food Chem. Toxicol* 49, 1484-1510.
- Otalvaro, F., Schneider, B., Quiñones, W., Torres, F., Echeverri, F.** 2002. Correlation between phenylphenalenonephytoalexins and phytopathological properties in *Musa*. Structure of a phenylphenalene. *Molecules* 7, 331-340.
- Rey, V.** 2011. Aspectos del manejo de la sigatoka negra con fungicidas. Proyecto sigatoka negra. I Reunión Técnica Bananera de Colombia / Apartadó – Julio 13-14, 2011. Disponible en http://www.augura.com.co/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=91&Itemid=95. Acceso febrero 3-2011
- Rodríguez, R., Echeverri, F., Torres, F.** 2010. Evaluación en campo del inductor de fitoalexinas con pf5 en el control de la Sigatoka Negra *M. fijiensis* Morelet en banano *Musa AAA*. XIX Reunion ACORBAT, 8-12 Nbre Medellín (Colombia) 557-562.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J-N., Hollier, C.** 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* 4, 519-537.

Recibido: enero 28 de 2013

Aceptado para publicación: 13 de noviembre de 2013

BIOESTRATIGRAFIA DE LA FORMACION CANSONA EN LA QUEBRADA PEÑITAS, CINTURON DE SAN JACINTO. IMPLICACIONES PALEOGEOGRÁFICAS

BIOSTRATIGRAPHY OF THE CANSONA FORMATION AT QUEBRADA PEÑITAS, SAN JACINTO BELT. PALEOGEOGRAPHIC IMPLICATIONS

Hernando Dueñas Jiménez PhD.*, Clemencia Gómez González PhD.**

RESUMEN

Dueñas Jiménez H., C. Gómez González: Bioestratigrafía de la Formación Cansona en la quebrada Peñitas, cinturón de San Jacinto. Implicaciones paleogeográficas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 527-539, 2013. ISSN 0370-3908.

En este trabajo se presentan los resultados de los análisis bioestratigráficos de trece muestras de la Formación Cansona recolectadas a lo largo del Quebrada Peñitas, la cual corta el núcleo del Anticlinal de Chalán que queda localizado en el Cinturón de San Jacinto, región Caribe Colombiana.

Con base en la información obtenida, se les asigna a los sedimentos de la Formación Cansona una edad Cretáceo Tardío. A la parte basal de la sección analizada se le asigna una edad Campaniano Tardío a Maastrichtiano Temprano. A la parte superior, se le asigna una edad Maastrichtiano Tardío. La totalidad de los sedimentos analizados fueron depositados en ambientes marinos cercanos a la costa, los cuales recibieron gran aporte de terrígenos. Se observa una somerización de la cuenca de depósito a medida que se asciende estratigráficamente.

La microfauna recolectada solo incluye foraminíferos bentónicos de amplio rango estratigráfico dentro del Cretáceo Tardío, los cuales son indicadores de ambientes marinos, pero poco aportan a la definición de edades.

De las muestras analizadas de la parte superior de la Formación Cansona, fue posible recuperar buenas asociaciones de Polen y de esporas, las cuales incluyen *Buttinia andreevi*, *Zlivisporites blanensis* y *Proxapertites humbertoides* entre muchos otros. Esta asociación de palinomorfos nos permite determinar que la parte superior de la secuencia estratigráfica analizada pertenece a la Zona de *Proteacidites dehaani* (Germeraad et al., 1968) de edad Maastrichtiano Tardío.

Muy buenas asociaciones de dinoflagelados fueron recuperadas de las muestras analizadas de la parte inferior de esta secuencia. Estas asociaciones de palinomorfos se caracterizan por la co-ocurrencia de especies de los

* BIOSS SAS hjbioass@yahoo.com

** Agencia Nacional de Hidrocarburos(A.N.H.). Ggc06@Anh.gov.co

géneros *Andalusiella*, *Cerodinium* y *Senegalinium* lo cual es indicativo de que estos sedimentos pertenecen al Paleocinturón Tropical (Malloy Suite) establecido por Lentin y Williams (1980).

Asociaciones palinológicas similares a las obtenidas de muestras de la Formación Cansona, en la Quebrada Peñitas, han sido reportadas a lo largo y ancho de la cordillera oriental (Fig. 4).

En la región del Cinturón de San Jacinto durante el Cretáceo Tardío, se presentó un mar tropical somero (mar Cansona) que se encontraba interconectado con los mares que permitieron el depósito de los sedimentos de las Formaciones Colón, Umir y Formaciones equivalentes.

Por primera vez se reporta la presencia de sedimentos pertenecientes a la zona de *Proteacidites dehaani* y del denominado Paleocinturón Tropical al occidente de la Sutura de Romeral.

Palabras clave: dinoflagelados Cretaceo Superior, Formación Cansona, Foraminíferos, Paleo-ambiente, Paleocinturón Tropical.

SUMMARY

In this paper the results obtained from the biostratigraphical analysis of 13 samples from the Cansona Formation are presented. These samples were collected along the Quebrada Peñitas. The Quebrada Peñitas cuts through the core of the Chalán anticline and it is located on the San Jacinto belt of the Caribbean region of Colombia.

Based on the information obtained, it is possible to assign a Late Cretaceous age to the Cansona Formation. For the lower part of the analyzed section, it is possible to assign a Late Campanian to Early Maastrichtian age. For the upper part, we assigned a Late Maastrichtian age. According to the micropaleontological content, all of the analyzed sediments were deposited on shallow marine near-coast environments, which received a great influx of terrigenous material. It is possible to observe a shallowing of the basin as we ascend stratigraphically.

The microfauna collected includes only long-range Cretaceous benthonic foraminifera, which are indicative of marine environments but do not contribute much in assigning a more precise age.

From the analysed samples of the upper part of the section, it was possible to obtain good assemblages of pollen and spores, including *Buttinia andreevi*, *Zivisporites blanensis* and *Proxapertites humberoides*, among many others. These assemblages allow us to assign to this part of the section a Late Maastrichtian age, and assume that these sediments belong to the *Proteacidites dehaani* zone (Germeraad et al., 1968).

Very good assemblages of dinoflagellates were recovered from samples collected on the lower part of the analysed section. They are characterized by the co-occurrence of species of the genera *Andalusiella*, *Cerodinium* and *Senegalinium*, which are indicative that these sediments belong to the Tropical Paleo-Belt (Malloy suite), as established by Lentin and Williams (1980).

The palynological assemblages similar to those recovered from sediments belonging to Quebrada Peñitas have been widely reported throughout the Eastern Cordillera. During the late Cretaceous Period there was a shallow Tropical sea (Cansona Sea), in the San Jacinto belt region, that was interconnected with the seas that allowed the deposition of the sediments belonging to the Colon, Umir, and equivalent Units.

In this paper is reported, for the first time, the presence of sediments belonging to the *Proteacidites dehaani* and to the Tropical Paleo-Belt located west of the current Romeral Fault.

Key words: upper Cretaceous Dinoflagellates, Cansona Formation, Foraminifera, Paleoenvironment, Tropical Paleo-Belt.

Introducción

El Cinturón plegado de San Jacinto, es una faja orogénica que corre paralela a la costa del Caribe en la parte Nor-Occidental de Colombia. Limita al Occidente con el cinturón plegado del Sinú (Cuenca del Sinú). Al Oriente lo bordea

la Falla (Sutura) de Romeral que, al mismo tiempo, le sirve de límite con la Cuenca del Valle Inferior del Magdalena (Fig.1).

El término estratigráfico Formación Cansona (Notestein & Aitken (1929); en Duque Caro *et al.*, 1996) hace relación

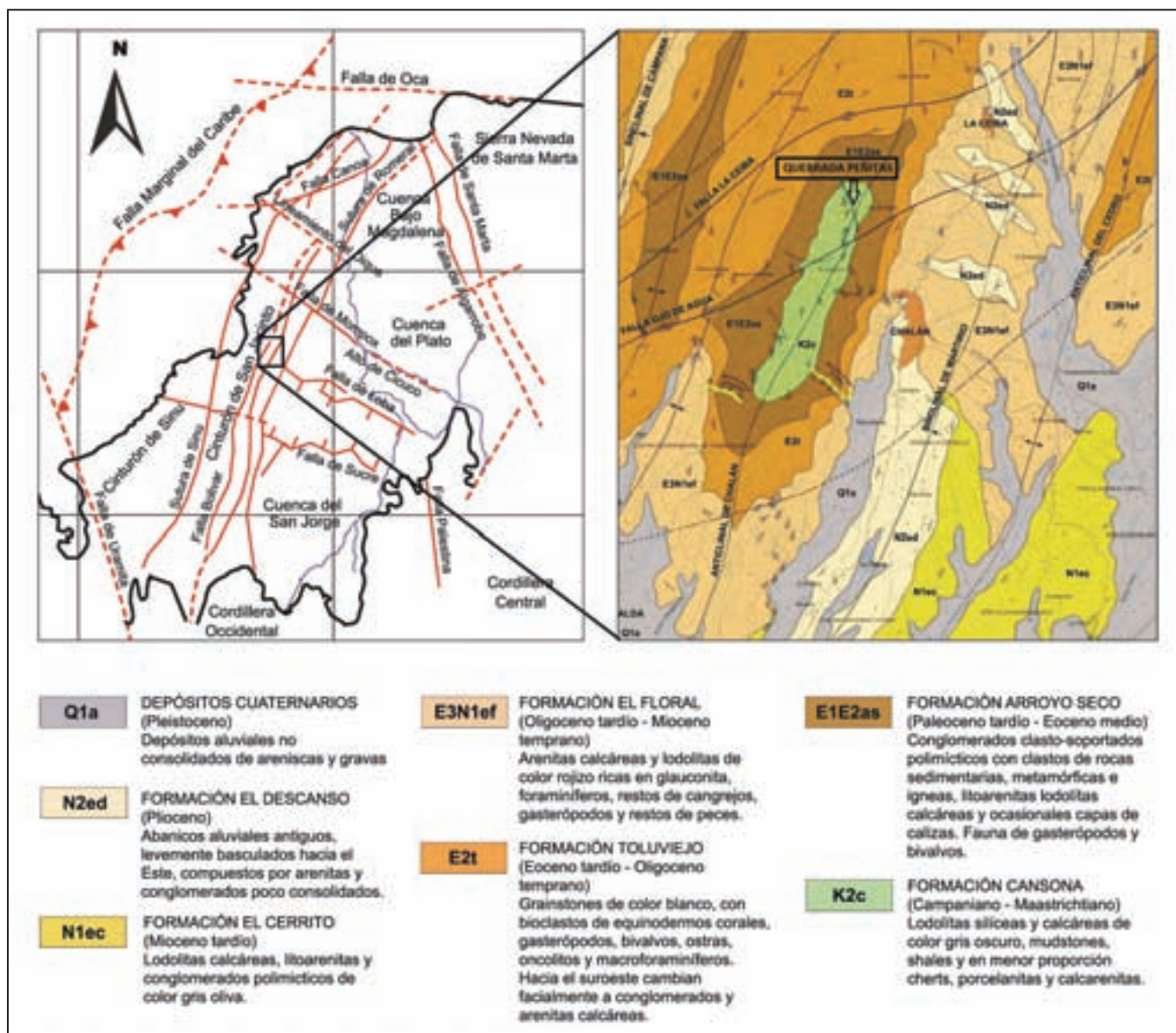


Figura 1. Localización regional y mapa geológico del anticlinal de Chalán

a una secuencia de 230 m de espesor que aflora en el Cerro Cansona (Departamento de Bolívar), localizado a 35 km al Noroccidente de la población de Chalán. En el área de estudio, la Formación Cansona aflora formando el núcleo del anticlinal de Chalán (Fig.1). Con base en la microfaua recuperada de muestras provenientes de varias secciones en el Cerro Cansona, la Texas Petroleum Company le asignó a la Formación Cansona en 1942 (Duque Caro, 1972) una edad de Santoniano a Maastrichtiano, y un ambiente de depósito marino somero. Hacia la parte inferior de la formación, la Texas Petroleum reportó la co-ocurrencia de *Heterohelix globulosa*, *Globotruncana* spp., *Bulimina* spp., y *Globige-*

rinoides spp. Hacia el tope reportó la común presencia de *Siphogenerinoides cretacea*. En los estudios llevados a cabo, la microfaua recobrada de las muestras de la Formación Cansona en la Quebrada Peñitas se compone exclusivamente de foraminíferos bentónicos, lo cual nos ha impedido corroborar la edad asignada por la Texas Petroleum Company.

En todos los sitios de afloramiento, las rocas de la Formación Cansona se presentan como pequeños remanentes sedimentarios aislados tectónicamente. Dueñas & Duque (1981) mencionan que los sedimentos de la Formación Cansona descansan discordantemente sobre basamento de tipo oceá-

nico (i.e., sobre las Peridotitas de Planeta Rica). Por su parte, Clavijo & Barrera (2001) mencionan que estos sedimentos se encuentran en contacto directo con unas diabasas de textura amigdaloida (Fig. 2). Posterior al depósito de las rocas de

la Formación Cansona, se presenta el inicio de la Orogenia Pre-Andina (Duque Caro, 1972), razón por la cual el contacto superior con la suprayacente Formación Arroyo Seco es claramente discordante (Fig. 2).

EDAD		UNIDAD	ESPESOR (m)	LITOLOGÍA <small>Cly Sli Ss Cgl</small>
Holoceno Pleistoceno		Terrazas y aluviones	70	
NEÓGENO	Plioceno	Formación El Descanso	50	
	Mioceno	Formación El Cerrito	200	
PALEÓGENO	Oligoceno	Formación El Floral	430	
		Eoceno	Formación Tolu Viejo	
	Paleoceno	Formación Arroyo Seco	400	
			200 - 326	
CRETÁCEO	Maastrichtiano	Formación Cansona	>152	
	Campaniano			
		Rocas Ígneas Básicas		

Figura 2. Columna estratigráfica generalizada pra el cinturón de San Jacinto.

Muestras de la Formación Cansona provenientes de varias secciones han sido analizadas por métodos geoquímicos, reportando valores de carbono orgánico total que varían entre el 2 y 12% (con promedios de 4%). El querógeno predominante es tipo I y II (i.e., de origen marino). Los valores de reflectancia de vitrinita alcanzan 0.77%, y las temperaturas máximas de pirolisis están alrededor de 440°C. Estos valores geoquímicos permiten considerar a los sedimentos de la Formación Cansona como las rocas generadoras de hidrocarburos del Sistema Petrolero del Cinturón plegado de San Jacinto (Bioss, 2005).

Materiales y métodos utilizados

La Formación Cansona aflora en el núcleo del anticlinal de Chalán. En la parte más norte del Anticlinal de Chalán, la Quebrada Peñitas atraviesa una sección de 152 metros perteneciente a esta formación (Fig.1). Por su parte, la Figura 3 presenta la columna estratigráfica levantada a lo largo de la Quebrada Peñitas. En ella se localizan las trece muestras que fueron preparadas y analizadas por métodos palinológicos y micropaleontológicos. Adicionalmente en esta gráfica, se presentan las edades establecidas para estos sedimentos y la subdivisión palinológica propuesta.

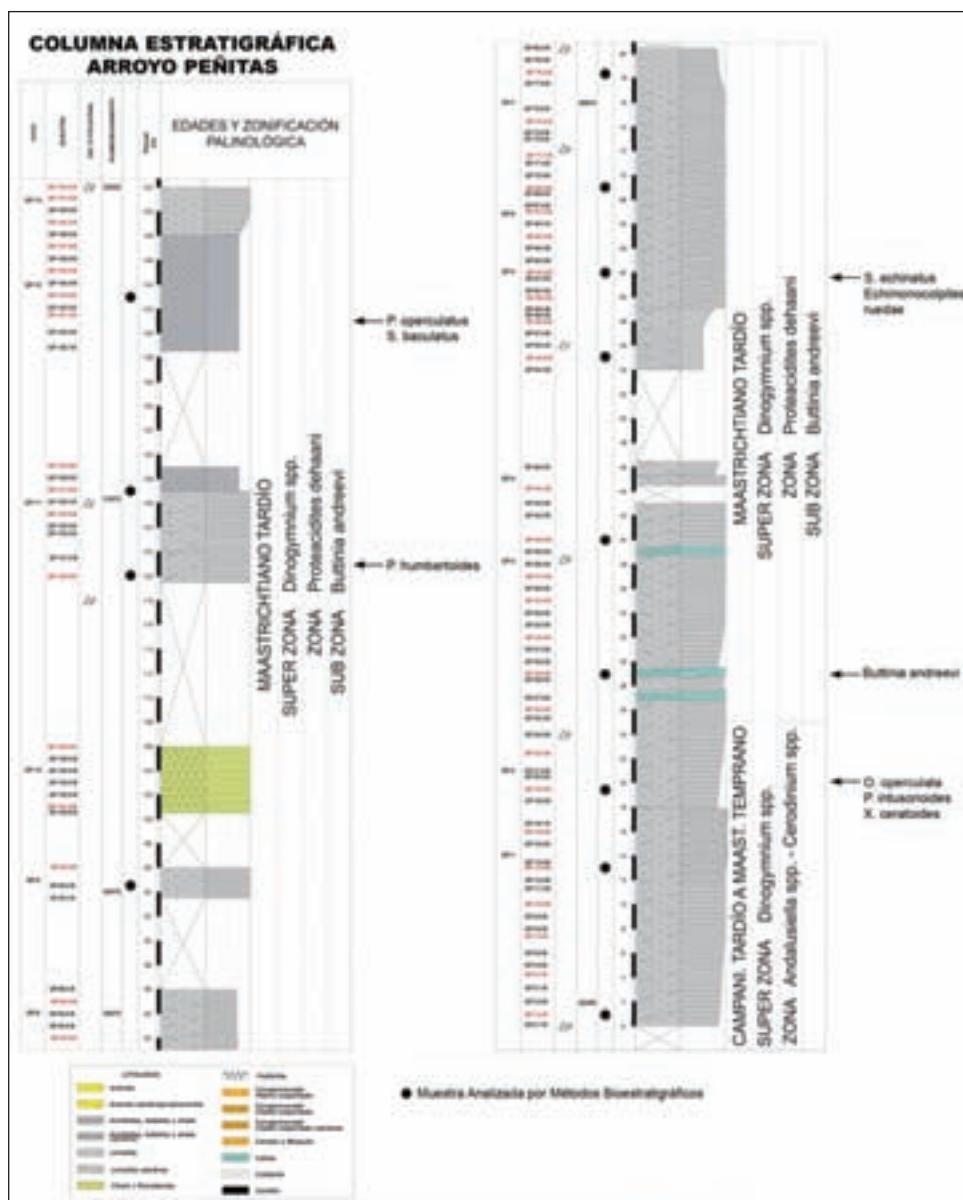


Figura 3. Columna estratigráfica de la Formación Cansona en la quebrada Peñitas.



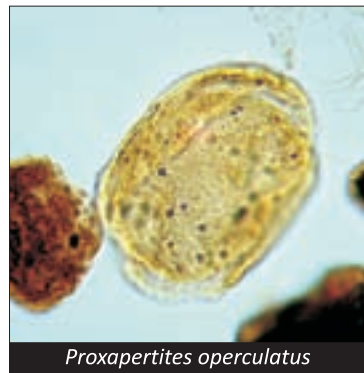
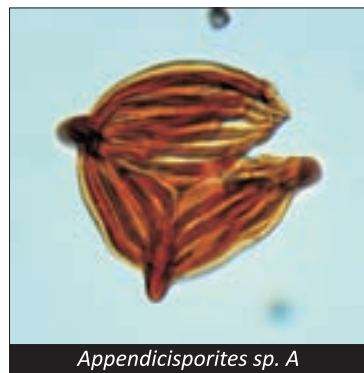
*Proxapertites operculatus**Proxapertites humbertoides**Buttinia andreevi**Echitriletes sp. (Short spine)**Echitriletes sp. (Long spine)**Araucariacites sp.**Appendicisporites sp. A**Retitriletes sp. (yy)**Zlivisporites blannensis**Pterospermella sp 1**Escolecodonto**Escolecodonto*

Tabla III. Distribución estratigráfica de microfauna de la Formación Cansona en la quebrada Peñitas.

DISTANCIA A LA BASE EN METROS	NÚMERO DE LABORATORIO	Tabla de distribución de Foraminíferos Bentónicos Quebrada Peñitas Formación Cansona			Foraminíferos Bentónicos													Otros Microfósiles						
		EDAD Y ZONIFICACION			Foraminíferos Plantónicos (Moldes)	Foramíniferos <i>Ellipsanodosaria stephensoni</i>	<i>Dentalina sp.</i>	<i>Lenticulina musteri</i>	<i>Gyroidina globosa</i>	<i>Haplophragmoides spp.</i>	<i>Lagena sp.</i>	<i>Cf. Dentalina</i>	<i>Dentalina aculeata</i>	Fragmentos recristalizados	Moldes de Bentónicos	<i>Gavelinella nacatochensis</i>	<i>Anomalina ammonoides</i>	<i>Ellipsanodosaria sp.</i>	<i>Lagena sulcata</i>	<i>Pleurostomella subnodosa</i>	<i>Lenticulina taylorensis</i>	Bivalvos	Espículas de equinoideos	Dientes de peces
		CAMPANI. MAAST. TEM.	MAASTRICHTIANO TARDÍO	SUPER ZONA Dinogymnium spp.	ZONA Proteacidites de haani	SUB ZONA <i>Buttinia andreevi</i>																		
141.0	258					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							*		
127.0	3																							
120.0	257																							
94.5	256								*					*	*							*		
78.5	255													*	*		*	*				*		
69.0	254								*					*	*							*		
62.0	253													*	*			*	*			*		
55.0	2																							
40.0	252													*	*							*		
29.0	251								*					*	*							*		
19.5	1				ZONA Andalusiiella - Cerodinium												*							
13.0	250																							
1.0	249																							*

Las muestras para estudios micropaleontológicos se prepararon utilizando métodos convencionales. La Tabla III presenta la distribución estratigráfica de la microfauna encontrada.

Bioestratigrafía

De todas las muestras preparadas por métodos palinológicos fue posible recuperar muy buenas asociaciones de Esporas Triletes que incluyen esporas de los Géneros *Echitriletes*, *Verruiletes*, *Cyathidites*, *Polyodiaceoisporites* y *Baculatisporites* entre otros. Todas las muestras analizadas correspondientes a esta sección estratigráfica presentan valores altos de esporas de los géneros antes mencionados. La presencia común de estos palinomorfos en todas las muestras analizadas es base para sugerir que estos estratos fueron depositados bajo unas condiciones sedimentarias similares, en las cuales el aporte de elementos de origen continental no solo fue el mismo, sino que fue también abundante en todos los casos (Tabla I).

Las asociaciones palinológicas recuperadas incluyen la presencia de granos de polen de las especies *Proxapertites-humbertoides*, *Spinizonocolpites baculatus*, *Spinizonocolpites echinatus*, *Echimonocolpites ruedae* y *Ulmoideipites krempii* entre otros. De gran importancia estratigráfica es la presencia de *Buttinia andreevi* (Tabla I), la cual presenta su

primera aparición en la base del Maastrichtiano Tardío (Sarmiento & Guerrero, 2000) y su punto de extinción hacia el tope del Maastrichtiano Tardío (Germeraad *et al.*, 1968). La presencia de *Buttinia andreevi* nos permite por lo tanto determinar una edad Maastrichtiano Tardío para la parte superior (50 a 152 metros) de la sección analizada de la Formación Cansona (Fig.3). Así mismo, *Buttinia andreevi* es uno de los elementos más característicos de la zona de *Proteacidites de-haanii* establecida por Germeraad *et al.* (1968).

Las muestras analizadas de la Formación Cansona también se caracterizan por presentar abundantes y diversas asociaciones de Dinoflagelados, y pobres asociaciones de Foraminíferos Bentónicos. La presencia de estos elementos de origen marino junto con la abundante presencia de microflora de origen continental nos permite determinar que los sedimentos de la Formación Cansona en la Quebrada Peñitas, se depositaron en un ambiente marino cercano a la línea de costa, el cual recibía un gran aporte de terrígenos.

La parte más inferior de la secuencia estudiada (0 – 50 m) se caracteriza por la co-ocurrencia de dinoflagelados de gran importancia estratigráfica tales como:

- *Odontochitina operculata* y *Xenascus ceratoides*, palinomorfos cretácicos de amplio rango estratigráfico

cuyas últimas apariciones se reportan al tope del Maastrichtiano Temprano (Williams & Bujack, 1985).

- *Palaeohystrichophora infusorioides*, dinoflagelado cretácico de amplio rango estratigráfico cuya última aparición ha sido reportada en el Maastrichtiano Temprano por Williams & Bujack (1985), y Williams *et al.*, (1993).

Con base en la presencia de estos dinoflagelados, podemos asignarle a los sedimentos de la parte inferior de la Formación Cansona (0 a 50 metros) una edad “no más joven que Maastrichtiano Temprano”.

Varios de los dinoflagelados que acompañan a *O. operculata* y a *X. ceratoides* presentan puntos de aparición en la parte superior del Campaniano Tardío, ellos son:

- *Spiniferites multibrevis*, cuyo punto de aparición se reporta en el límite Campaniano-Maastrichtiano (Schrack, 1987).
- *Cerodinium diebelli*, presenta su punto de aparición en el Campaniano Tardío (Lentin & Williams, 1980; Williams & Bujack, 1985).
- *Palaeocystodinium australinum*, presenta su ocurrencia más baja en la parte más superior del Campaniano (Williams & Bujack, 1985).
- *Cerodinium granulastriatum* presenta su ocurrencia más baja en el Campaniano (Sarmiento & Guerrero, 2000; Schrack, 1987).
- *Senegalinium bicavatum* y *Andalusiella mauthei*, los cuales presentan sus puntos de aparición en el Campaniano Tardío (Sarmiento & Guerrero, 2000).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos concluir que la edad de la parte más baja de la sección analizada de la Formación Cansona (0 a 50 metros) es Campaniano Tardío a Maastrichtiano Temprano (Fig. 3).

En forma general, se observa en las gráficas de distribución de palinomorfos, la disminución de la densidad de los dinoflagelados a medida que se asciende en sentido estratigráfico, así como el incremento de los elementos de origen continental. Esto sugiere una somerización de la cuenca a medida que se asciende estratigráficamente. Esta somerización apoya la idea generalizada de una regresión, que se presenta al final del Cretáceo en la parte Noroccidental de Sur-América.

Asociaciones de palinomorfos similares a las recuperadas de las muestras de la Formación Cansona, en la Quebrada Pe-

ñitas, han sido reportadas a lo largo y ancho de la Cordillera Oriental (Fig. 4) por autores tales como:

- Formación Colón: Dueñas (1989); Yepes (2001); Germeraad *et al.* (1968).
- Formación Molino: Dueñas (1989)
- Formación Mito-Juan: Yepes (2001); Germeraad *et al.* (1968)
- Grupo Guaduas: Sarmiento (1992); Sarmiento & Guerrero (2000)
- Formación Umir: Germeraad *et al.* (1968)
- Formación La Paz: Germeraad *et al.* (1968)

Lo anteriormente expuesto es base para sugerir la presencia de un ambiente marino somero durante el Cretáceo Tardío, que permitió el depósito de sedimentos similares a lo largo de la Cordillera Oriental, así como en la región del Anticlinal de Chalán, que está localizado al Occidente de la Sutura de Romeral.

Implicaciones paleogeográficas

El Cinturón de San Jacinto, en donde aflora la Formación Cansona (Anticlinal de Chalán) queda localizado al occidente de la Sutura de Romeral, la cual es considerada el límite entre varios Terrenos Geológicos (Fig. 1). El basamento al occidente de la Sutura de Romeral es de origen volcánico básico, mientras que el basamento al oriente está conformado por rocas ígneas félsicas. La gran mayoría de las reconstrucciones paleogeográficas (Villamil, 1999) consideran que durante el Cretáceo Superior, los Terrenos Geológicos a ambos lados de la Sutura de Romeral evolucionaron geológicamente de forma aislada.

La presencia de afloramientos de sedimentos marinos someros del Cretáceo Tardío en el Anticlinal de Chalán, directamente correlacionables en tiempo y en ambiente de depósito con estratos de formaciones aflorantes al oriente de Romeral, indica claramente que la propuesta de un aislamiento de estos terrenos geológicos durante el Cretáceo Superior no es correcta.

Por primera vez se reporta la presencia de sedimentos pertenecientes a la zona de *Proteacidites dehaani* (Paleocinturón Tropical) al occidente de la denominada Sutura de Romeral. En la Figura 5, se presenta un esquema geológico regional de la distribución de los sedimentos del Maastrichtiano Tardío en Colombia, en el cual se incluye las áreas de afloramiento de la Formación Cansona.



- | | | |
|--|---|--|
| ① Quebrada Peñitas
Fm. Cansona
Dueñas & Gómez | ⑥ Pozo Concepción 154
La Paz Shale
Germeraad et al (1968) | ⑪ Quebrada La Mora
Fm. Colón
Germeraad et al (1968) |
| ② Cuenca Catatumbo
Fm. Colón
Dueñas 1987 | ⑦ Lago de Maracaibo
Área Central Norte
La Paz Shale
Germeraad et al (1968) | ⑫ Sección Camino Rubio
Fm. Colón Mito Juan
Germeraad et al (1968) |
| ③ Cuenca Cesar
Fm. Molino
Dueñas 1987 | ⑧ Sección Río Tucuco
Fm. Colón
Germeraad et al (1968) | ⑬ Fm. Guaduas
Sarmiento ((1994) |
| ④ Sección Río Molino
Fm. Colón
Yepez (2001) | ⑨ Sección Río Mullapas
Fm. Colón
Germeraad et al (1968) | ⑭ Sección Río Lebrija
Fm. Umir
Germeraad et al (1968) |
| ⑤ Sección Riecito Mache
Fm. Colón
Germeraad et al (1968) | ⑩ Sección Río Loro
Fm. Colón Mito Juan
Yepez (2001) | ⑮ Sección Pie de Monte Llanero
Fm. Guaduas
Sarmiento & Guerrero (2000) |

Figura 4. Distribución de sedimentos pertenecientes a la zona de *Proteacidites dehanni* Germeraad *et al.*, (1968)

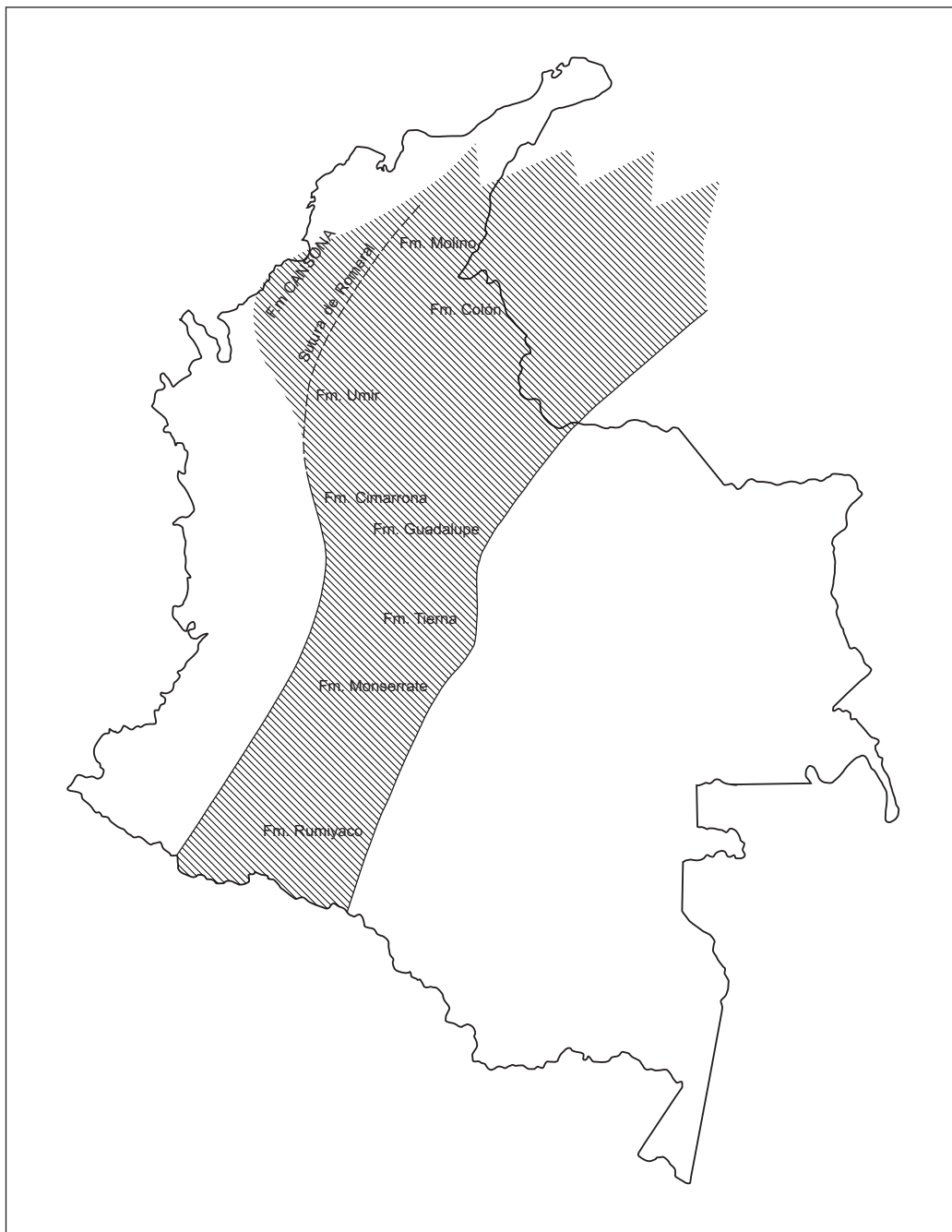


Figura 5. Mapa paleogeográfico del Maastrichtiano. Adaptado de Villamil, 1999 y Higgs, 2009

Conclusiones

Con base en las asociaciones de palinomorfos recuperadas, se asigna una edad Cretáceo Tardío a los sedimentos de la Formación Cansona, los cuales fueron depositados en un ambiente marino somero cercano a la línea de costa. Estas asociaciones de palinomorfos son muy similares a las repor-

tadas en sedimentos correlacionables en edad y ambientes de depósito aflorantes a lo largo y ancho de la Cordillera Oriental.

Desde el punto de vista paleogeográfico, la presencia de los sedimentos de la Formación Cansona al occidente de la Sutura de Romeral indica que los Terrenos Geológicos a am-

bos lados de la Sutura de Romeral no evolucionaron durante el Cretaceo Tardío en forma independiente. Por lo tanto, es muy importante entender qué fuerzas tectónicas aislaron el bloque del Anticlinal de Chalán, y como actuaron dichas fuerzas durante la evolución del Caribe colombiano.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Agencia Nacional de Hidrocarburos de Colombia (A.N.H.) y a BIOSS SAS el permitirnos publicar este trabajo. Al mismo tiempo agradecemos los oportunos y acertados comentarios que hemos recibido del comité editorial de la revista ACCEFYN.

Bibliografía

- Bioss, Ltda.** (2005) Interpretación geológica de la cuenca del Valle Inferior del Magdalena. Reportes internos. Bogotá.
- Clavijo, J.; Barrera, R.** (2001) Geología de las Planchas 44 Sincelejo y 52 Sahagún. Escala 1:100.000 Memoria Explicativa. INGEOMINAS.
- Dueñas, H.** (1989) Asociaciones palinológicas de las Formaciones Colon y Molino Nor-Oriente Colombiano. Bol. IG-USP, Publicación Especial 7:173 – 181.
- Dueñas, H.; Duque Caro, H.** (1981) Geología del Cuadrángulo F – 8 Planeta Rica. Boletín Geológico INGEOMINAS 24(1):1 – 35.
- Duque Caro, H.** (1972) Ciclos tectónicos y sedimentarios en el Norte de Colombia y sus relaciones con la Paleocología. Boletín Geológico INGEOMINAS 19(3):1 – 23.
- Duque Caro, H.; Guzman, G.; Hernandez, R.** (1996) Mapa Geológico de la Plancha 38, Carmen de Bolívar. INGEOMINAS, Bogotá.
- Germeraad, J.H.; Hopping, C.A.; Muller, J.** (1968) Palynology of Tertiary sediments from Tropical areas. Review of Palaeobotany and Palynology, 6: 189 – 348.
- Guerrero, J.; Sarmiento, G.** (1996) Estratigrafía física, Palinológica, Sedimentológica y Secuencial del Cretacico Superior y Paleoceno del Piedemonte Llanero. Implicaciones en Exploración Petrolera. Geología Colombiana 20:3 – 66. Departamento de Geociencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Guzman, G.** (2007) Stratigraphy and Sedimentary Environment and Implications in the Plato Basin and the San Jacinto Belt Northwestern Colombia. Doctoral Thesis, University of Liege.
- Lentin, J.K.; Williams, G.L.** (1980) Dinoflagellate provincialism with emphasis on Campanian Peridiniaceans. American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation (No. 7), p. 1 – 47.
- Sarmiento, G.** (1992) Palinología de la Formación Guaduas – estratigrafía y sistemática. Boletín Geológico INGEOMINAS 32:45 – 126.
- Sarmiento, G.; Guerrero, J.** (2000) Palinología del Santoniano Tardío al Maastrichtiano del Piedemonte Llanero Colombiano. Correlación con el Paleocinturón Tropical. Geología Colombiana 25:111 – 147.
- Schrank, E.** (1987) Paleozoic and Mesozoic Palynomorphs from northeast Africa (Egypt and Sudan) with special reference to Late Cretaceous pollen and dinoflagellates. Berliner Geowissenschaftliche Abhandlungen (A), 75:249 – 310.
- Villamil, T.** (1999) Campanian - Miocene tectonostratigraphy, depocenter evolution and basin development of Colombia and Western Venezuela. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 153: 239 – 275.
- Williams, G.L.; Bujack, J.P.** (1985) Mesozoic and Cenozoic Dinoflagellates. In Bolli, H. M., Saunders, J.B. and Perch-Nielsen, K. (eds). Plankton Stratigraphy. Cambridge University Press, Cambridge, p. 847 – 964.
- Williams, G.L.; Stover, L.E.; Kidson, E.J.** (1993) Morphology and Stratigraphic ranges of selected Mesozoic – Cenozoic dinoflagellate taxa in the Northern Hemisphere. Geological Survey of Canada. Paper 92(10):1 – 37.
- Yepes, O.** (2001) Maastrichtian – Danian Dinoflagellates cyst Biostratigraphy and Biogeography from two Equatorial sections I Colombia and Venezuela. Palynology, 25:217 – 249.

Recibido: febrero 20 de 2013

Aceptado: 10 de marzo de 2014

A CODE TO CALCULATE HIGH ORDER LEGENDRE POLYNOMIALS AND FUNCTIONS

UN CÓDIGO PARA EL CÁLCULO DE POLINOMIOS Y FUNCIONES DE LEGENDRE DE ALTO ORDEN

I. A. Selezneva, Yu. L. Ratis*, E. Hernández**, J. Pérez-Quiles and P. Fernández de Córdoba***

ABSTRACT

I. A. Selezneva, Yu. L. Ratis, E. Hernández, J. Pérez-Quiles and P. Fernández de Córdoba: A code to calculate high order Legendre polynomials and functions. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **37** (145): 541-544, 2013. ISSN 0370-3908.

In this paper we present, with a pedagogical aim, a method to calculate the associated Legendre functions and polynomials. The method uses stable recurrence relations involving these functions.

Keywords: legendre associated functions, Legendre polynomials, recurrence relations, stability.

RESUMEN

En este trabajo se presenta, con una finalidad pedagógica, un método para evaluar funciones y polinomios de Legendre. El método utiliza relaciones de recurrencia estables que involucran a estas funciones.

Palabras clave: funciones asociadas de Legendre, polinomios de Legendre, relaciones de recurrencia y estabilidad.

Introduction

Spherical harmonic functions and associated functions of Legendre of the first and second kind $(P_n^{(m)}(z), Q_n^{(m)}(z))$ [1,2] are related to most of the special functions of mathematical physics. For example, they appear in the computation of atomic electron configurations [4], in the representation of electromagnetic fields in materials and at surfaces and inter-

faces [5], and in the characterization of some forms of electromagnetic radiation [6]. Apart from these works, we refer to the reader to [11,12,13] and references therein for other applications and the recent discoveries about Legendre's functions. They are solutions of Legendre's equat.

$$(1 - z^2) \frac{d^2 w}{dz^2} - 2z \frac{dw}{dz} + \left[n(n+1) - \frac{m^2}{1-z^2} \right] w = 0. \quad (1)$$

* Samara State Aerospace University named after Academician S.P. Korolev Samara, Russia

** Department of Mathematics, Faculty of Informatics, Universidad de Pinar del Río, Pinar del Río, Cuba

*** Instituto Universitario de Matemática Pura y Aplicada, Universitat Politècnica de València, València, Spain

Solution of this equation are analytical in z , n and m . Usually n is called the degree and m the order. Solutions of this equation are polynomials for n integer and even, and m integer such that $0 \leq m \leq n$. In the case of n odd they are not polynomials, although the whole set of solutions are known as Legendre Polynomials. If $m = 0$, then the solution are the well-known Legendre polynomials. Usually, when one uses these functions in applied problems, it is necessary to compute them for all n, m in a wide range, which is computationally expensive.

In the case of Legendre's Polynomials, there exists an explicit form of the polynomials $P_n(z)$, given by the formula of Rodrigues,

$$P_n(z) = \frac{1}{2^n n!} \frac{d^n}{dz^n} (z^2 - 1). \tag{2}$$

Expanding this formula, one obtains,

$$P_n(z) = \sum_{k=0}^{[n/2]} (-1)^k \frac{(2n-2k)!}{2^n k! (n-2k)!} x^{n-2k}, \tag{3}$$

where $[n/2]$ is the integer part of the number $n/2$.

Whereas for small values of n , the computation of Legendre's polynomials using (3) is trivial, when $N \gg 1$ several accuracy and stability problems arise. One should be tempted to use the recurrence relation,

$$(n+1)P_{n+1}(z) - (2n+1)zP_n(z) + nP_{n-1}(z) = 0, \tag{4}$$

since $P_0(z) = 1$ and $P_1(z) = z$. However, the ascending recursion formula (4) is also unstable. This is related to the fact that in the interval $(-1,1)$ the norm of the polynomial $\|P_n(z)\|$ diminishes as $1/\sqrt{(n)}$ [6]. In other words, the use of a recursion that produces a monotonically descending sequence in norm, leads to a rapid accumulation of round-off errors.

In this paper we present a suitable algorithm to compute the associated Legendre functions $P_n^{(m)}(z)$, which includes as especial case the Legendre polynomials $P_n(z)$. In fact, $P_n(z) = P_n^{(m)}(z)$ for $m = 0$ and n integer, since [1]

$$P_n^{(m)}(z) = (1-z^2)^{\frac{m}{2}} \frac{d^m P_n(z)}{dz^m}. \tag{5}$$

The formula (4) is computationally stable for the regular solutions $P_n(z)$ of Legendre's equation (1) using backward recursion. In this case, as the norm of polynomials $P_n(z)$ and $P_{n-1}(z)$ is smaller than the norm of $P_{n-2}(z)$, there is not round-error accumulations. As there are not cancellations, the finiteness of the mantissa does not influence in the error of each step in the recursion.

Of course, if backward recursion has to be applied by using (4), one needs initial values $P_N(z)$ and $P_{N-1}(z)$. The evaluation of these values is very expensive for great values of N using formula (3). Furthermore, the computational implementation of (3) generates additional problems, related to the round-off error and also to accumulation of error in the subtraction of closed values.

The computation of the associated Legendre functions $P_n^{(m)}(z)$ in physical and/or engineering problems results as frequent as those of Legendre polynomials $P_n(z)$, so it is very useful that the algorithm computes both the polynomials and functions. Following the same strategy of [7,9,10] it is possible to find the functions $P_n^{(m)}(z)$ and the polynomials $P_n(z)$ in an unified algorithm.

Solutions of equation (1) [8] are subordinated to the recursion relations

$$(n-m+1)P_{n+1}^{(m)}(z) - (2n+1)zP_n^{(m)}(z) + (n+m)P_{n-1}^{(m)}(z) = 0, \tag{6}$$

and

$$P_n^{(m+2)}(z) - 2(m+1)\frac{z}{\sqrt{1-z^2}}P_n^{(m+1)}(z) + (n-m)(n+m+1)P_n^{(m)}(z) = 0, \tag{7}$$

where initial values are given by

$$P_n^{(0)}(z) = \frac{(2n)!}{2^n \cdot n! \cdot 0!} \cdot (1-z^2)^{\frac{n}{2}}, \tag{8}$$

and

$$P_n^{(n-1)}(z) = \frac{(2n)!}{2^n \cdot n! \cdot 1!} \cdot z \cdot (1-z^2)^{\frac{n-1}{2}}. \tag{9}$$

However, recursion (7) is computationally unstable backwards. The nature of this instability is the same as in the forward recursion (3) for Legendre's polynomials $P_n(z)$. This is a consequence of the rapid accumulation of error on the computed value Y_n from the standard trinomial recursion relation

$$y_{n+1}(z) = p_n(z)y_n(z) + q_n(z)y_{n-1}(z). \tag{10}$$

The associated function of Legendre $P_n^{(m)}(z)$ is analytic on $m, -n \leq m \leq n$, and for a fixed value of n , the norm $\|P_n^{(m)}(z)\|$ monotonically increases with m . Connection between the associated functions of Legendre for the negative and positive values m it is given by the relationship, [1]

$$P_n^{(-|m|)}(z) = (-1)^{|m|} \frac{(n-|m|)!}{(n+|m|)!} \cdot P_n^{(|m|)}(z) \tag{11}$$

From the formulas (8), (9), (11) it follows that

$$P_n^{(-n)}(z) = \frac{(-1)^n}{2^n n!} (1-z^2)^{\frac{n}{2}}, \tag{12}$$

$$P_n^{(1-n)}(z) = -2nz(1-z^2)^{-\frac{1}{2}}P_n^{(-n)}(z). \tag{13}$$

Using (11), (12) and (13) it is possible to find the initial values $P_n^{(-n)}(z)$, $P_n^{(1-n)}(z)$, which permits to compute Legendre $P_n^{(m)}(z)$ for all $|m| \leq n$ on the basis of the steady ascending recursion (7).

As a particular case, this formula is also useful to compute $P_n^0(z)$ which can be readily used to compute $P_n^o(z)$ backwards in a very fast and accurate way. Moreover, the error of the algorithm can be estimated by $\varepsilon = |P_n^{appr}(z) - 1|$ and $\varepsilon_1 = |P_1^{appr}(z) - z|$. In Figure 1a and 1b we plot the errors for initial $n = 100$ and $n = 30$. Both errors are in the range 10^{-14} , i.e. close to the round-off error. As we can see from Fig. 2, typical time for a run is in the range of seconds for 10.000 points.

A last question: as we want to present this work with a methodological point of view, we only sketch the main problems of Legendre recurrence formulas. We refer to [11] or [14] for more formal comparisons.

Codes developed

The subroutine flgndr computes accurately the values of Legendre's function for any $z \in (-1,1)$ and all m integer in $-n \leq m \leq n$. The maximum possible n is 120. This limitation is due to the small value of P_{120}^{120} , which cannot be accurately described in double precision.

In this subroutine, z is a column vector containing the points where Legendre's functions are going to be calculated, and n is the degree. Output is a matrix, pnm, of size $[length(z), 2n + 1]$ containing the values of $P_n^{(m)}$ for $-n \leq m \leq n$.

```
function pnm = flgndr(z,n)
nz = length(z);
pnm = zeros(nz,n+1);

fac = prod(2:n);
sqz2 = sqrt((1.0-z.*z));
hsqz2 = 0.5*sqz2;
ihsqz2 = z./hsqz2;
```

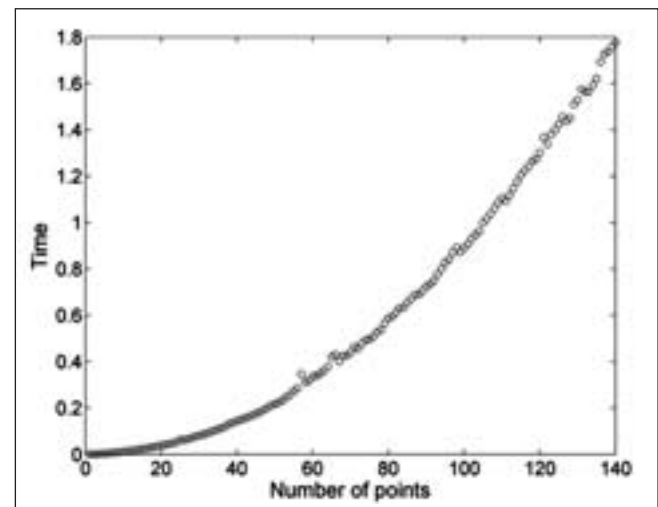


Figure 2. Computation time depending on the degree for 10000 points

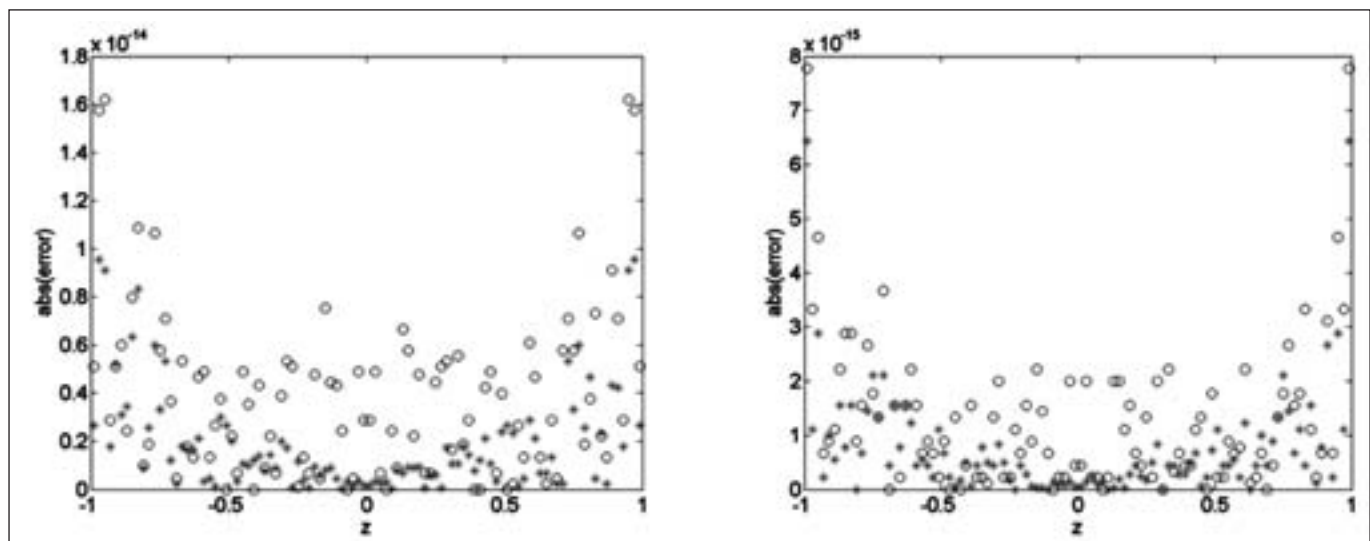


Figure 1. Error on the computation of $P_0(z)$ (circles) and $P_1(z)$ (asterisks). The backward recursion starts at $n = 100$ (left) and $n = 30$ (right).

```

if (n==0)
    pnm(:,1) = 1.0;
    return
end
if (n==1)
    pnm(:,1) = -0.5*sqz2;
    pnm(:,2) = z;
    pnm(:,3) = sqz2;
    return
end

pnm(:,1) = (1-2*abs(n-2*floor(n/2)))
*hsqz2.^n/fac;
pnm(:,2) = -pnm(:,1)*n.*ihsqz2;
for mr=1:2*n-1
    pnm(:,mr+2)=(mr-n).*ihsqz2.
*pnm(:,mr+1)-(2*n-mr+1)*mr*pnm(:,mr);
end
end

```

Using the previous routine, it is possible to compute $P_n(z)$ and $P_{n,l}(z)$, which allow us to compute Legendre polynomials. The inputs are the same that in the `flgndr` function, but the output contains the values for all the orders from 0 until n . This n is limited in double precision to 120 approximately.

```

function pn=plgndr(z,n)
pn=zeros(length(z),n+1);
% code
if (n==0)
    pn(:,1)=1;
    return
end
pnm = flgndr(z,n);
pn(:,n+1)=pnm(:,n+1);
pnm = flgndr(z,n-1);
pn(:,n)=pnm(:,n);
for nc=n-1:-1:1
    pn(:,nc)=((2*nc+1)*z.*pn(:,nc+1)-
nc+1)*pn(:,nc+2))/nc;
end

```

Conclusion

In this work we have developed and described (with pedagogical aim) an algorithm which computes Legendre's functions and polynomials. Testing shows how this method

can compute this function with a maximum error of $1e-14$. The main limitation is due to the small value of $P_n^{(-n)}$, which can be by-passed using 16 bytes precision. A generalization of this method to another orthogonal polynomials and functions are currently in progress.

Acknowledgements

Authors thank Universitat Politècnica de València funding under project SP 20120909.

Bibliografía

- [1] **Abramowitz M, and Stegun IA**, Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables, Dover, New York 1972.
- [2] **Zwillinger D**, Handbook of Differential Equations, Academic Press, Boston, 1997.
- [3] **Olver FWJ, and Smith JM**, Associated Legendre functions on the cut, *Journal of computational Physics*, 1983; **51**, 502-518.
- [4] **Slater JC**, Quantum Theory of Atomic Structure, Volume I, MacGraw-Hill, New York, 1960.
- [5] **Jackson JD**, Classical Electrodynamics, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1998.
- [6] **Aksenov EP**, Special functions in the celestial mechanics, GlavnayaRedaktsiyaFiziko-MatematicheskoyLiteratury, Nauka, Moskva, in Russian, 1986, 320 pages.
- [7] **RatisYuL, and Fernández de Córdoba P**, A code to evaluate (high order) Bessel functions based on the continued fractions method, *Computer Physics Communications* 1993; **76**, 381-388.
- [8] **Segura J, and Gil A**, Evaluation of Associated Legendre functions off the cut and parabolic cylinder functions, *Electronic transactions on numerical Analysis* 1999; **9**, 137-146.
- [9] **Bastardo JL, Abrahamm Ibrahim S, Fernández de Córdoba P, Urchueguía JF, and RatisYuL**, Evaluation of Fresnel integrals based on the continued fractions method, *Applied Mathematics Letters*, 2005; **18**, 23-28.
- [10] **Selezneva IA**, A rapid algorithm for computing special functions in mathematical physics, Vital problems of contemporary natural science, Samara, *Intercollegiate collection of scientific papers dedicated to Alexander IvanovichFedosov's memory*, 2004; **1**, 22-26.
- [11] **Gil A, Segura J, and Temme N**, Numerical Methods for special functions. SIAM, Philadelphia, PA, 2007.
- [12] **Gil A, Segura J, and Temme N**, Basic methods for computing special functions. Recent advances in computational and applied mathematics, 67-121, Springer, Dordrecht, 2011.
- [13] **Olver FWJ, Lozier DW, Boisvert RF, and Clark CW**, NIST Handbook of Mathematical Functions, U. S. Dept. Commerce, Washington. Cambridge University Press, New York, 2010.
- [14] **Schneider I, Segura J, Gil A, Guan X, and Bartschat K**, A new Fortran 90 program to compute regular and irregular associated Legendre functions. *Comput. Phys. Comm.* 181 (2010), no.12, 2091-2097.

Recibido: 28 enero de 2013

Aceptado: 13 de noviembre de 2013