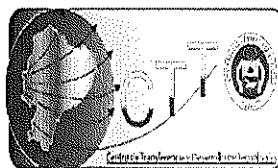




**MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL
INSTITUTO ANTÁRTICO ECUATORIANO
GUAYAQUIL**



**MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL
INSTITUTO ANTARTICO ECUATORIANO**

INFORME DE AVANCE

**NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS Y
EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN HONGOS Y
MACROLÍQUENES, ESTACIÓN PEDRO VICENTE
MALDONADO, ANTARTIDA, ECUADOR C-05-13**

AÑO/PERIODO: 2013

INFORME DE AVANCE

AÑO 2013

1. DATOS GENERALES

1.1.Nombre del Proyecto

Niveles de concentración de metales pesados y efectos del cambio climático en macrohongos y macrolíquenes, estación Pedro Vicente Maldonado, Antártida, Ecuador

1.2 Personal Participante e Instituciones Ejecutoras

Dr. Paul Gamboa Trujillo
Ing. Marcia Valenzuela
Blga. Rosa Batallas
M.Sc.Alba Yáñez
Eg. Tanya Calahorrano
Eg. Angel Sandoval

Institución Ejecutora:

Facultad de Ingeniería Química, Centro de Transferencias y Desarrollo de Tecnologías Universidad Central del Ecuador

Instituto Antártico Ecuatoriano -Senescyt

Responsable (s) del Proyecto:

Director: Dr. Paúl Gamboa Trujillo
Coordinador Técnico: Dr. Paúl Gamboa Trujillo
Coordinador Administrativo: Ing. Marcia Valenzuela

1.3 Hipótesis General del Proyecto

- Los hongos y líquenes presentan un alto grado de metales pesados (Zn, Cr, Co, Cu, Cd, Pb), debido a la cantidad de desechos contaminantes que son tirados al mar por las grandes industrias y llegan a la Antártida por el oleaje o corrientes de aire.
- El cambio climático afecta a las poblaciones de macrohongos y macrolíquenes.
- Los hongos colectados entre briofitos presentan alto potencial de bioabsorción de metales pesados.

- La diversidad de líquenes es alta en el área donde está ubicada la Estación científica Pedro Vicente Maldonado.

1.4 Año/Periodo de Ejecución

2013

1.5 Principales Resultados **Microhongos**

La colecta de hongos por la temporada y por las condiciones ambientales fue un tanto difícil, sin embargo pudimos localizar microhongos desarrollándose entre briofitos y en fecas de aves.

Las especies aun no están identificadas en su totalidad debido a que se utilizarán herramientas de taxonomía molecular para su confirmación, sin embargo tenemos replicados 90 especímenes en medio de agar-malta, PDA, con el objetivo de poseer bancos de micelios para análisis con taxonomía clásica y molecular además para poderlos replicar y someterlos a análisis de bioacumulación, bioabsorción, desarrollándolos en proyectos alternos de tesis de grado (Anexo 2).

Macrolíquenes

Se han identificado de forma preliminar 34 especies de macrolíquenes, una vez que se use el cromatógrafo este número se incrementará, confirmando las especies con la aplicación con identificación molecular, para lo cual estamos estandarizando protocolos de extracción de ADN en macrolíquenes con el apoyo de personal especializado del CIZ-UCE, que actualmente conforman el proyecto.

2. INFORME TÉCNICO

2.1. Resumen

Para la colecta de muestras se establecieron 6 zonas de muestreo, tres en el entorno de la Estación Científica y una en las islas Barrientos, Dee y Torres. En cada zona se tomaron datos de cobertura y frecuencia de las especies encontradas, así como también datos geográficos y ecológicos. Se colectaron varios ejemplares en diferentes tipos de sustratos ya sean estos briofitos o fecas en el caso de hongos y en rocas en el caso de macrolíquenes, estas muestras fueron debidamente colocadas en fundas de papel y secadas para su posterior traslado hasta el Ecuador continental, para el caso de conservación de fragmentos para extracción de ADN se utilizaron tubos de 1,5ml y petrifilm para conservación de cepas. En laboratorio todas las muestras están siendo analizadas química y morfológicamente, y con ayuda de bibliografía especializada también están siendo identificadas aplicando taxonomía clásica y molecular. Para hongos se han identificado 92 morfoespecies, sin embargo estas deben pasar por un análisis

exhaustivo de identificación para confirmar datos. En cuanto a macrolíquenes se han determinado 34 especies pertenecientes a 22 géneros y 19 familias. La especie más representativa es *Usnea antartica*. Los géneros con mayor número de especies son *Buellia* (7) y *Cladonia* (6), el resto de géneros apenas presentaron una especie. Las familias con mayor presencia en las áreas de estudio son Cladoniaceae y Caliciaceae.

2.2 Introducción

Hongos

El conocimiento de que los hongos son biodegradadores de moléculas complejas no es un tema nuevo, sin embargo el interés que hoy en día tiene el Continente Antártico debido a ser un lugar en el que escasamente se conoce la micobiota que posee, permite que se tenga un interés en los organismos fúngicos que se pueden encontrar en la muestras de suelo así como el comportamiento que pueden tener en las pruebas a las que se les va a someter ya que son organismos que están adaptados a vivir en un ambiente extremo y pueden bioabsorber agentes contaminantes, utilizándolos como bioindicadores de cambios y procesos adaptativos.

Los hongos toman los nutrientes mediante absorción, produciendo enzimas que les permiten descomponer polímeros en moléculas más simples, aunque esta característica se presenta debido a su habilidad de comportarse como parásitos, simbioses o saprofitos para producir estas enzimas, estos organismos dependen de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y otros minerales, los que pueden ocasionar efectos estimuladores o inhibidores de acuerdo con la proporción de sustratos y productos, por lo cual pueden ser utilizados como agentes biocontroladores de diversos organismos como plagas, esto conlleva que al usarlos se puede reducir el uso de agentes químicos que contaminan el ambiente, afectan a la salud del ser humano y demás organismos de forma indirecta (Osorio, 2010).

El aislamiento de microorganismos fúngicos a partir de ecosistemas contaminados o de hábitats evidencia la existencia de ciertos hongos capaces de biotransformar hidrocarburos en compuestos menos tóxicos, permite el desarrollo de la micorremediación como una estrategia viable para la reparación de suelos contaminados con hidrocarburos (Pernía *et al.*, 2012).

Retamales (2012, citado en Barticevic, 2012) precisa que el continente Antártico es un lugar donde se dan las temperaturas más frías y la mayor acumulación de hielo, por lo tanto es la mayor reserva de agua dulce y el regulador de la temperatura del planeta. Aquí se desarrolla la vida en condiciones singulares. Por lo que la investigación se presenta como una oportunidad para el descubrimiento de aplicaciones tanto para Ecuador como para el continente frío, ya que es posible encontrar en él, formas de vida que sean fuente de interés para la ciencia, e

incluso obtener de ellas sustancias que puedan convertirse en productos de uso comercial, brindando beneficios a otros lugares apartados de dicho continente (Sánchez, 2007).

Además incentiva futuros estudios en el campo de la micología puesto que, según Aisyah (2008) se han analizado más de 100 muestras de suelo de la Antártida continental y cuenta con más de 200 cepas de hongos, que pueden ser origen de futuras investigaciones.

Macrolíquenes

Los líquenes son las especies más representativas en la Antártida y sobre éstos se han realizado algunos estudios en diferentes estaciones de otros países, lo que ha permitido tener un mejor conocimiento de la biología y ecología de éstos organismos. Sancho y Pintado (2011) en su trabajo "Ecología vegetal en la Antártida" cita la presencia de más de 350 especies de líquenes así como, presenta análisis de otros proyectos de su autoría donde han sido analizados los efectos del cambio climático reflejado en el crecimiento anual de los líquenes y sus procesos de fotosíntesis. Piñero *et al.* (2012), también ha aportado con el conocimiento de líquenes en la Antártida al analizar la composición y estructura de la comunidad de líquenes presente en la Base Científica Antártica Artigas, Bahía Collins, Isla Rey Jorge. Dicho estudio aportó con información relevante para llevar a cabo planes de manejo de esta zona y ahora sirven como base para estudios amplios y profundos de las comunidades terrestres (líquenes, musgos y plantas vasculares) con el fin de evaluar a largo plazo los posibles impactos generados por cambios climáticos.

Otras publicaciones como "Lichen Life in Antarctica" nos permiten conocer la ecología y la importancia de estas especies para las evaluaciones de cambio climático; Sancho & Pintado (2004) y Logan (2007); en sus publicaciones también mencionan la misma importancia y la necesidad de continuar con proyectos de biomonitoreo líquénicos.

Específicamente en la Estación Pedro Vicente Maldonado se ha realizado un "Estudio Preliminar de la Cobertura Superficial en la Isla Greenwich, Antártida"; por la Escuela Superior Politécnica del Litoral" enfocado en el análisis de musgos y plantas vasculares (Ordoñez, *et al.*, 2008); y Socola (2001) en un estudio de cobertura vegetal cita la presencia de 38 especies líquénicas.

Hasta el momento no se han encontrado estudios que involucren a macrolíquenes para determinar concentraciones de metales pesados y los efectos que produce el

cambio climático en estos organismos en la Estación Pedro Vicente Maldonado, Ecuador, Antártida.

2.3 Objetivo General

Determinar los niveles de metales pesados y efectos del cambio climático en macrohongos y macrolíquenes.

2.4 Objetivos Parciales

- Identificar valores de concentración de metales pesados en las especies fúngicas hongos y líquenes.
- Obtener datos con información de estado morfológico y poblacional de organismos fúngicos.
- Identificar los cambios morfológicos y poblacionales desde el año uno de la investigación de las especies fúngicas por efecto de cambios climáticos.

2.5 Área de Estudio

El proyecto se desarrolla en la Estación Pedro Vicente Maldonado ubicada en la Isla Greenwich e islas aledañas (Isla Barrientos, Dee y Torres), en las siguientes coordenadas y altura.

LUGAR		COORDENADAS		ALTURA	HUMEDAD
			UTM	msnm	%
ISLA GREENWICH	SECTOR A	21 E			
		0358223	3072764	34	36
		21 E			
		0358219	3072765	29	69
	SECTOR B	21 E			
		0358219	3072763	29	84
		21 E			
		0358218	3072768	30	82
		21 E			
		0358774	3072694	18	41
		21 E			
			3072693	18	50

LUGAR		COORDENADAS		ALTURA	HUMEDAD
			UTM	msnm	%
		0358776			
		21	E		
		0358774	3072691	18	44
		21	E		
	SECTOR C	0358773	3072692	18	45
		21	E		
		0359140	3072326	26	77
		21	E		
		0359141	3072324	26	73
		21	E		
		0349134	3072322	26	71
		21	E		
	ISLA BARRIENTOS	0359135	3072326	26	70
21		E			
0358060		3077711	40	50	
21		E			
0358058		3077714	40	59	
ISLA DEE	21	E			
	0358062	3077718	40	55	
	21	E			
	0358062	3077716	40	55	
	21	E			
	0356288	3075476	100	66	
	21	E			
	0356289	3075473	100	64	
	21	E	3075473	100	74

LUGAR	COORDENADAS		ALTURA	HUMEDAD
		UTM	msnm	%
	0356285			
	21	E		
	0356283	3075478	99	77
ISLA TORRES	21	E		
	0358903	3076959	50	67
	21	E		
	0358903	3076957	52	86
	21	E		
	0358999	3076957	52	86
	21	E		
	0358898	3076961	49	85

2.6 Cronograma de Trabajo

ACTIVIDADES	AÑO 2013			
	mes 1	mes 2	mes 3	mes 4
Objetivo Específico 1				
Identificación taxonómica				
Elaboración lista de especies presentes				
Recopilación artículos y claves taxonómicas				
Objetivo Específico 2				
Identificación taxonómica de especies a ser sometidas a análisis de bioacumulación				
Elaboración de medios alternativos para cultivo <i>in vitro</i>				
Análisis bioacumulación de metales pesados				

Objetivo Específico 3				
Ingreso información base o inicial				
Replicación de cepas				
Análisis morfológicos				

2.7 Metodología aplicada y Materiales utilizados

Hongos

Para el cultivo de hongos en el primer año se aplico medios de cultivo para poder preservar las cepas hasta 6 meses y refrescar cada cepa luego de este periodo, usamos el medio de Cultivo Agar Malta, es un medio que se usa regularmente para cultivo y recuento de hongos, para un litro de agua se requieren 20 g de extracto de malta y 20 g de Agar, pero el mismo puede variar según la dureza que se requiera en el medio y según el propósito (Manual, 2008).

Luego la siembra se realiza con el fin de aislar los hongos en un cultivo puro, consiste en dejar desarrollar el hongo bajo condiciones en las que pueda desarrollar y esporular convenientemente, para ello es necesario verter el medio de cultivo, dejarlo enfriar, acidificarlo si fuera necesario y colocar una gota del hongo a sembrar. Se realiza por medio de una aguja o de un asa, ya sea por un simple toque o por rayado continuo, se incuba hasta que el hongo ha crecido y esté esporulando (Ames & Cañedo, 2004), (Manual de técnicas de análisis de suelos, 2008).

Para la descripción de los hongos se efectuará mediante una observación microscópica de sus estructuras, es necesario realizar una tinción o coloración. También se puede tocar levemente la superficie de una colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente y pegarla sobre una lámina portaobjetos, con el empleo de claves taxonómicas (Ames & Cañedo, 2004) y se realizará identificación con taxonomía molecular aplicando técnicas moleculares y comparación de secuencias con el apoyo de la base Gen Bank, realizando un BLAST de cada especie para ver porcentajes de identificación.

Macrolíquenes

Identificación de especies

Las muestras líquénicas colectadas (metodología explicada en el informe de campo previamente entregado) en los diferentes puntos de muestreo fueron

montadas en sobres de papel bond y anotados sus respectivos códigos de colecta.

En laboratorio los líquenes están siendo analizados morfológica, anatómica y químicamente.

El análisis morfológico y anatómico se lo realiza con ayuda de un estéreo-microscopio marca Leica EZ4 y un microscopio óptico Olympus C X 31 en donde se analizan caracteres como: tipo de talo, coloración, superficie superior e inferior, médula, presencia de propágulos vegetativos y estructuras reproductivas sexuales (apotecios, esporas).

Los análisis químicos se están realizando inicialmente con Testes de coloración que permiten reconocer las posibles sustancias liquénicas presentes. Para realizar estas técnicas se utiliza hidróxido de potasio al 10% (Test K) y cloro (Test C); y se aplica aisladamente K y C, o C inmediatamente después de la aplicación de K (Test KC), en el córtex y la médula del líquen. Las reacciones obtenidas son anotadas, por ejemplo K + amarillo o K-.

Otras técnicas que se aplicarán para determinación de las sustancias liquénicas (importantes para identificar especies) serán la observación del líquen bajo luz ultravioleta y cromatografía de capa delgada.

Para la identificación y distribución de los líquenes se está utilizando la siguiente bibliografía especializada: Lindsay (1979), Logan (2007), Olech (1989; 1990), Osyczka & Olech (2005), Piñeiro *et al.* (2012) Socola (2001), Spielmann & Batista (2012).

También se cuenta con la colaboración de especialistas liquénicos: Adriano Spielmann (Brasil), Ángel Ramírez (Perú) y Jesús Hernández (Venezuela) que han viajado a la Antártida para aportar al estudio de estos organismos en sus respectivas estaciones.

Análisis de Metales Pesados de hongos y macrolíquenes

El análisis de metales pesados se los realizará en un laboratorio especializado. Para cada muestra se determinará: Pb, Cd, Hg, Zn, Cu.

Las especies fruticasas a ser analizadas serán: 250 gr. de cepas fúngicas en micelio y líquenes de las especies *Ramalina telebrata*, *Sphaerophorus globosus*, *Usnea antarctica* por ser las más representativas.

2.8 Resultados

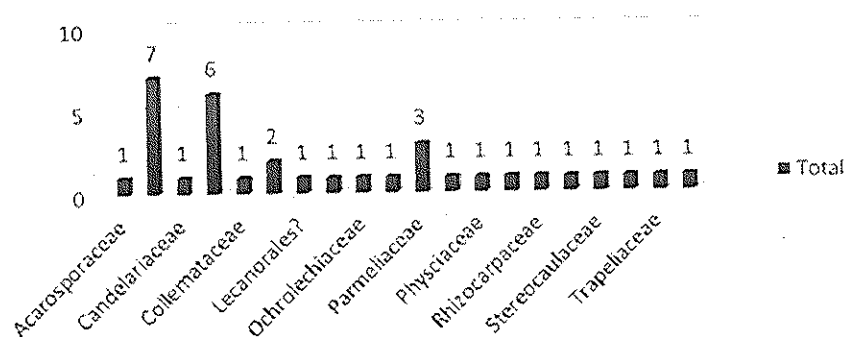
Hongos

Se obtuvieron 92 especímenes de microhongos los mismos que están en proceso de identificación aplicando herramientas de identificación aplicando taxonomía clásica y taxonomía molecular.

Líquenes

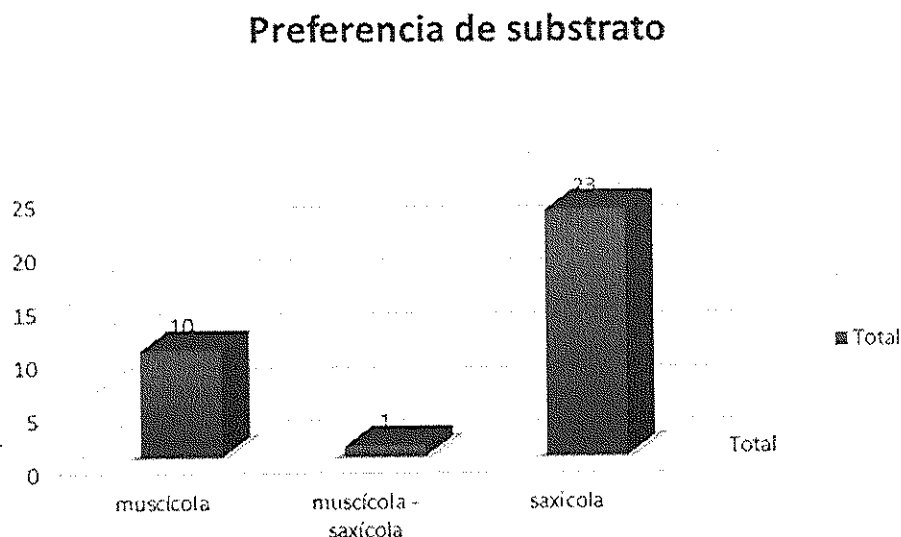
Se han analizado 150 muestras de las cuales hasta el momento se han identificado 34 especies agrupadas en 19 familias y 22 géneros (Anexo 1). La especie más abundante del área de estudio es *Usnea antarctica*. Los géneros con mayor número de especies son *Buellia* De Not. (7) y *Cladonia* P. Browne (6), el resto de géneros presentan una especie. En relación a las familias las más representativas son Caliciaceae y Cladoniaceae (Fig. 1).

Fig. 1. Familias representativas en el área de estudio



Se puede determinar hasta el momento que la mayoría de especies se desarrollan sobre rocas (saxícolas), otras especies en menor cantidad, prefieren crecer sobre los briofitos (muscícolas) (Fig. 2).

Fig.2 Preferencia de substrato de los líquenes Antárticos



2.9 Conclusiones preliminares

- Las especies fúngicas tienen desarrollo preferencial en la superficie de briofitos.
- Las familias más representativas en el área de estudio son Caliciaceae y Cladoniaceae.
- La mayoría de especies liquénicas Antárticas se desarrollan en un substrato saxícola.

2.10 Recomendaciones

Para el mejor desarrollo de colectas de material biológico consideramos de vital importancia nos coloquen en la última salida planificada para el 2015, ya que en esta temporada tendremos mayor deshielo y por ende podremos llegar a los puntos de muestreo con el objetivo de tener datos para comparación.

2.11 Observaciones

Por la falta de insumos, equipos y material, muchos de los objetivos no han podido ser entregados a tiempo. Sin embargo hemos avanzado en la medida de lo posible con los recursos de la misma Universidad, por esta razón los resultados son escasos y preliminares.

2.12 Bibliografía

Lindsay D. C. Notes on Antarctic Lichens: V. The genus *Ochrolechia* Massal. Br. Antarct. Surv. Bufl., N° 26. P. 77-83. 1971.

Little L. Lichen Life in Antarctica. A review on growth and environmental adaptations of lichens in Antarctica. Individual Project for ANTA 504 for GCAS 08/09.

Logan R. Plant Survival in Antarctica: The Lichens of Continental Antarctica. University of Canterbury, 2007.

Olech, M. Lichens from the Admiralty Bay region, King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). Acta Societatis Botanicorum Poloniae, vol. 58, n 3: 493-512. 1989.

Olech, M. Preliminary studies on ornithocoprophilous lichens of the Arctic and Antarctic regions. Proc. NIPR Symp. Polar Biol., 3, 218-223. 1990.

Ordoñez N., et al., Estudio Preliminar de la Cobertura Superficial en la Isla Greenwich, Antártida. Revista Tecnológica ESPOL, Vol 2, no1, 17-21. 2008.

Osyczka. P. & M. Olech. The lichen genus *Cladonia* of King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. Polish Polar Research, vol 26, no 2, pp. 107-123. 2005.

Piñeiro V., et al. 2012. Líquenes del entorno de la Base Científica Antártica Artigas, bahía Collins, Isla Rey Jorge, Antártida, Estudio Preliminar. Polibotánica, N° 33, pp. 105-116.

Sancho. L. & A. Pintado. Ecología vegetal en la Antártida. Ecosistemas 20 (1): 42-53. 2011.

Sancho. L. & A. Pintado. Evidence of high anual growth rate for lichens in the maritime Antarctic. Polar Biol 27: 312-319. 2004.

Socola, J. Cobertura vegetal en las áreas circundantes a la estación Pedro Vicente Maldonado. Acta Antártica Ecuatoriana, PROANTEC, Ecuador, Vol. 2001.

Spielmann A, & A. Batista. Lichens on the Maritime Antarctica. Glalia 4(3): 01-28. 2012

Arboleda, V., Yaulema, F. (2008). *Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de la central hidroeléctrica del campamento secoya mediante Landfarmig.* (65 - 89). Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Bastidas, B., Ramón, R. (2011). *Los beneficios de los hongos simbiotes* (10 - 14). Argentina: El Cid.

Christensen, C. (1964). *Los hongos y el hombre: Introducción al estudio de los hongos* (1 - 75). (Trad. Gerhard, C.) México: Editorial Interamericana.

El Magno, E. (2009). *Hongos* (13 - 31). Argentina: El Cid.

Espinosa, M. (2006). *Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno Botrytis cinérea* (35 - 47). Cádiz: Laboratorio de Microbiología.

Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., Schoerder, E. (1999) *Principios de biorrecuperación* (80, 131 - 144). (Trad. Tejero, I) Madrid: Mc Graw Hill.

Molina, M. (1967). *Microbiología de suelos y técnicas fitopatológicas* (53 - 65, 161 - 188). Guatemala: Editorial Universitario.

Restrepo, M., Franco, S. Cepero, E. (2012). *Biología de hongos* (123 - 241). Colombia: Universidad de los Andes.

Solanas, A. (2009). *Biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en biorremediación de suelos* (56 - 83, 97 - 105). Barcelona: Editorial Universitario.

Vega, R. (2011). *Selección, caracterización y evaluación de hongos potencialmente utilizables en biorremediación de suelo y aguas contaminados con hidrocarburos, a nivel de laboratorio, a partir de muestras de suelo de la parroquia San Carlos, perteneciente al Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.

Arias, F.G. (2006). *El proyecto de investigación. Inducción a la metodología científica* (5ª Ed.). Caracas: Editorial Episteme, C.A.

Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: Volke, T. & Velasco, J. A. Disponible en: Google Books.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (1991). *Boletín de suelos de la FAO N°56. Manejo del suelo: producción y uso del composte en ambientes tropicales y subtropicales*. Roma: Dalzell, H. W., Biddlestone, A. J., Gray, K.R. & Thurairajan, K. Disponible en: Google Books.

Wiley, J. & Sons. (2006). *Mycoremediation. Fungal Bioremediation*. New Jersey, NJ: Harbhajan Singh-

3. ANEXOS

LISTA PRELIMINAR DE ESPECIES ENCONTRADAS EN LA ESTACIÓN PEDRO VICENTE MALDONADO E ISLAS ALEDAÑAS

Nº Especies	Familia	Especie	Autor	Substrato
1	Lecanorales	<i>Lecania brialmontii</i>	(Vain.) Zahlbr	muscícola - saxícola
2	Pannariaceae	<i>Psoroma hypnorum</i>	(Vahl) Gray	Muscícola
3	Collemataceae	<i>Leptogium menziesii</i>	(Sm.) Mont	Saxícola
4	Ramalinaceae	<i>Ramalina terebrata</i>	Hook. f. & Taylor	Saxícola
5	Rhizocarpaceae	<i>Rhizocarpon geographicum</i>	(L.) DC.	Saxícola
6	Teloschistaceae	<i>Caloplaca regalis</i>	(Vain.) Zahlbr.	Saxícola
7	Physciaceae	<i>Physcia caesia</i>	(Hoffm.) Hampe ex Fűrnr.	Muscícola
8	Caliciaceae	<i>Buellia babingtonii</i>	(Hook. f. & Taylor) I.M. Lamb ex C.W. Dodge	Saxícola
9	Caliciaceae	<i>Buellia subpedicellata</i>	(Hue) Darb.	Saxícola
10	Caliciaceae	<i>Buellia cladorpiza</i>	I.M. Lamb	Saxícola
11	Caliciaceae	<i>Buellia coniops</i>	(Wahlenb.) Th. Fr.	Saxícola
12	Caliciaceae	<i>Buellia darbishirei</i> cf.	I.M. Lamb	Saxícola
13	Caliciaceae	<i>Buellia latemarginata</i>	Darb.	Saxícola
14	Caliciaceae	<i>Buellia</i> sp.		Saxícola
15	Mastodiaceae	<i>Mastodia tessellata</i>	(Hook. f. & Harv.) Hook. f. & Harv.	Saxícola
16	Sphaerophoraceae	<i>Sphaerophorus globosus</i>	(Huds.) Vain	Muscícola
17	Trapeliaceae	<i>Placopsis antarctica</i>	D.J. Galloway, R.I.L. Sm. &	Saxícola

Nº Especies	Familia	Especie	Autor	Substrato
			Quilhot	
18	Parmeliaceae	<i>Himantormia lugubris</i>	(Hue) I.M. Lamb	Saxícola
19	Umbilicariaceae	<i>Umbilicaria antarctica</i>	Frey & I.M. Lamb	Saxícola
20	Ochrolechiaceae	<i>Ochrolechia parella</i>	(L.) A. Massal.	Saxícola
21	Parmeliaceae	<i>Usnea aurantiacoatra</i>	(Jacq.) Bory	Saxícola
22	Parmeliaceae	<i>Usnea antarctica</i>	Du Rietz	Saxícola
23	Lecanoraceae	<i>Rhizoplaca aspidophora</i>	(Vain.) Redón	Saxícola
24	Lecanoraceae	cf. <i>Lecanora skottsbergii</i>	Darb.	Saxícola
25	Cladoniaceae	<i>Cladonia asahinae</i> cf.	J.W. Thomson	Muscícola
26	Cladoniaceae	<i>Cladonia pocillum</i> cf.		Muscícola
27	Cladoniaceae	<i>Cladonia gracilis</i> cf.	(L.) Willd.	Muscícola
28	Cladoniaceae	<i>Cladonia squamosa</i> cf.	(Scop.) Hoffm.	Muscícola
29	Cladoniaceae	<i>Cladonia</i> sp. 1		Muscícola
30	Cladoniaceae	<i>Cladonia</i> sp. 2		Muscícola
31	Stereocaulaceae	<i>Stereocaulon alpinum</i>	Laurer	Muscícola
32	Acarosporaceae	<i>Acarospora macrocyclos</i>	Vain.	Saxícola
33	Candelariaceae	<i>Candelaria murrayi</i>	Poelt	Saxícola
34	Pertusariaceae	<i>Pertusaria</i> sp		Saxícola

4. IMPACTO DEL PROYECTO

4.1 Aplicación de la investigación desarrollada a la solución de los problemas del país, para esto se desarrolló capacitaciones en el laboratorio INTECH, Chascomús-Argentina.

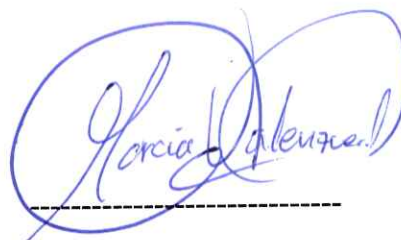
4.2 Transferencia del conocimiento o de la tecnología aplicada a partir de la investigación efectuada mediante la estructuración de informes preliminares y la ejecución de tesis de grado alternas.

Los resultados obtenidos hasta el momento y el desarrollo del proyecto fueron transmitidos en el XII Encuentro del Grupo Latinoamericano de Lichenólogos desarrollado en Venezuela. Dicho encuentro nos permitió compartir y transferir el conocimiento y adquirir nuevos.



Coordinador Técnico

Dr. Paúl Gamboa



Coordinador Administrativo

Ing. Marcia Valenzuela

ANEXO 2

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

PLAN DE TESIS

Hongos con potencial biodegradador de hidrocarburos en la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado Antártida, Ecuador.

AUTOR:	Estefanía Rocío Pilatasig Palacios
TUTOR:	Dr. Paúl Gamboa
AUSPICIO:	INAE-SENESCYT

RESUMEN

Desde el año 1967 cuando se descubrieron los primeros pozos petroleros en el Ecuador, se han registrado 794 derrames accidentales de crudo debido a fallas técnicas (Araujo, 2013), deterioro de tuberías por corrosión, fallas en operaciones y transporte, donde las consecuencias afectan a la flora y fauna de las zonas aledañas, dificultan el consumo de agua potable a poblaciones cercanas, así como a los países vecinos de Perú y Brasil donde la marea negra ha avanzado significativamente según datos registrados en mayo del 2013 (EL UNIVERSO, 2013), sin embargo los esfuerzos por controlar este tipo de desastre ambiental no son suficientes para erradicar por completo el problema ya que el control que se hace es de forma mecánica o química, sin embargo la remediación del suelo con organismos vivos es una alternativa para reducir el impacto ocasionado por esta problemática, es por ello que la micorremediación se emplea para degradar compuestos a moléculas más simples y menos tóxicas para el ambiente (Solanas, 2009); debido a que se han realizado estudios acerca del potencial biodegradador de hidrocarburos que poseen ciertos hongos continentales que también son fitopatógenos (Osorio, 2010), y a los escasos estudios de aplicación con la micobiota del continente Antártico, el presente estudio tiene como propósito evaluar cepas de hongos provenientes de la Antártida que posean potencial biodegradador de hidrocarburos, sometiéndoles a diferentes variaciones de concentración del contaminante en el medio del cultivo, temperatura y pH de las mismas que se analizarán el crecimiento del micelio y el potencial enzimático de los organismos fúngicos, realizando diferentes fases de cultivo conforme las cepas se vayan adaptando, donde los indicadores serán las pruebas químicas de cromatografía para hacer la comparación de eficacia de degradación.

INTRODUCCIÓN

La Antártida es un continente de condiciones climáticas extremas que permanece escasamente explorado, debido a que la investigación es reciente, pero son muchas las disciplinas científicas que han encontrado en este continente un enorme laboratorio natural, sin embargo los estudios de organismos fúngicos están aún emergiendo, es por ello que el propósito principal del presente estudio es la aplicación de cepas fúngicas en micorremediación, debido a que los hongos tienen hábitats muy diversos, la mayoría son terrestres y habitan en el suelo, desempeñando una actividad importante en la mineralización del carbono orgánico, siendo una característica importante cuando se compara a los hongos con las bacterias, en general tienen requerimientos nutricionales muy simples, pero su desarrollo es más lento, por lo que requieren mayor tiempo de incubación para su cultivo (Vaca, 2010).

En el Ecuador los procesos de extracción, producción, refinación, así como el transporte de petróleo y sus derivados han generado ocasionalmente accidentes técnicos u operacionales que causan deterioro en el ambiente, sin embargo existen hongos capaces de biodegradar hidrocarburos que pueden ser utilizados como estrategia en la micorremediación de suelos impactados por la actividad petrolera; la biorremediación se basa en la utilización de los microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, para transformarlo en productos inofensivos como el CO₂ y el H₂O, aunque los productos de petróleo son mezclas complejas de hidrocarburos y derivados, la biodegradación es selectiva debido a que los microorganismos no degradan por igual las distintas familias de hidrocarburos, porque pueden quedar productos residuales (Solanas, 2009), el presente estudio se basará en la evaluación de las cepas mejor adaptadas a las variaciones de concentración de contaminante, temperatura y pH, para posteriormente tener una aplicación a mayor escala, como tema de un nuevo estudio.

CAPITULO I

1. EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema

En la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado - Antártida existen estudios acerca de descripción de microbiota presente en el suelo, en Institutos Antárticos de otros países sudamericanos existe una evaluación aplicada de organismos fúngicos presentes en el continente Antártico, de hecho la evaluación de la capacidad de degradación de hidrocarburos ha sido evaluada en muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos extraídas de territorio ecuatoriano, sin embargo en la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado no existen estudios acerca de la capacidad biodegradadora que tienen los hongos sobre hidrocarburos, es por ello que este estudio generaría innovación científica en el campo de la micología en estudios antárticos.

1.2 Formulación del Problema

Existe un escaso conocimiento de las capacidades de microorganismos fúngicos provenientes de la Antártida con potencial biodegradador de hidrocarburos, que podrían ser utilizados como una alternativa para solucionar o al menos reducir el impacto ambiental que genera un derrame de petróleo.

1.3 Sistematización del Problema

La aplicación de organismos fúngicos provenientes de la Antártida con características de resistencia a condiciones extremas para la degradación de hidrocarburos no ha sido evaluada hasta la actualidad.

Escaso conocimiento de la microbiota presente en la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado, Antártida – Ecuador.

Los hongos toman los nutrientes mediante absorción, produciendo enzimas que les permiten descomponer polímeros en moléculas más simples, aunque esta característica se presenta debido a su habilidad de comportarse como parásitos, simbioses o saprofitos, para producir estas enzimas, estos organismos dependen de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y otros minerales, los que pueden ocasionar efectos estimuladores o inhibidores de acuerdo con la proporción de sustratos y productos, por lo cual pueden ser utilizados como agentes biocontroladores de diversos organismos como plagas, esto conlleva que al usarlos se puede reducir el uso de agentes químicos que contaminan el ambiente, afectan a la salud del ser humano y demás organismos de forma indirecta (Osorio, 2010).

El ciclo de producción de petróleo y sus derivados ocasionalmente ha generado un gran impacto ambiental y que pueden llegar a generar daños irreversibles a los ecosistemas, afectando a la flora, la fauna y microorganismos, sin embargo son favorecidas las especies capaces de adaptarse y crecer en presencia de estos compuestos tóxicos, donde la distribución de microorganismos depende de la presión selectiva en un determinado ambiente.

El aislamiento de microorganismos fúngicos a partir de ecosistemas contaminados o de hábitats evidencia la existencia de ciertos hongos capaces de biotransformar hidrocarburos en compuestos menos tóxicos, permite el desarrollo de la micorremediación como una estrategia viable para la reparación de suelos contaminados con hidrocarburos (Pernía et al., 2012), por lo cual tiene principal interés el presente estudio.

CAPITULO II

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes de la Investigación

Según datos del Laboratorio de Biomedicina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Institute of Ocean and Earth Science de la Universidad Malaya, Aquaculture Research Group de la Universidad Malaysia Terengganu presentado en el V Simposio Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas y II Simposio Ecuatoriano de Ciencia Polar en 2009, se realizó el aislamiento e identificación de microhongos terrestres donde fueron aislados de seis muestras de suelo de Punta Fort William, Isla Greenwich, recolectadas durante el verano antártico del 2008. Se obtuvieron un total de 269 aislados que se catalogaron en 6 géneros: *Geomyces*, *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Mucor*, *Mrakia* y *Cladosporium* (Ordóñez et al., 2009).

Con el objetivo de determinar la diversidad de hongos aislados de diferentes sustratos contaminados con hidrocarburos y sus derivados, así como determinar su capacidad degradativa, se realizaron meta-análisis que demostraron que del total de hongos reportados como aislados de crudo, sus derivados, y sustratos impactados con hidrocarburos, 83% pertenecen al Phylum Ascomycota, 10% al Phylum Zygomycota, 6% al Phylum Glomeromycota y 1% al Phylum Basidiomycota, obteniéndose la menor diversidad en suelos contaminados con diesel y gasolina. Los géneros de mayor frecuencia fueron *Penicillium* (18%), *Aspergillus* (17%) y *Fusarium* (6%). (Pernía et al., 2012).

1.2 Fundamentación Teórica

Biodegradación microbiana de hidrocarburos

Los factores que limitan la biodegradación microbiana de hidrocarburos los mismos que dependen de las características del hidrocarburo, condiciones del medio y características de los microorganismos, los mismos que pueden ser

selectivos, ya que existen diferentes fracciones de petróleo que son: los hidrocarburos alifáticos, los hidrocarburos aromáticos, las resinas y los asfaltenos. Los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen menos de 28 carbonos, aunque la hidrofobicidad, así como la facilidad para adsorberse en partículas de suelo o materia orgánica limitan también que los organismos puedan degradarlos (Solanas, 2009).

Aunque existen microorganismos que pueden degradar hidrocarburos anaeróbicamente, sabemos que el metabolismo más eficaz es el aeróbico por lo que la presencia de oxígeno será un requisito imprescindible, sin embargo en el suelo la humedad es una variable muy importante debido a que se debe encontrar un valor óptimo para permitir que el metabolismo de los microorganismos se realice de un manera normal y el que permita una buena aireación en el suelo (Christensen, 1964).

La mineralización que realizan los microorganismos es parte de la transformación de los hidrocarburos, ya que el mismo es utilizado como sustrato para el crecimiento, ya que aporta con los principales macronutrientes como carbono, hidrógeno, nitrógeno, esenciales para la vida de un microorganismo ya que forman parte de su organismo, sin embargo en su composición también se requiere de micronutrientes, los mismos que se deben proveer al medio de cultivo en el cual se desarrollará, para lo cual se puede suplementar con fertilizantes si fuere el caso (Eweis et al., 1999).

El período de aclimatación es un factor importante ya que en este lapso de tiempo las poblaciones microbianas requieren antes de empezar a degradar los compuestos presentes en el medio, pero en el caso que los microorganismos ya están adaptados el período de aclimatación es casi imperceptible, aunque existen también contaminantes accidentales este período podría alargarse (Christensen, 1964), (Molina, 1967).

Medio de Cultivo Agar Malta

Es un medio que se usa regularmente para cultivo y recuento de hongos, para un litro de agua se requieren 20 g de extracto de malta y 20 g de Agar, pero el mismo puede variar según la dureza que se requiera en el medio y según el propósito (Manual, 2008).

Siembra

La siembra se realiza con el fin de aislar los hongos en un cultivo puro, consiste en dejar crecer el hongo elegido bajo condiciones en las que pueda desarrollar y esporular convenientemente, para ello es necesario verter el medio de cultivo, dejarlo enfriar, acidificarlo si fuera necesario y colocar una gota del hongo a sembrar. Se realiza por medio de una aguja o de un asa, ya sea por un simple toque o por rayado continuo, se incuba hasta que el hongo ha crecido y esté esporulando (Ames & Cañedo, 2004), (Manual de técnicas de análisis de suelos, 2008).

Identificación y Descripción del hongo

Para la descripción del hongo se efectuará mediante una observación microscópica de sus estructuras, es necesario realizar una tinción o coloración. También se puede tocar levemente la superficie de una colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente y pegarla sobre una lámina portaobjetos, con el empleo de claves taxonómicas (Ames & Cañedo, 2004).

2. Hipótesis

H:

Los hongos aislados de muestras de suelo de la Antártida Estación Pedro Vicente Maldonado presentan potencial degradador de hidrocarburos en condiciones de laboratorio.

H₀:

Los hongos aislados de muestras de suelo de la Antártida Estación Pedro Vicente Maldonado no presentan potencial degradador de hidrocarburos en condiciones de laboratorio.

3. Caracterización de las Variables

Variables independientes:

La concentración:

Determina la efectividad de las cepas de hongos aislados.

La temperatura:

Es una variable importante en el comportamiento de las cepas y la aplicación que se quiera establecer de las mismas.

El pH:

Es determinante en el desarrollo de las cepas para la obtención de energía metabólica para la supervivencia.

Variables dependientes:

Cepas de hongos:

El crecimiento adecuado de la cepa depende del manejo de las variables.

Actividad enzimática:

Depende básicamente de la temperatura.

4. Definición de Términos Básicos

Hongos:

Miembro del Reino Fungi, eucarionte, habitualmente multicelular con nutrición absorptiva. (Restrepo et al., 2012).

Petróleo:

Compuesto químico complejo en el que coexisten partes sólidas, líquidas y gaseosas, formado por hidrocarburos, formados por átomos de carbono e hidrógeno y pequeñas proporciones de nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales, se presenta de forma natural en depósitos de roca sedimentaria y sólo en lugares en los que hubo mar (Restrepo et al., 2012).

Hidrocarburo:

Son los compuestos orgánicos más simples y pueden ser considerados como las sustancias principales de las que se derivan todos los demás compuestos orgánicos, se clasifican en dos grupos principales, cíclicos y de cadena abierta (Restrepo et al., 2012).

Micorremediación:

Un proceso que usa hongos para degradar o retener los contaminantes en el ambiente, estimulando la actividad enzimática y microbiana, el micelio reduce las toxinas in-situ (Restrepo et al., 2012).

Biodegradación:

Es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos. (Restrepo et al., 2012).

5. Fundamentación Legal

TULAS, Libro IV, de La Biodiversidad, Título I, Capítulo VIII, disposiciones generales: Vida Silvestre.- Son todos los organismos vivientes nativos del Ecuador (indígenas, endémicos y migratorios), sin distinción de categoría taxonómica (animales, plantas, mónera, protistas y hongos) y tipo de hábitat (terrestre, acuático y aéreo), que mantienen o mantuvieron al menos una población en estado natural (no domesticada o modificada). (Modificación TULAS, 2012)

CAPITULO III

1. METODOLOGIA

Se evaluarán las muestras de suelo colectadas en Febrero de 2013 en la Expedición número 17, en la Estación Pedro Vicente Maldonado en la Antártida, para determinar el potencial biodegradador de hidrocarburo, el mismo que será tomado de dos zonas de la Amazonía.

1.1 Determinación de los métodos a utilizar

Las muestras de suelo serán aisladas y purificadas, utilizando un medio de cultivo agar malta en cajas Petri probando diferentes concentraciones de hidrocarburo según Vega,(2011) ha tenido buenos resultados con 1% de petróleo, que será tomado de muestras de suelo de una localidad de la Amazonía. Se realizará el análisis químico del medio de cultivo primario de las cepas de hongos, para realizar comparaciones posteriores.

Se realizará tres repeticiones donde se hará comparaciones de acuerdo a variaciones de temperatura, variaciones de pH, más un testigo donde el contaminante estará ausente. Conforme el halo avanza se realizará la medición del mismo, así como la observación directa de la acción enzimática, para conocer la cepa mejor adaptada (Ames & Cañedo, 2004).

Una vez que el halo haya avanzado completamente sobre toda la superficie del medio de cultivo primario se realizará un cultivo secundario que contenga sustrato vegetal con el contaminante de acuerdo a la concentración y pH óptimos encontrados, donde se hará un corte de micelio para inocular en la mezcla de suelo que será contenido en frascos de vidrio de 200 g correctamente esterilizados.

Se deberá observar el avance de las cepas de hongo diariamente así como realizar el análisis de la acción enzimática, donde la cepa más adaptada y que se haya desarrollado más rápidamente en el cultivo secundario, será inoculada una parte de su micelio en un cultivo terciario en un saquillo con suelo homogenizado con hidrocarburo, el mismo que al avanzar completamente se realizará un análisis cromatográfico, para comparar si hubo degradación del hidrocarburo (Solanas, 2009).

2. Diseño de la Investigación

Se utilizará un diseño completamente al azar (DCA), con el empleo de tres variables independientes y dos variables dependientes, realizando con tres repeticiones y un testigo.

2.1 Población y muestra

Población: hongos antárticos.

Muestra: tres cepas de hongos antárticos.

2.2 Operacionalización de las Variables

CARACTERIZACIÓN	VARIABLE	DIMENSIÓN	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN
INDEPENDIENTES	CONCENTRACIÓN	Actividad enzimática	Análisis químicos
	TEMPERATURA	Actividad enzimática	Control diario de temperatura
	pH	Crecimiento	Corrección inicial del pH a cada medio de cultivo de acuerdo a la variación

			determinada.
DEPENDIENTES	CRECIMIENTO	Avance de micelio	Medición diaria del halo.
	ACCIÓN ENZIMÁTICA	Degradación del contaminante	Observación directa.

3. Técnicas e instrumentos de Investigación

Se realizará análisis químico para comparación de degradación del contaminante, el análisis de cromatografía para comprobar en la capacidad de cepas de hongos de remover hidrocarburos totales de petróleo.

Se realizará la identificación de las cepas de hongos mediante el uso de microscopio compuesto OLYMPUS CX31 y el uso de un estéreo-microscopio LEICA EZ4, con el empleo de claves taxonómicas especializadas, así como la verificación de la denominación de nombres científicos con INDEX FUNGORUM.

3.1 Validez y Confiabilidad de los Instrumentos

Las técnicas a realizarse con respecto a los análisis químicos de cromatografía han sido empleadas en un sinnúmero de estudios de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. (Manual, 2008), (Osorio, 2010), (Pernía et al., 2012), (Solanas, 2009).

La identificación mediante la utilización de claves taxonómicas, es empleada como guía para reconocimiento de todo tipo de organismos vivos, así como en el Reino Fungi es ampliamente conocido. (Ames & Cañedo, 2012), (Molina, 1967), (Ordoñez et al., 2009).

Los estudios moleculares para identificación de organismos mediante el análisis de ADN, sirve para comprobar si la identificación morfológica ha sido la correcta. (Espinosa, 2006).

3.2 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

El procesamiento de datos se realizará a partir de estadística básica, con el empleo de Excel 2010 como herramienta de análisis de datos.

4. Caracterización de la Propuesta

La presente propuesta de tesis es realizada para generar iniciación científica en el campo de la micología con la utilización de hongos presentes en la Antártida, dando aporte a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la Amazonía del Ecuador, que a su vez se espera encontrar nuevas cepas de hongos con el potencial biodegradador.

CAPITULO IV

1. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

1.1 Recursos Humanos

RECURSOS HUMANOS	FUNCIÓN
Tesista	Elaboración del trabajo de tesis.
Asistente de laboratorio	Apoyo en la realización de los análisis químicos.
Asistente de campo	Apoyo en salidas de campo.
Tutor	Orientación y corrección del trabajo de tesis.
Director de proyecto	Asesorar al tesista.

1.2 Recursos Técnicos

Laboratorio de Análisis Químico OSP – Universidad Central del Ecuador.

Laboratorio de Ciencias Químicas para todo el proceso de aislamiento, purificación, inoculación e identificación.

1.3 Materiales

Medio de cultivo agar malta.

Muestras de hidrocarburo.

Sustrato de origen vegetal como agente texturizante.

Muestras de suelo esterilizado.

Cámara de flujo laminar.

Cajas Petri.

Frascos de vidrio.

Saquillos.

Instrumentos y materiales para aislamiento e inoculación.

1.4Financieros

Financiamiento por parte del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE).

Presupuesto

N°	ACTIVIDAD	RECURSOS MATERIALES	COSTO DE ACTIVIDAD (USD)
1	Aislamiento de cepas de hongos y cultivo primario.	Cámara de flujo laminar Cajas Petri Medio de cultivo Materiales de laboratorio	1200.00 140.00 45.00 60.00
2	Análisis químicos.	Ciencias Químicas - OSP	480.00
3	Cultivo secundario de cepas purificadas.	Frascos de café Medio de cultivo Sustrato vegetal	50.00 45.00 40.00
4	Análisis químicos.	Ciencias Químicas - OSP	480.00
5	Cultivo terciario de cepas de hongos.	Saquillos Sustrato Materiales e instrumentos	30.00 120.00 60.00
6	Análisis químicos.	Ciencias Químicas - OSP	480.00 310.00
7	Elaboración e impresión del informe	Impresión y empastado	80.00
8	Gastos extras		100.00
	TOTAL		3720.00

2 Cronograma

ACTIVIDAD	DURACIÓN EN SEMANAS																			
	OCTUBR				NOVIEMB				DICIEMB				ENERO				FEBRE			
	E				RE				RE								RO			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Determinación del tema de tesis																				
Búsqueda de información																				
Análisis de artículos científicos																				
Realización del plan de tesis																				
Revisión por parte del tutor																				
Realización de la corrección del plan																				
Revisión Final																				
Revisión por parte del consejo directivo																				
Aprobación del plan de tesis																				
Aislamiento de muestras																				
Identificación de cepas																				
Análisis químico del medio																				
Selección de cepas adecuadas																				
Purificación en cultivo primario																				
Variación de temperatura																				
Inoculación en cultivo secundario																				
Inoculación en cultivo terciario																				
Análisis de resultados																				
Elaboración del informe																				
Revisión del informe																				

BIBLIOGRAFÍA

Arboleda, V., Yaulema, F. (2008). *Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de la central hidroeléctrica del campamento secoya mediante Landfarmig*. (65 - 89). Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Bastidas, B., Ramón, R. (2011). *Los beneficios de los hongos simbios* (10 - 14). Argentina: El Cid.

Christensen, C. (1964). *Los hongos y el hombre: Introducción al estudio de los hongos* (1 - 75). (Trad. Gerhard, C.) México: Editorial Interamericana.

El Magno, E. (2009). *Hongos* (13 - 31). Argentina: El Cid.

Espinosa, M. (2006). *Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno Botrytis cinérea* (35 - 47). Cádiz: Laboratorio de Microbiología.

Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., Schoerder, E. (1999) *Principios de biorrecuperación* (80, 131 - 144). (Trad. Tejero, I) Madrid: Mc Graw Hill.

Molina, M. (1967). *Microbiología de suelos y técnicas fitopatológicas* (53 - 65, 161 - 188). Guatemala: Editorial Universitario.

Restrepo, M., Franco, S. Cepero, E. (2012). *Biología de hongos* (123 - 241). Colombia: Universidad de los Andes.

Solanas, A. (2009). *Biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en biorremediación de suelos* (56 - 83, 97 - 105). Barcelona: Editorial Universitario.

Vega, R. (2011). *Selección, caracterización y evaluación de hongos potencialmente utilizables en biorremediación de suelo y aguas contaminados con hidrocarburos, a nivel de laboratorio, a partir de muestras de suelo de la parroquia San Carlos, perteneciente al Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.

NETGRAFÍA

Ames, T., Cañedo, V. (2004). *Manual de laboratorio para la identificación de hongos entomopatógenos*, (en línea). Centro Internacional de la Papa. Disponible en: <http://cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>

Araujo, A. (2013, Junio 9). *El país ha enfrentado 794 derrames desde 1967* (en línea). Diario EL COMERCIO. Disponible en: http://www.elcomercio.com.ec/negocios/Ecuador-derrames-petroleo-crudo-SOTE-OCP-danos-contaminacion-amazonia-biodiversidad_0_934706521.html

Manual de técnicas de análisis de suelos. (2008). (en línea). Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/509/analisis2.pdf>

Ordóñez, N., Ordóñez, A., Aisyah, S., Yii, H. y Cárdenas, W.B. (2009). *Aislamiento e identificación de microhongos terrestres de Punta Fort William – Antártida*, (en línea). MEMORIAS. V Simposio Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas y II Simposio Ecuatoriano de Ciencia Polar. Disponible en: http://www.iau.gub.uy/rapal2009/docs-rapal2009/DI-rapal2009/DI-32_Ecuador-INFORME_V_SIMPOSIO.pdf

Osorio, D. (2010). *Aplicaciones biotecnológicas de los hongos*, (en línea). Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Disponible en: http://issuu.com/revistahipotesis/docs/hipotesis_13

Pernía, B., Demey, J., Inojosa, Y., Naranjo, L. (2012). *Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis* (en línea). Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental. Caracas, Venezuela. Disponible en: <http://www.idea.gob.ve/>

Presidencia de la República (2012). *Tulas* (en línea). Disponible en: http://www.quitoambiente.gob.ec/index.php?option=com_k2&view=item&id=125%3Atexto-unificado-de-legislacion-ambiental-secundaria-del-ministerio-de-ambiente-tulas

Redacción Economía. (2013, Junio 14). *En Ecuador hay un derrame por semana* (en línea). Diario EL UNIVERSO. Disponible en: <http://www.eluniverso.com/noticias/2013/06/14/nota/1026781/ecuador-hay-derrame-petrolero-semana>

Vaca, I. (2010). *La Antártica: Un Laboratorio Natural para la Química de Productos Naturales Que Hay Que Proteger*, (en línea). Universidad de Chile. Disponible en: <http://www.fen.uchile.cl/uchile.portal?nfpb=true&pageLabel=not&url=74738>

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

PLAN DE TESIS

**BIOABSORCIÓN DE METALES PESADOS POR HONGOS
DE LA ESTACIÓN CIENTÍFICA PEDRO VICENTE MALDONADO-ANTÁRTIDA**

Autora: Karina Jeanneth Nagua Carrión
Financiamiento: INAE-SENESCYT

QUITO, OCTUBRE DEL 2013

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados, según Navarro et al., (2007 citado en Posada, 2012), son sustancias tóxicas para la célula, ya que tienden a bioacumularse, esto significa que en el interior del organismo biológico puede aumentar los niveles de concentración de un producto químico, lo cual podría desencadenar en algo letal como un envenenamiento. (Coello & Burgos, 2011).

La industrialización global ha generado avances al desarrollo de la humanidad y a la vez se ha constituido una gran preocupación para el ambiente, debido a la cantidad de metales pesados tóxicos y persistentes liberados a la biósfera, causando un deterioro ecológico y constituyéndose en una seria amenaza tanto para la humanidad así como para los animales. (Wiley & Sons, 2006). La Antártida pese a no ser un continente industrializado, ha sido explorado por investigadores y turistas que se interesan por él.

Aunque en estudios recientes no se han evidenciado alteraciones por los asentamientos humanos, los metales pesados en el suelo pueden alterar el equilibrio ecológico y biogeoquímico del ecosistema (Ocampo, Calisto, Gómez & Astorga, 2011). Dicho efecto antropogénico puede, a futuro, causar daño a las costas antárticas por medio de las descargas líquidas que se generan. En el país, "La extracción minera ha provocado daños al medioambiente y generando suelos con limitaciones físicas, químicas y biológicas para el establecimiento de vegetación y riesgos a la salud" (Puga, Sosa, Lebgue, Quintana & Campos, 2006, p 149).

Por lo tanto en el país es necesario disponer de técnicas apropiadas que nos permitan recuperar los suelos contaminados utilizando el gran potencial que presentan los microorganismos presentes en el suelo, ya sea en el mejoramiento del mismo, degradación e incluso la inmovilización de algunos contaminantes (González-Chávez, M. A, 2004). De ésta manera se toma en cuenta una técnica poco conocida en nuestro medio, la bioabsorción, en el que la biomasa fungal "muestra una fuerte afinidad por el metal ión debido a la falta de protones producidos durante el metabolismo" (Wiley & Sons, 2006, p 485).

Otra de las ventajas de utilizar organismos fúngicos, es que sus hifas pueden penetrar con mayor profundidad en el suelo. Además poseen una capacidad superior de acumulación de metales pesados a diferencia de las plantas, e incluso su actividad y crecimiento no se ven afectados por la acción de éstas sustancias. (Alonso, 2007 citado en Posada, 2012).

El fin de utilizar la bioabsorción como técnica de mejoramiento de suelos se quiere lograr la recuperación de sitios contaminados y preservar en lo posible el medio ambiente. (Miller & Poindexter, 1994 citado en Torres 2003), obteniendo grandes beneficios y a un bajo costo.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema

A falta de investigaciones realizadas acerca de los hongos presentes en la Antártida y de las potenciales características de bioabsorción que pueden llegar a tener, es necesario realizar estudios que permitan conocer dichas habilidades y sus posibles aplicaciones en el país, con el fin de remover metales pesados en suelos contaminados, los cuales han aumentado sus niveles concretamente por actividades mineras.

A más de ello es de vital importancia contar en el país con tecnologías de remediación que sean de bajo costo y fácil aplicación.

1.2 Formulación del Problema

De las especies fúngicas presentes en suelo Antártico. ¿Cuáles de ellas tendrán la capacidad de bioabsorber metales pesados del suelo?

1.3 Sistematización del Problema

- ¿Qué se conoce acerca de los hongos que se hallan en la Estación Pedro Vicente Maldonado- Antártida?
- ¿Cuál es la importancia del estudio de las propiedades de bioabsorción que poseen los hongos frente a los metales pesados?
- ¿Qué metodología será factible utilizar en fase de laboratorio?

En cuanto a los resultados de la investigación

- ¿Qué tratamiento será el más viable para observar mico remediación?
- ¿Cuál será el papel que cumplen las variables en el crecimiento de los hongos?

Objetivos

- **General**
Evaluar el potencial enzimático de las cepas para absorber metales pesados.
- **Específico**
Registrar cepas óptimas que tengan la capacidad de absorber metales pesados.

Justificación

Retamales (2012, citado en Barticevic, 2012) precisa que el continente antártico es un lugar donde se dan las temperaturas más frías y la mayor acumulación de hielo, por lo tanto es la mayor reserva de agua dulce y el regulador de la temperatura del planeta. Aquí se desarrolla la vida en condiciones singulares. Por lo que la investigación se presenta como una oportunidad para el descubrimiento de aplicaciones tanto para Ecuador como para el continente Frío, ya que en él es posible encontrar en él, formas de vida que sean fuente de interés para la ciencia, e incluso obtener de ellas sustancias que puedan convertirse en productos de uso comercial, brindando beneficios a otros lugares apartados de dicho continente (Sánchez, 2007)

Incentiva futuros estudios en el campo de la micología puesto que, según Aisyah(2008) se han analizado más de 100 muestras de suelo de la Antártida continental y cuenta con más de 200 cepas de hongos, que pueden ser origen de futuras investigaciones.

La importancia de mi trabajo radica en que es el primer estudio en Ecuador que trabajaría con especies fúngicas de origen antártico, para determinar si tienen características de bioabsorción de metales pesados.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

Coello y Burgos (2011) señalan que en la actualidad para minimizar los impactos de la bioacumulación existen alternativas de manejo y de eliminación o fijación de dichos metales gracias a la utilización de microorganismos, los cuales mediante sus procesos bioquímicos logran disminuir dichos elementos.

“La biorremediación usando hongos blancos de putrefacción es una tecnología muy prometedora la cual está siendo estudiada” (Frazar, 2000 citado en Coello et al, 2011). Por ello es importante tomar en cuenta la habilidad de estos hongos en la degradación de compuestos persistentes, y en ciertos estudios se ha tomado como referencia especies fúngicas de la familia Phanerochaete donde se encuentra el hongo *Pleurotus ostreatus*, que puede dar a ésta técnica, mucho futuro. (Coello & Burgos, 2011).

En otros estudios se ha determinado que para eliminar iones metálicos como Torio y Uranio de disoluciones y aguas contaminadas (Biosorción), se utilizan *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Alonso, 2007 citado en Posada, 2012)

Una técnica que hace uso de éstas especies es la micoextracción, la cual consiste en la extracción de suelo contaminado por metales pesados que contenga macro hongos. Los más empleados son *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* con los cuales se ha logrado extraer platino de pilas de compost. Con *Agaricus macrosporus* también se ha logrado extraer Cadmio, Mercurio, Plomo, Cobre y Zinc (Alonso, 2007 citado en Posada, 2012)

En el país se han aislado e identificado seis géneros de microhongos terrestres de Punta Fort William en la Isla Greenwich, provenientes de la Antártida. (Ordóñez et al 2009).

2.2 Fundamentación Teórica

1 Zona de estudio

1.1 Ubicación

1.2 Cobertura vegetal presente

2. Hongos

2.1 Concepto

2.2 Clasificación

3. Metales pesados

- 3.1 Concepto
- 3.2 Estructura química
- 3.2 Contaminación de suelos por metales pesados
- 3.4 Efectos de la contaminación por metales pesados

4. Suelo

- 4.1 Definición
- 4.2 Características del suelo
- 4.3 Uso del suelo

5. Bioremediación

- 5.1 Tipos de bioremediación
- 5.2 Microremediación
 - 5.2.1 Ventajas
 - 5.2.2 Desventajas

2.3 Hipótesis

H0= Los hongos provenientes de la Antártida absorben metales pesados.

H1= Los hongos provenientes de la Antártida no son capaces de absorber metales pesados.

2.4 Caracterización de las Variables

Se determinarán en condiciones de laboratorio las siguientes variables:

Dependientes: cepas de hongos, factores enzimáticos

Independientes: temperatura, ph, concentración del medio, sustrato vegetal, luz, concentración de metal pesado.

2.5 Definición de Términos Básicos

- Hifa
- Micelio
- Esporas
- Contaminante orgánico
- Contaminante inorgánico
- Toxicidad
- Solubilidad
- Difusión
- Bioabsorción

2.6 Fundamentación Legal

- Constitución

Título II. Derechos. Capítulo segundo. Sección segunda. Ambiente sano

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumakkawsay*.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Título II. Derechos. Capítulo segundo. Sección cuarta. Cultura y Ciencia

Art. 25.- Las personas tienen derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico y de los saberes ancestrales.

Título II. Derechos. Capítulo segundo. Sección séptima. Salud

Art. 32.- La salud es un derecho que garantiza el Estado, cuya realización se vincula al ejercicio de otros derechos, entre ellos el derecho al agua, la alimentación, la educación, la cultura física, el trabajo, la seguridad social, los ambientes sanos y otros que sustentan el buen vivir

TÍTULO II .Derechos. Capítulo séptimo .Derechos de la naturaleza.

Art. 72.- La naturaleza tiene derecho a la restauración. Esta restauración será independiente de la obligación que tienen el Estado y las personas naturales o jurídicas de Indemnizar a los individuos y colectivos que dependan de los sistemas naturales afectados.

TÍTULO II .Derechos. Capítulo noveno Responsabilidades

Art. 83.- Son deberes y responsabilidades de las ecuatorianas y los ecuatorianos, sin perjuicio de otros previstos en la Constitución y la ley:6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible.

TÍTULO VI Régimen de Desarrollo. Capítulo primero. Principios generales.

Art. 276.- El régimen de desarrollo tendrá los siguientes objetivos:4. Recuperar y conservar la naturaleza y mantener un ambiente sano y sustentable que garantice a las personas y colectividades el acceso equitativo, permanente y de calidad al agua, aire y suelo, y a los beneficios de los recursos del subsuelo y del patrimonio natural

TÍTULO VII. Régimen del Buen Vivir. Capítulo primero. Inclusión y equidad. Sección octava Ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales

Art. 385.- El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad: 1. Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.

TÍTULO VII. Régimen del Buen Vivir. Capítulo segundo. Biodiversidad y recursos naturales. Sección primera. Naturaleza y ambiente

Art. 397.-2. Establecer mecanismos efectivos de prevención y control de la contaminación ambiental, de recuperación de espacios naturales degradados y de manejo sustentable de los recursos naturales.

TÍTULO VII. Régimen del Buen Vivir. Capítulo segundo Biodiversidad y recursos naturales Sección quinta. Suelo

Art. 409.- Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

En áreas afectadas por procesos de degradación y desertificación, el Estado desarrollará y estimulará proyectos de forestación, reforestación y revegetación que eviten el monocultivo y utilicen, de manera preferente, especies nativas y adaptadas a la zona.

- TULAS

Libro IV, de La Biodiversidad, Título I, Capítulo VIII, disposiciones generales: Vida Silvestre.- Son todos los organismos vivos nativos del Ecuador (indígenas, endémicos y migratorios), sin distinción de categoría taxonómica

(animales, plantas, mónera, protistas y hongos) y tipo de hábitat (terrestre, acuático y aéreo), que mantienen o mantuvieron al menos una población en estado natural (no domesticada o modificada).

- **Protocolo de Madrid**

“El Protocolo de Madrid es un instrumento por medio del cual, el continente antártico se ha convertido en una especie de gran reserva natural, dedicada a la paz y a la ciencia.”(Sánchez, 2007)

Protocolo al Tratado Antártico sobre protección del Medio Ambiente. Apéndice del Protocolo. Arbitraje. Anexo II. Al Protocolo al Tratado Antártico sobre protección del Medio Ambiente Conservación de la fauna y flora antárticas. Artículo 1. Definiciones. “Planta autóctona” significa cualquier tipo de vegetación terrestre o de agua dulce, incluyendo briófitas, líquenes, hongo y algas en cualquier etapa de su ciclo vital (incluyendo semillas y otros propagadores), autóctonos de la zona del Tratado Antártico.

Protocolo al Tratado Antártico sobre protección del Medio Ambiente. Apéndice del Protocolo. Arbitraje. Anexo II. Al Protocolo al Tratado Antártico sobre protección del Medio Ambiente Conservación de la fauna y flora antárticas. Artículo 3. Protección de la Flora y Fauna Nativa.2. Dichas autorizaciones deberán especificar la actividad autorizada incluyendo, cuándo, dónde, y quién la lleva a cabo, y se concederán sólo en las siguientes circunstancias. a) Para proporcionar especímenes para estudios científicos o información científica.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1 Determinación de los métodos a utilizar

3.1.1 Fase de campo

3.1.1.1 Toma de muestras en Antártida

Para la colecta de muestras se eligieron 6 zonas de muestreo, Islas Greenwich, Isla Barrientos, Isla Dee e Isla Torres, en estas áreas se tomaron muestras de tierra y heces de aves las colectas se realizaron al azar, anotando en cada punto coordenadas UTM con un GPS, temperatura y humedad del suelo con un termohigrómetro, eligiendo lugares húmedos o cercanos a cursos de agua. Para tomar las muestras de tierra se utilizó una pala de mano, las muestras de suelo se tomaron a 15 cm de profundidad ya que el suelo es muy rocoso e imposibilita hacer la excavación más profunda, para no contaminar las muestras a la pala se la limpió con alcohol al 70% antes de coleccionar cada muestra, luego fueron colocadas en fundas zipper, a las heces de ave también se las colocó en fundas zipper con su respectiva etiqueta para luego ser transportadas al área de trabajo en cajas térmicas.(Ver tablas 1-4).

3.1.1.2 Toma de muestras de suelo contaminado

Las muestras de suelo contaminado se tomarán en la provincia de Zamora Chinchipe, cerca de una minera, lugar en el cual se tomarán las muestras a diferentes niveles de profundidad sea a 0-40, 40-60 y 60-80 cm de profundidad (Puga *et al*, 2006) en dos puntos, los mismos que serán tomados en cuenta por las condiciones de contaminación a simple vista. En el lugar de muestreo se tomará en cuenta las características físico-químicas del suelo como textura, ph y humedad (Puga *et al*, 2006).

3.1.2 Fase de laboratorio

Se realizará tanto la siembra así como la identificación de las cepas.

3.1.2.1 Siembra

1. Realizar la prueba de absorción atómica para verificar la concentración de metales pesados en las muestras de suelo contaminado, en el laboratorio de OSP, en la Facultad de Ciencias Químicas.
2. Diluir las muestras de suelo con metales pesados.
3. Realizar el aislamiento de las cepas para obtener cepas puras
4. Preparar el inóculo primario en base al medio metal pesado (MMP).
5. Colocar las cepas puras en el inóculo primario.
6. Revisar periódicamente (diariamente) el crecimiento de las cepas.
7. Preparar el inóculo secundario o el sustrato vegetal y homogeneizarla con metales pesados.
8. Sembrar las cepas en cámara de flujo laminar.
9. Determinar los avances de las cepas inoculadas.
10. Realizar otra prueba de cromatografía para determinar la bioacumulación que han presentado las cepas.
11. Selección de cepas óptimas que tengan un buen avance.
12. Establecer el inóculo terciario en saquillos o fundas de mayor tamaño
13. Tomar una porción de micelio e inocular en los saquillos que estará a diferentes grados de temperatura, simulando el medio natural de dichos hongos, las condiciones naturales del laboratorio y una intermedia.
14. Realizar un último examen de concentración de metales en OSP.

Es importante en éste procedimiento tomar en cuenta la presencia de un testigo que nos pueda indicar si los resultados obtenidos son favorables, observando la biodegradación de éstas sustancias tóxicas en el suelo.

A más de ello es imprescindible mantener una ficha de protocolo de seguimiento que facilite la descripción de los avances que tiene cada cepa durante el día.

3.1.2.2 Identificación de las cepas

Para ello se cuenta con bibliografía y un microscopio compuesto que me permita observar detenidamente las cepas y determinar a la clase de hongo que pertenece.

3.2 Diseño de la Investigación

El trabajo es netamente investigación experimental, la misma que es “un proceso que consiste en someter a un objeto o grupos de individuos a

determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente)” (Arias, 2006, pg 33).

Según el nivel es explicativa, ya que “demuestra que los cambios en la variable dependiente fueron causados por la variable independiente. Es decir se pretende establecer la relación causa- efecto” (Arias, 2006, pg 33).

Según el diseño es experimental puro en donde se “deben controlar todos los factores que pudieran alterar el proceso. Este modelo cumple con dos requisitos: empleo de grupos de comparación y equivalencia de los grupos mediante la asignación aleatoria al azar” (Hernández et al, 1998, citado en Arias, 2006, pg 35).

3.3 Población y muestra

Población.- hongos recolectados en la Antártida, Expedición número 13, en febrero del 2013.

Muestra.- dos cepas de hongos.

3.4 Operacionalización de las Variables

El medio sustrato pude ser cuantificado mediante el uso de indicadores, como lo es la prueba de concentración de metales pesados (espectrofotometría de absorción atómica) para determinar cómo inició y cómo termina el grado de toxicidad de dichos suelos.

Pruebas para análisis de potencial enzimático, para determinar la dinámica de las enzimas frente a la bioabsorción de metales pesados.

Identificación taxonómica de los especímenes fúngicos.

3.5 Técnicas e instrumentos de Investigación

Se realizarán análisis químicos para determinar las concentraciones de metales pesados en las muestras de suelo contaminado, al igual que para el análisis del potencial enzimático.

Análisis de cepas mediante bibliografía específica. Libros como The Fifth Kingdom de Bryce Kendrick, segunda edición y la obra Illustrated genera of Imperfect Fungi de Barnett y Hunter tercera edición. La ayuda de un microscopio compuesto Olympus CX31 y un estéreo microscopio Leica EZ4.

Toma de fotografías de las placas identificadas gracias a la cámara ELPH 330HS.

3.6 Validez y Confiabilidad de los Instrumentos

Los estudios de espectrofotometría se realizarán en el Laboratorio de OSP de la Facultad de Ciencias Químicas.

3.7 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

De los datos obtenidos en la fase de laboratorio se los analiza con el software estadístico Startical Product and Service Solutions (SPSS), el mismo que tiene como ventaja permitir trabajar con gran cantidad de datos, utilizando muestras mayores e incluyendo más variables e incluso permite hacer cálculos más exactos (Herreras, 2005).

3.8 Caracterización de la Propuesta

Es de iniciación científica con acciones de innovación y biotecnología aplicada en el campo de la Micología con el objetivo de iniciar soluciones hacia los problemas ambientales causados por la minería, presentes en el país.

CAPITULO IV

4. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

4.1 Recursos

RECURSOS	CAMPO	LABORATORIO
HUMANOS	<p>En Antártida</p> <p>1 persona encargada de tomar las muestras de hongos</p> <p>1 ayudante de campo para obtener muestras de suelo contaminado</p>	<p>1 ayudante de tesis</p> <p>Micólogo</p> <p>Químico</p> <p>Persona especializada en Estadística</p>
TÉCNICOS	<p>En Antártida</p> <p>Estación Científica Pedro Vicente Maldonado</p> <p>Suelo contaminado</p> <p>Laboratorio en Ciencias Químicas</p>	<p>Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas. OSP.</p> <p>Laboratorio de Química de Alimentos OSP</p>
MATERIALES	<p>En Antártida</p> <p>Pala de mano, alcohol al 70%, fundas zipper.</p> <p>Suelo contaminado</p> <p>Pala de mano, fundas zipper.</p>	<p>De vidrio</p> <p>Cajas Petri</p> <p>Vasos de precipitación</p> <p>Pipetas</p> <p>Varillas de agitación</p> <p>Sustancias</p> <p>Metales pesados</p> <p>Agua</p>

		Agar malta Sustrato vegetal Otros Saquillos o envases grandes Fichas de protocolo
EQUIPOS	En Antártida Suelo contaminado GPS, termohigrómetro.	Computadora portátil Equipo especializado en realizar espectrofotometría de absorción atómica. Cámara de flujo laminar Autoclave Microondas Balanza Cámara fotográfica Microscopio compuesto

4.1.2 Presupuesto

Proyecto financiado por el Instituto Ecuatoriano en la Antártida (INAE)

GRUPO	DETALLE	COSTO UNITARIO EN DÓLARES
Pruebas	Prueba de espectrofotometría de absorción atómica.	20.00

Material	De laboratorio	100.00
	Cajas Petri	60.00
	Agar malta	30.00
	Fundas grandes o saquillos	10.00
	Resma de papel	10.00
Equipos	Cámara de flujo laminar	7 200.00
	Microscopio compuesto	500.00
	GPS	900.00
	Termo higrómetro	35.00
	Computadora portátil	700.00
	Cámara de flujo laminar	500.00
	Autoclave	8500.00
	Microondas	90.00
	Refrigerador	800.00
	Balanza electrónica	20.00
	Cámara fotográfica	200.00
	COSTO TOTAL	19 680.00

4.2 Cronograma

[illegible]

[illegible]

REFERENCIAS

NETGRAFIA

Aisyah, S. (2008, julio). Biodiversity of Soil Microfungi in Polar Ecosystem. Exposición oral en el

Primer Simposio Ecuatoriano de Ciencia Polar en la Universidad Estatal
Península de Santa Elena, Santa Elena, Ecuador. Disponible en:
http://www.inae.gob.ec/images/documentos/revistas/rea2008_4.pdf

Barticevic, E. (2012). ¿Por qué la ciencia chilena está mirando hacia la Antártica? *Boletín Antártico*

Chileno, 31, 24-25. Disponible en: <http://www.inach.cl/wp-content/uploads/2009/10/bac31-1.pdf>.

Coello, J. M. (2011). *Aplicación del Hongo Pleurotus ostreatus como Alternativa para la*

Biorremediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados.
Proyecto de materia de graduación previa a la obtención del título de
Biólogo, Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica del
Litoral, Guayaquil, Ecuador. Disponible en
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21020/1/RESUMEN%20CYCYT.pdf>

Galán, E. & Romero, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. Problemática Post-

minera derivada de la explotación de Sulfuros polimetálicos, Macla N°
10, 48-60. Disponible en:
http://www.ehu.es/sem/macla_pdf/macla10/Macla10_48.pdf.

González-Chávez, M. A. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados

utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23, 29-37. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57323104>

Herreras, E. B. (2005). SPSS: un instrumento de análisis de datos cuantitativos. *Revista de*

Informática Educativa y Medios Audiovisuales, 2, 62-69. Disponible en:
<http://laboratorios.fi.uba.ar/lie/Revista/Articulos/020204/A3mar2005.pdf>.

Ocampo, N., Calisto, N., Gómez, C., & Astorga, M. (2011). Metales pesados en Bahía Fildes. *Boletín*

Antártico Chileno, 30, 52-53. Disponible en: <http://www.inach.cl/wp-content/uploads/2012/03/BACH-30.pdf>.

Ordóñez, N., Ordóñez, A., Aisyah, S., Yii, H. & Cárdenas, W.B. (2009, agosto-septiembre).

Aislamiento e identificación de microhongos terrestres de Punta Fort William – Antártida. Abstract de presentación oral y Póster presentado en el V Simposio Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas y II Simposio Ecuatoriano de Ciencia Polar, Santa Elena-Guayaquil, Ecuador. Disponible en: http://www.inae.gob.ec/images/documentos/publicaciones/Memorias_V_Simposio_Latinoamericano.pdf.

Posada, R. H. (2012). *Procesos de Bioremediación* (358025). Bogotá: Escuela de Ciencias Agrícolas,

Pecuarias y del Medio Ambiente. Universidad Abierta y a Distancia. Disponible en
http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358025/Modulo_FINAL_358025.pdf.

Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C. & Campos, A. (2006). Contaminación por metales

pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*, 5, 1-2. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v5n1-2/a20v5n1-2.pdf>.

Sánchez, R.A. (2007). *Antártida. Introducción a un continente remoto*. Buenos Aires: Editorial

Albatros. Disponible en
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/10046/Documento_completo.pdf?sequence=1

Torres, R. D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos.

Ecosistemas, N° 2. Disponible en
<http://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/download/350/341>.

BIBLIOGRAFÍA

Arias, F.G. (2006). *El proyecto de investigación. Inducción a la metodología científica* (5ª Ed.).

Caracas: Editorial Episteme, C.A.

Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). (2002). *Tecnologías de remediación para*

suelos contaminados. México: Volke, T. & Velasco, J. A. Disponible en: Google Books.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (1991). Boletín de suelos

de la FAO N°56. *Manejo del suelo: producción y uso del composte en ambientes tropicales y subtropicales*. Roma: Dalzell, H. W., Biddlestone, A. J., Gray, K.R. & Thurairajan, K. Disponible en: Google Books.

Wiley, J. & Sons. (2006). *Mycoremediation. Fungal Bioremediation*. New Jersey, NJ: Harbhajan

Singh

Protocolo De Madrid

Constitución de la República del Ecuador (2008). Ecuador

TULAS

ANEXOS

Lugares de muestreo

Isla Greenwich (Río Culebra) (Tabla 1)

Lugar	Coordenadas	Altura (m)	T° Mínima-Máxima (°C)	Humedad (%)
Muestra 1	21 E 0358913 – 3072574	11	10.9-20.1	38
Muestra 2	21 E 0358906 – 3072555	10	7.9-15.6	81
Muestra 3	21 E 0358893 – 3072535	13	9.1-14.9	81
Muestra 4	21 E 0358882 – 3072521	14	10.2-16.2	70

Isla Barrientos (Tabla 2)

Lugar	Coordenadas	Altura (m)	T° Mínima-Máxima (°C)	Humedad (%)
Heces de pingüinos Muestra 5	21 E 0358005 – 0377680	43	4.5-7.2	53
Muestra 6	21 E 0358174 – 3077952	6	7.5-5.1	68
Muestra 7	21 E 0358194 – 3077964	6	4-6	63
Muestra 8	21 E 0358416 – 3077982	5	5.9-9.1	62
Muestra 9	21 E 0358237 – 30779974	4	5.9-9.1	68

Isla Dee (Tabla 3)

Lugar	Coordenadas	Altura (m)	T° Mínima-Máxima (°C)	Humedad (%)
Curso de Agua	21 E 0356257-3075604	70	9.1-14.9	81

Isla Torres (Tabla 4)

Lugar	Coordenadas	Altura (m)	T° Mínima-Máxima (°C)	Humedad (%)
Zona húmeda	21 E 0358903-3076959	30	9.1-3.9	80

Tanya Paulina Calahorrano Gómez

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Quito, noviembre 2013

VARIACIÓN DE FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES DE *Sphaerophorus globosus* (Huds.) Vain., *Usnea antarctica* Du Rietz, *Stereocaulon alpinum* Laurer, y *Ramalina terebrata* Hook.f. (MACROLÍQUENES) DE LA ISLA GREENWICH, ESTACIÓN PEDRO VICENTE MALDONADO, ANTARTIDA, ECUADOR

Tesis presentada como requisito parcial
para optar por el Título de Licenciatura
en Ciencias Biológicas y Ambientales

RESUMEN

El presente plan de tesis plantea determinar la variación de Flavonoides y Fenoles Totales de cuatro especies de líquenes: *Sphaerophorus globosus* (Huds.) Vain., *Usnea antártica* Du Rietz, *Stereocaulon alpinum* Laurer, y *Ramalina terebrata* Hook.f. & Taylor de la isla Greenwich en la Estación Pedro Vicente Maldonado Antártida-Ecuador sabiendo que este tipo de antioxidantes se producen en mayor cantidad ante estímulos externos. También se pretende identificar si existe una variación en la producción de antioxidantes de dichas especies en un periodo de 5 años. La etapa de laboratorio se realizará en el Ecuador continental en dos fases; en la primera se las identificará taxonómicamente y en la segunda fase se determinará los flavonoides y fenoles totales utilizando el radical libre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracilo) para posteriormente correlacionarlas mediante la metodología de espectrofotometría.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes según la Asociación Internacional de Lichenología son una asociación permanente entre un hongo (micobionte) y una alga o una cianobacteria (fotobionte), esta unión da como resultado el talo liquénico muy estable; son considerados un miniecosistema muy elaborado (Brodo, 2001; Ribeiro, 2008).

Los líquenes son capaces de crecer en todo tipo de sustratos: orgánicos (corteza de los árboles, hojas) e inorgánicos (rocas, tejados, vidrio). (Barreno & Pérez, 2003). Su fisiología les permite a estos organismos adaptarse a diferentes variaciones del clima por este hecho pueden entrar en un estado de latencia (fotoinhibición) (Barreno & Pérez, 2003) lo que les permite aumentar su biomasa en las épocas con luz, temperatura y humedad adecuadas; por estas características encontramos tanta diversidad en los polos y en las zonas boreales (Brodo, 2001).

La Antártida ubicada en el polo sur, es un continente de agua dulce formado de glaciares, su geografía es la más alta del planeta con una elevación promedio de 2300m (INAE, 2013), la mayor parte de la superficie de la Isla Greenwich posee solo un 9,6% de cobertura vegetal (Ordóñez, 2008) dentro de esta se encuentran los hongos líquenizados.

En este continente existen 350 especies de líquenes (Little, 2009), los mismos que presentan diferentes formas de crecimiento entre las cuales podemos nombrar los de tipo crustoso (muy adherido al sustrato), folioso (forma laminar adherido por rizinas al sustrato), fruticoso (parecen a arbusto pequeños fijados por un cordón) (Ribeiro, 2008); también presentan diferentes colores que son característicos para ellos, esto debido a las diferentes sustancias líquénicas que contienen.

Los líquenes producen 850 metabolitos secundarios de los cuales 350 son autogenerados (sustancias líquénicas); dichas sustancias son esenciales para el efecto protector contra altas radiaciones que podrían afectar a las algas o cianobacterias (fotobionte) (Leal, 2012), tienen algunas actividades biológicas, entre ellas: actividad antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatoria y anticancerígenas (Barreno & Pérez, 2003).

La Antártida es un medidor del cambio climático mundial (Little, 2009), ya que por la fuerza centrífuga que rige a nuestro planeta todos los cambios se acumulan en los polos, los líquenes como respuesta a los factores externos producen mayor cantidad de radicales libres los que son anulados por antioxidantes.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la Antártida se ha desarrollado ampliamente la información sobre taxonomía líquénica, es así que, se han citado 350 especies de líquenes (Little, 2009), de las cuales 36 son reportadas para la estación ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado (Socola, 2001).

Sin embargo, actualmente se ha generado un gran interés por no solo conocer la taxonomía de estos organismos sino también conocer la manera cómo éstos reaccionan ante los efectos del cambio climático y posibles impactos causados por los seres humanos. Trabajos como el de Robinson *et al* (2003), y Little (2009) ya mencionan algunos posibles efectos por el aumento de temperatura y radiaciones ultravioletas en líquenes y especies vegetales.

Según Robinson *et al* (2003) los antioxidantes son usados como defensa del talo líquénico en especial de los radicales libres los mismos que pueden dañar la membrana celular y el ADN, Little (2009) menciona que los niveles de antioxidantes podrían ser usados como una medida de la radiación ultravioleta.

Los antioxidantes son moléculas altamente reactivas las que inhiben la acción de los radicales libres, en la actualidad son muy importantes por su amplia aplicación en la medicina, en la industria farmacéutica y cosmética (Leal, 2012); los flavonoides y fenoles totales son los dos tipos de antioxidantes más estudiados por su capacidad reactiva derivada del oxígeno (Almajano, 2009). Se conoce que en las plantas sirven para defensa de radiación UV, animales herbívoros y medio ambiente (García, 2007).

Hasta el momento el único trabajo que ha desarrollado estudios sobre antioxidantes en la Antártida en líquenes es el desarrollado por Paudel (2007) en la Isla Rey Jorge, que proporciona información sobre la calidad y concentración de flavonoides y fenoles totales en las especies *Ramalina terebrata* Hook.f. & Taylor, *Stereocaulon alpinum* Laurer, *Caloplaca* sp., *Caloplaca regalis* (Vain) Zahlbr, y *Lecanora* sp.

Por tales motivos surge la inquietud de conocer que pasa con los niveles de concentración de flavonoides y fenoles totales en las especies *Ramalina terebrata* y *Stereocalon alpinum* en el periodo de 5 años, y cuáles son las concentraciones en *Sphaerophorus globosus* (Huds.) Vain., *Usnea antártica* Du Rietz, valores aún no registrados

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo varió la concentración de Flavonoides y Fenoles totales en las especies en el transcurso de 5 años *Ramalina terebrata* y *Stereocaulon alpinum* , y *cuál es la concentración en Sphaerophorus globosus y Usnea antártica* ?

SISTEMATIZACIÓN DEL PROBLEMA

Variación en la producción de Flavonoides y Fenoles Totales en el transcurso de 5 años en las especies *Ramalina terebrata* y *Stereocaulon alpinum* de la isla Rey Jorge en comparación con las mismas especies colectadas en la isla Greenwich.

Niveles de concentración de flavonoides y fenoles totales en las especies

Las especies con mayor nivel de concentración de fenoles y flavonoides totales.

La variación de concentración el periodo de un año.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la variación de Flavonoides y Fenoles Totales en las especies *Sphaerophorus globosus*, *Usnea antártica*, *Stereocaulon alpinum*, y *Ramalina terebrata*, de la isla Greenwich en la Estación Pedro Vicente Maldonado Antártida-Ecuador.

ESPECÍFICOS

- Identificar si existe una variación en la producción de Flavonoides y Fenoles Totales en el transcurso de 5 años en las especies ***Ramalina terebrata*** y ***Stereocaulon alpinum*** de la isla Rey Jorge en comparación con las mismas especies de la isla Greenwich
- Determinar niveles de concentración de flavonoides y fenoles totales en las especies
- Jerarquizar las especies con mayor nivel de concentración de fenoles y flavonoides totales.
- Establecer la variación de concentración el periodo de un año.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial se realizan grandes esfuerzos para determinar los efectos que produce el cambio climático y cómo los organismos reaccionan ante los cambios. En la Antártida por encontrarse en el polo sur los efectos del cambio climático son más evidentes (Little, 2009). Las investigaciones se han realizado principalmente en macrolíquenes de los continentes europeo y asiático (Heng Luo, 2006).

Paudel 2007 afirma que los antioxidantes de los líquenes de la Antártida son de mejor calidad con respecto a los encontrados en las zonas Tórrida y Templada. Basado en esto es importante saber que tipos de antioxidantes están presentes, especialmente los flavonoides y fenoles totales que son compuestos actúan principalmente en la fotosíntesis y ante factores adversos.

El Instituto Antártico Ecuatoriano INAE no registra ninguna investigación sobre los flavonoides y fenoles totales en líquenes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

El Instituto Nacional Antártico Ecuatoriano INAE es la entidad encargada de coordinar junto al Ministerio de Defensa los esfuerzos ecuatorianos para fomentar y mantener la proyección geopolítica del país participando activamente en las actividades de investigación científica bajo el Sistema del Tratado Antártico; es la responsable de llevar a cabo las expediciones anuales desde el Ecuador hacia la Estación Pedro Vicente Maldonado ubicada en la Antártida (INAE, 2010).

Los líquenes al ser un mini ecosistema tan fascinante y estable, con características únicas entre las cuales podemos mencionar sus formas crustosas, foliacias y fruticosas con los colores que los diferencian unos de los otros (Ribeiro, 2008), las diferentes utilidades que la humanidad les ha dado desde teñir las togas romanas con ese rojo característico (Barreno & Pérez, 2003), pasando por bioindicadores de calidad ambiental (Lijteroff, *et al.*; 2009), hasta el tomar un té para calmar la inflamación (Heng Lou, *et al.*; 2006); pero sobre todo el poder ser los pioneros en conquistar ambientes tan hostiles como los que se presentan en la Antártida (Little, 2009); y su poder de respuesta con la fabricación de los antioxidantes de mejor calidad (Paudel *et al.*; 2007).

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

ZONA DE ESTUDIO Y UBICACIÓN

La Antártida es un continente isla cubierto de hielo, un de ámbito geográfico característico muy diferente a los otros continentes; debido a su basta capa de hielo, la misma que oculta rasgos geomorfológicos inigualable en el planeta.

Se caracteriza por presentar enormes extensiones que flotan sobre el mar, especialmente en las grandes escotaduras de los mares de Ross y de Weddell; tiene un diámetro de 4500 km y un área de 13.6 millones de km² (Sánchez 2007; INAE, 2010).

La Base Pedro Vicente Maldonado es un centro de investigación antártica operado por Ecuador y está ubicada en la isla Greenwich que es parte del conjunto de islas Shetland del Sur. Fue inaugurada el 2 de marzo de 1990 en punta Fort Williams de la bahía Discovery.

Ecuador realiza investigaciones permanentes en la Antártida. Las investigaciones se realizan de forma conjunta entre la base y el buque *Orión*. Los estudios que se desarrollan van desde la fisiología humana, a la geología y oceanografía.

COBERTURA VEGETAL

Los líquenes son la especie dominante en la estación Pedro Vicente Maldonado se han determinado 36 especies de líquenes y 4 especies de musgos, “la distribución de la vegetación se presenta por estratos, en partes bajas cercanas al mar permiten la predominancia de los musgos, mientras que en las partes altas se encuentran los líquenes” (Socola, 2001).

LÍQUENES

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un micobionte, hongo y un fotobionte, alga o cianobacteria, de los cuales resulta un talo liquénico con características únicas que son fruto de esta unión (Barreno & Pérez, 2003).

Los líquenes poseen una ventaja muy grande en la colonización de los espacios más inhóspitos del planeta (Little, 2008).

El estudio se realizara en cuatro especies de líquenes *Sphaerophorus globosus*, *Usnea antarctica*, *Stereocaulon alpinum*, y *Ramalina terebrata* con gran amplitud ecológica en las zona de investigación.

Breve descripción de una especie

Usnea antarctica es una de las especies de macro líquenes que tiene distribución circumpolar, presenta un color amarillo verdoso con franjas negras. Los especímenes normales, muestran una longitud media de 40mm (Lindsey, 1976; Schroeter, *et al.*; 1995), se encuentra en los sustratos de roca y sus interiores, así como en musgos en sitios expuestos al viento y bien drenados, en zonas de bajos niveles de congelamiento.

FORMAS DE CRECIMIENTO

Los líquenes presentan tres formas principales de crecimiento:

Crustosos; pegados en su totalidad al sustrato, en caso de removerlos se deberá remover el sustrato (Ribero, 2008).

Foliaceos; de grandes dimensiones en forma laminar que se adhieren directamente al sustrato por uno o más puntos a través de resinas, pueden ser removidos con ayuda de un objeto corto punzante (Ribero, 2008).

Fruticulosos; presentan un talo parcialmente cilíndrico, con apariencia de pequeños arbustos. Muestran un solo punto de contacto con el sustrato (Ribero, 2008).

METABOLITOS SECUNDARIOS

Son los compuestos químicos sintetizados que no cumplen funciones esenciales, de forma que su ausencia no es fatal para el espécimen, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre el espécimen y su ambiente (Cronquist, 1977). Por muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido. Muchas veces fueron pensados simplemente como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho de las plantas. En general fueron percibidos como insignificantes por los biólogos por lo que históricamente han recibido poca atención por parte de los botánicos. Muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aún son desconocidas. (Croteau, *et al.*; 2000)

RADICALES LIBRES

Los radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que daña a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen (Leal, 2012).

Los radicales libres producen daño a diferentes niveles en la célula:

- Atacan a los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales (transporte de nutrientes, eliminación de desechos, división célula, etc.).
- Ataca al ADN impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento celular.

ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son moléculas altamente reactivas que inhiben la oxidación de los radicales libres presentes en las células como parte de su vida natural, estos se encuentran en bajas concentraciones (Almajano, 2009).

FLAVONOIDES

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Son derivados de los polifenoles y altamente solubles en agua (Jimenez & Girbes 2013).

FENOLES

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en región vegetal, se localizan en todas las partes de las plantas y sus concentraciones variable a lo largo del ciclo vegetativo, estos compuestos participan de diversas funciones tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Están asociados al color, características sensoriales, nutritivas, y propiedades antioxidantes. (Paladino, 2010).

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Liquen Es la asociación entre un micobionte y un fotobionte que da como resultado el talo liquénico, este produce sustancias características (Ribeiro, 2008) con propiedades únicas entre las que están el color, astringencia, antimicóticas, antitumorales etc.

Crustosos se encuentran pegados en su totalidad al sustrato, en caso de removerlos se deberá remover el sustrato (Ribeiro, 2008).

Foliosos de grandes dimensiones en forma laminar que se adhieren directamente al sustrato por uno o más puntos a través de resinas, pueden ser removidos con ayuda de un objeto corto punzante (Ribeiro, 2008).

Fruticosos presentan un talo parcialmente cilíndrico, con apariencia de pequeños arbustos. Muestran un solo punto de contacto con el sustrato a través de rizinas (Ribeiro, 2008).

Metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados que no cumplen funciones esenciales, de forma que su ausencia no es fatal para el espécimen

Radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas que se presentan en las células como reacción ante un estímulo (Leal, 2012).

Antioxidantes son moléculas altamente reactivas que inhiben la oxidación de los radicales libres presentes en las células (Almajano, 2009).

Flavonoides son un tipo de antioxidante que se presenta en forma de pigmentos naturales y que protegen al organismo del daño producido por radicales libres (Jimenez & Girbes, 2013).

Fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en región vegetal, se localizan en todas las partes de las plantas (Paladino, 2010).

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) es un radical libre utilizado para la determinar el poder oxidativo de las sustancias (Paudel, *et al.* 2007).

Trolox (equivalent antioxidant capacity, TEAC) es la medida de la capacidad de una sustancia dada en comparación con el estándar (Paudel, *et al.* 2007).

IC₅₀ (Inhibition concentration) índice de concentración de inhibición un valor menor a la cantidad IC₅₀ indica mayor cantidad antioxidante (Paudel, *et al.* 2007).

ET (Electron transfer) base (Paudel, *et al.* 2007).

BHT (Butilhidroxitolueno) es un antioxidante artificial (Paudel, *et al.* 2007).

FUNDAMENTACIÓN LEGAL

TULAS, Libro IV, de La Biodiversidad, Título I, Capítulo VIII, disposiciones generales: Vida Silvestre.- Son todos los organismos vivientes nativos del Ecuador (indígenas, endémicos y migratorios), sin distinción de categoría taxonómica (animales, plantas, mónera, protistas y hongos) y tipo de hábitat (terrestre, acuático y aéreo), que mantienen o mantuvieron al menos una población en estado natural (no domesticada o modificada).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE MÉTODOS A ESTUDIAR

La metodología a utilizarse según la naturaleza de los datos es cualitativa, descriptiva de acuerdo a los objetivos y según la temporalización es transversal (Urquiza, 2005), porque se estudia especies liquénicas específicas y la concentración de flavonoides y fenoles totales que ellas poseen en un período de un año.

FASE DE CAMPO

Las colectas serán realizadas en la época de verano del Polo Sur en los meses de febrero durante la XVII Y XVIII expediciones del Ecuador a la Antártida en los años 2013 y 2014 respectivamente en la Isla Greenwich, donde está ubicada la estación científica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado.

En cada punto de colecta se toma en cuenta datos geográficos y ecológicos: substrato, altitud y formación vegetal. La mayoría de líquenes que se encuentran en la Antártida se desarrollan sobre rocas por lo que para obtenerlos se utilizará un martillo para desprenderlos del sustrato (Yáñez, 2009).

FASE DE LABORATORIO

Primera fase:

Para la identificación del material liquénico se utilizará un estereomicroscopio y microscopio para la observación de estructuras morfológicas. Se aplicará cromatografía en el caso de ser requerido.

Segunda fase:

La determinación de los flavonoides y los fenoles totales se realizará mediante lo planteado por paudel la técnica de espectrofotometría, utilizando la metodología de DPPH para la obtención del extracto por el método de metanol y la ABTS por medio de la cocción (López, *et al.* 2007).

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación es de carácter exploratorio descriptivo (Urquizo, 2005; Hernandez, Fernandez & Baptista, 1991) ya que se determinará la concentración de flavonoides y fenoles totales presentes en las especies *Sphaerophorus globosus*, *Usnea antartica*, *Stereocaulon alpinum* y *Ramalina telebrata* lo que permitirá incrementar el conocimiento sobre dichas especies.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Población: Líquenes antárticos de la isla Greenwich.

Muestra: Especies *Sphaerophorus globosus*, *Usnea antartica*, *Stereocaulon alpinum* y *Ramalina telebrata*.

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Se utilizará el método de Folin-Ciocalteu para la determinación de fenoles totales, siendo el patrón de referencia el ácido gálico. Los resultados se expresan, como equivalentes en mg de ácido gálico por L de extracto (Almajano, 2009).

El método de Folin-Ciocalteu, se basa en una reacción entre el reactivo Folin-Ciocalteu activado con una base, como carbonato de sodio (Almajano, 2009).

PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

Se utilizará el método de flavonoides cuantifica los polifenoles más activos como antioxidantes, para que la muestra no salga del rango lineal de la ley de Lambert-Beer, ni del rango de lectura del aparato, se diluirá adecuadamente la muestra.

Los resultados se expresaron mediante una calibración previa realizada con ácido gálico como patrón (Almajano, 2009).

Para la Extracción. Dado que los compuestos fenólicos y flavonoides son de naturaleza polar, se utilizara metanol para extraerlos, removiendo inicialmente todos los demás extractos cuyos compuestos no son de interés utilizando acetona y hexano como disolventes. Posteriormente se concentrará los extractos metanólicos en un rotaevaporador hasta completa evaporación del disolvente (García, 2001).

VALIDEZ Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS

Todas las técnicas han sido probadas en estudios realizados anteriormente por Yáñez (2009) en la fase de campo y en la fase de laboratorio Heng Luo (2006), Paudel (2007), Leal (2009).

TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

CARACTERIZACIÓN DE LA PROPUESTA

Ponemos a disposición estos resultados para la aplicación en la industria farmacéutica ecuatoriana.

Se propone la elaboración de un artículo científico para fortalecer el conocimiento sobre los líquenes y sus sustancias químicas.

TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Los datos van hacer procesados mediante análisis de varianza y comparación de las medidas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$) mediante el programa bioestadístico SPSS.

CAPÍTULO IV

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

RECURSOS

Recursos				
Fase		Humanos	Técnicos	Económicos
Campo		Asistente de investigación	de Implementos necesarios para acceder a los sitios de muestreo	Proporcionados por el INAE
Laboratorio		Técnico investigador, Asistente de investigación, Asistente de laboratorio	de Facultad de Ingeniería, Química, Jardín Micológico	Proporcionados por el INAE
		Tesista	Implementos necesarios para el trabajo.	Proporcionados por el INAE

CRONOGRAMA

[illegible]

[illegible]

BIBLIOGRAFÍA

- Yanez Ayabaca, A. A. (2009). Os generos *Hypotrachyna* e *Everniastrum* (Parmeliaceae, Ascomycota liquenizados) nas províncias de Carchi e Imbabura na região Andina do Equador.
- Barreno Rodriguez, E. & Pérez Ortega, S. (2003). Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias.
- Hale, M. E. (1967). The biology of lichens. *Third Edition*.
- Leal Alturo, Á. C. (2012). Determinación del potencial antioxidante y evaluación del coeficiente de reparto a 25, 00° C de metabolitos secundarios de una especie de liquen colombiano del género *Hypotrachyna* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Little, L. Lichen Life in Antarctica. (2009).
- López, V., Akerrata, S., Caverro, R. Y. & Calvo, M. I. (2007). Actividad Antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional de Navarra. *Revista de Fito Terapia*, 43-47.
- Luo, H., Ren, M., Lim, K. M., Koh, Y. J., Wang, L. S., & Hur, J. S. (2006). Antioxidative Activity of Lichen *Thamnolia vermicularis* in vitro. *Mycobiology*, 34(3), 124-127.
- Ordóñez, N., Yii, H., Cárdenas, W., Aisyah, S., Moreano, H., Riofrío, M. & Burbano, L. (2013). Estudio Preliminar de la Cobertura Superficial en la Isla Greenwich, Antártida. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 21(1).
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, J. S., Hong, S. G., Shin, H. W. & Yim, J. H. (2007). Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biology*, 31: 605-608.
- Ribeiro, S., De Moel, P. (2008). Líquenes.
- Urquizo, Á. (2005). Cómo realizar la Tesis o una Investigación. *Editorial Graficas Riobamba. Riobamba-Ecuador*.
- López, V., Akerreta, S., Caverro, R.Y. & Calvo M.I. (2007). Actividad antioxidante de las plantas utilizadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*, 7: 43-47.