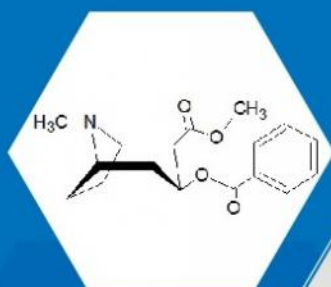


RCCQ

Volumen 44, nro. 1 de 2015 / ISSN 0120-2804

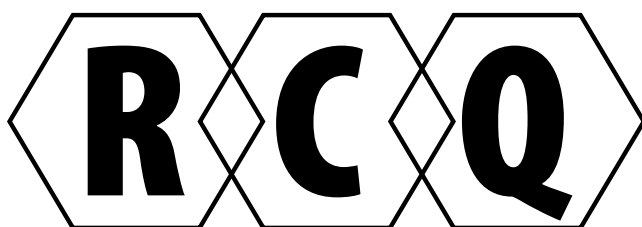
Revista Colombiana de Química



Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**Revista
Colombiana
de Química**

Volumen 44, No. 1, enero–abril de 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Edición

© Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias–Departamento de Química
Sede Bogotá
ISBN versión impresa: 0120-2804
ISBN versión electrónica: 2357-3791
DOI de la publicación by CrossRef.org:
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>

Indizada en

Publindex- Índice Bibliográfico Nacional (categoría A2–dic 2013)
Chemical Abstracts
SciELO Colombia
Scopus Q4 (SJR/2013: 0,112)
Latindex
Redalyc
Directory of Open Access Journals (DOAJ)

Periodicidad

Cuatrimestral
Contacto
Departamento de Química
Universidad Nacional de Colombia
Apartado Aéreo 5997
Bogotá, D.C., Colombia
Fax: 571- 3165220
Correo electrónico: rcolquim_fcbog@unal.edu.co

Consulta Open Acces

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso

Director Revista

Carlos Eduardo Narváez Cuenca, Ph. D., Universidad Nacional de Colombia.

Comité Editorial

Cristian Blanco Tirado, Ph. D., Universidad Industrial de Santander.
Francisco Carrasco Marín, Dr. Sc., Universidad de Granada, España.
Leonardo Castellanos Hernández, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Pedro Joseph-Nathan, Dr. Sc., Instituto Politécnico Nacional, México.
Sonia Moreno Guáqueta, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Cristian Ochoa Puentes, Dr. rer. nat., Universidad Nacional de Colombia.
Luz Patricia Restrepo Sánchez, M. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Juscelino Tovar, Dr. Sc., Universidad de Lund, Suecia.

Comité Científico

Gustavo Adolfo González Aguilar, Dr. Sc., Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (México).
Ljubisa R. Radovic, Dr. Sc., Pensilvania State University (USA).
Augusto Rivera Umaña, Dr. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Fabio Zuluaga Corrales, Dr. Sc., Universidad del Valle (Colombia).
Kushalappa Ajjamada, Ph. D., McGill University (Canadá).

Suscripciones y canje

Valor del ejemplar \$10.000; suscripción anual \$30.000 y US\$30 para el exterior, incluyendo en ambos casos el envío. Los pagos en Colombia deben realizarse mediante consignación en la cuenta de ahorros N° 220012720017 del Banco Popular, a nombre de Fondo Especial, Facultad de Ciencias U.N. Desde el exterior los pagos deben hacerse mediante cheque de un banco de Estados Unidos girado a nombre de Fondo Especial, Facultad de Ciencias U.N. o mediante transferencia electrónica a la cuenta citada anteriormente. Por favor enviar cheques y fotocopias de giros o consignaciones a la dirección de la Revista Col. de Química.
Para canjes dirigirse al SINAB: bibteca_bog@unal.edu.co ó cevelascoza@unal.edu.co.

Propósito y alcance

La Revista Colombiana de Química es publicada cuatrimestralmente por el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Publica contribuciones provenientes de la investigación en las diversas áreas de la química. El contenido de los artículos debe ser original, inédito y no debe haber sido enviado, total o parcialmente, para publicación a otra revista. La redacción asume el derecho de reproducción de los trabajos aceptados. Su publicación en otro medio requiere permiso del editor. La revista está dirigida a estudiantes y profesionales relacionados con cualquier área de la química.

Preparación editorial

Camila Alejandra Rincón Carrillo, asistente editorial.
Sindy Tatiana Bedoya Mesa, asistente editorial.
Coordinación de Publicaciones.
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.
Cuidado editorial: Camila Alejandra Rincón Carrillo, Sindy Tatiana Bedoya Mesa.
Diseño y maquetación: Julián Hernández–Taller de Diseño.
Impresión: Digiprint Editores S.A.S

Carta del editor
Editor's letter

1-4

Química Orgánica y Bioquímica

PfGBP: una proteína de unión al telómero de *Plasmodium falciparum*
PfGBP: A *Plasmodium falciparum* telomere binding protein
PfGBP: uma proteína de ligação o telómero em *Plasmodium falciparum*
Eliana Calvo T., Moisés Wasserman L.

5-10

Molecular and metabolic insights of creatine supplementation on resistance training
Perspectivas moleculares y metabólicas de la suplementación con creatina en el entrenamiento de fuerza
Perspectivas moleculares e metabólicas da suplementação de creatina no treinamento de força
Diego A. Bonilla, Yurany Moreno

11-18

Química Aplicada y Analítica

Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)
Analysis of cocaine in different samples by gas chromatography flame ionization detector (GC-FID)
Análise de cocaína em diferentes amostras por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID)
Ángela M. López C., William F. Garzón M., Milton Rosero-Moreano, Gonzalo Tabora O.

19-22

Determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano por microextracción en fase sólida- cromatografía de gases en Pereira, Colombia
Determination of trihalomethanes in drinking water by solid phase microextraction- gas chromatography in Pereira, Colombia
Determinação de trihalometanos na água para consumo humano por microextração em fase sólida- cromatografia em fase gasosa em Pereira, Colômbia
Olga I. Vallejo-Vargas, Leonardo Beltrán, Paola Franco, Carlos H. Montoya-Navarrete, Edwin Jhovany Alzate Rodríguez, Henry Reyes

23-29

Enseñanza de la Química

Relevant chemistry topics for the clinical practice of a physiotherapist
Tópicos de química relevantes para la práctica clínica de un fisioterapeuta
Tópicos químicos relevantes para a prática clínica de um fisioterapeuta
Rodrigo Ramírez-Tagle, Jaime Ocaranza-Ozimica, Nicolás Chávez, Macarena Valladares

30-35

Una metodología para el estudio de las ideas previas sobre química a través del análisis de expresiones gráficas
A methodology to the study of preconceptions about chemistry through the analysis of graphics expressions
Uma metodologia para o estudo das idéias preconcebidas sobre a química através do analises de expressões gráficas
Didier L. Ruíz, Liliam A. Palomeque

36-45

Guía para autores

46-55

El volumen 44 número 1 de 2015 de la Revista Colombiana de Química cuenta con la participación de distintos autores nacionales e internacionales. Las contribuciones provienen de autores de Colombia y Chile. A continuación presentamos los contenidos del número, publicados de acuerdo a su temática.

En la sección de Química Orgánica y Bioquímica tenemos dos artículos. El primero de ellos estudia la proteína PfGBP de *Plasmodium falciparum*. Por medio de este trabajo se dedujo que dicha proteína presenta capacidad de unión al ADN telomérico de este microorganismo; esto fue observado in vitro por lo que podría ser parte del complejo proteico encargado de proteger o mantener el telómero in vivo y de esta forma mantener la estabilidad del ADN. El segundo artículo estudia el metabolismo de la ingesta de creatina en la dieta y sus efectos en el entrenamiento de fuerza, de esta manera se amplía el conocimiento de la bioquímica deportiva. El artículo explica el aumento de masa muscular, la fuerza, la resistencia a la fatiga y el rendimiento en ejercicios de intensidad por medio del estudio de la biodisponibilidad energética de creatina y la acción buffer del sistema creatina/fosfocreatina/creatin quinasa.

En la sección de Química Aplicada y Analítica tenemos también dos artículos. El primero de ellos presenta la validación de los métodos establecidos por la UNODC (Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito) para la cuantificación y extracción de benzometilecgonina (cocaína) presente en las hojas de coca (*Erythroxylum coca*), en té de coca y en clorhidrato de cocaína. Los métodos estudiados fueron extracción sólido-líquido y extracción soxhlet. Se encuentra que por medio del segundo método se consigue aislar el analito de interés de manera más eficiente y de esta manera se facilita su cuantificación por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización por llama (CG-FID). En el segundo artículo se presenta la cuantificación de trihalometanos en el agua de consumo humano de la ciudad de Pereira-Colombia por medio de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases. Se optimizaron las variables del método analítico y se encontró que los trihalometanos presentes en el sistema de aguas se encuentran dentro del rango permitido por la legislación nacional e internacional.

Finalmente, en la sección dedicada a la Enseñanza de la Química se presentan dos artículos. Uno de ellos está dedicado a revisar la importancia de la química en la práctica clínica de fisioterapia en la Universidad Bernardo O'Higgins, en Santiago-Chile. El estudio se basa en las opiniones tanto de maestros como de estudiantes sobre qué tan importantes resultan ciertos temas de la química en el desarrollo de la carrera de fisioterapia. Como resultado se obtiene que los temas considerados más importantes están relacionados con la química biológica y que, por el contrario, los participantes consideran poco importante la química orgánica. Este artículo nos muestra la relación interdisciplinar que puede alcanzar la química en carreras distintas, dedicadas a la salud humana.

El último artículo presenta un estudio sobre las primeras concepciones que se tienen sobre la química en cursos de nivelación de colegios públicos y privados de la ciudad de Bogotá-Colombia. El estudio se hace a través de las respuestas gráficas que muestran las primeras asociaciones de los estudiantes con el campo de la química, entre las que predominan las relaciones con el laboratorio. Se encontró que es posible analizar la percepción de los jóvenes sobre el área de la química gracias al estudio de expresiones gráficas y establecer relaciones entre edad, sexo y orientación vocacional. Gracias a esta información puede lograrse una mejor planeación y desarrollo de las actividades del aula.

De esta manera, este número de la Revista Colombiana de Química permite ampliar el conocimiento en temas de metabolismo y biología molecular, métodos analíticos y enseñanza de la química.

The volume 44 number 1 of 2015 of Revista Colombiana de Química has the participation of both national and international authors. Authors are from Colombia and Chile. The following is the presentation of the contents of this number.

The section of Organic and Biochemical Chemistry has two articles. The first one studies the protein PfGBP from *Plasmodium falciparum*. By means of this work it was deduced that the protein PfGBP presents capacity of union to the telomeric DNA of this microorganism. This was observed in vitro, so it could be part of the complex protein responsible to protect or keep the telomere in vivo and thus keep the stability of DNA. The second article studies the metabolism of the creatine intake in the diet and its effects in the strength training, thus the article expands the knowledge of the sporting biochemistry. This article explains the increase of muscle mass, the strength, the fatigue resistance, and the performance in intense exercises, through the study of the creatine energetic bioavailability and the buffer role in the system creatine/phosphocreatine/creatin kinase.

The section of Applied and Analytical Chemistry have also two articles. The first of them presents the validation of the methods established by the UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) for the quantification and extraction of benzoylmethylecgonine (cocaine) present in coca leaves (*Erythroxylum coca*), in coca tea, and in cocaine hydrochloride. The methods studied were solid-liquid extraction and soxhlet extraction. It was found that the second method isolate the target analyte more efficiently. It facilitates its quantification by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (CG-FID). The second article shows the quantification of trihalomethanes in water for human consumption from the city of Pereira-Colombia through solid phase microextraction coupled to gas chromatography. The variables of the analytical method were optimized and it was found that the trihalomethanes present in the system of waters were within the range permitted by the national and international legislation.

Finally, the section dedicated to the Teaching Chemistry presents two articles. One of them is dedicated to review the importance of chemistry in the clinical practice of physiotherapy in the University Bernardo O'Higgins, in Santiago-Chile. The study is based in the opinions of both teachers and students about how important are some chemistry subjects in the development of the physiotherapy career. The subjects considered as important the topics related with the biological chemistry and that, on the contrary, the participants consider little significant the organic chemistry. This article shows the interdisciplinary relation that the chemistry can reach in diverse careers, dedicated to the human health.

The last article brings a study about the first conceptions that some students in leveling courses of public and private schools of the Bogotá-Colombia city have about chemistry. The study is done through graphic answers that show the first students associations with the chemistry field, in which predominate allusion to laboratory. The study revealed that the perception of young people about the chemistry area might be achieved by study their graphic expressions, as well as it is possible to establish relations among age, sex, and vocational orientation. This information might be useful to achieving a better planning and development of the classroom activities.

All in all, this number of Revista Colombiana de Química expands the knowledge in subjects such as metabolism and molecular biology, analytical methods, and chemistry teaching.

Recibido: 18 de Febrero 2015 Aceptado: 19 de Marzo 2015

PfGBP: una proteína de unión al telómero de *Plasmodium falciparum*

Resumen

Los telómeros son estructuras complejas de ADN y proteína localizadas en el extremo de los cromosomas eucariotes. Su principal función es proteger el extremo cromosomal de ser reconocido y procesado como ADNs fracturado, evitando así eventos de recombinación y fusión que conducen a inestabilidad cromosomal. El ADN telomérico consta de secuencias cortas, repetidas una tras otra, ricas en guanina; la cadena rica en guanina se extiende formando una región de cadena sencilla denominada extremo 3' protuberante. Las proteínas por su parte, se pueden clasificar en: dsBPs, o proteínas de unión a la cadena doble, GBPs aquellas que reconocen específicamente el extremo protuberante y, proteínas que las interconectan mediante interacciones proteína-proteína. El gen PF3D7_1006800 de *Plasmodium falciparum* codifica para una proteína putativa similar a una GBP de *Cryptosporidium parvum*, con el fin de establecer si esta proteína de *P. falciparum* presenta la capacidad de unión al ADN telomérico del parásito, se produjo una proteína recombinante a partir de la región codificante del gen, se purificó y se utilizó en ensayos de unión a ADN, y en la generación de anticuerpos policlonales específicos contra PfGBP. Nuestros resultados indican que la proteína de *P. falciparum* es una proteína nuclear con capacidad de unión al ADN telomérico *in vitro*, por lo que podría ser parte del complejo proteico encargado de proteger y/o mantener el telómero *in vivo*.

Palabras clave: telómero, proteínas de unión al telómero, telomerasa, hnRNPs, RRM, extremo protuberante 3', proteína recombinante, clonación.

PfGBP: A *Plasmodium falciparum* telomere binding protein

Abstract

Telomeres are specialized structures at the end of chromosomes that consist of repetitive DNA sequences and associated proteins. The primary role of telomeres is to protect the end of linear chromosomes from recombination, fusion, and recognition as broken DNA ends. This protective function can be achieved through association with specific telomere binding proteins. Telomeric DNA consists of G-rich double-stranded arrays followed by a single-stranded G-rich overhang. The telomeric proteins can be classified in dsBPs, which bind double-stranded DNA, GBPs those that bind specifically to G-rich overhang, and proteins that interact with telomeric factors. *Plasmodium falciparum* gene PF3D7_1006800 codifies for a protein highly similar to *Cryptosporidium parvum* GBP. In order to investigate whether the *P. falciparum* protein binds telomeric DNA, a recombinant protein was produced, purified and DNA binding assays were performed. Polyclonal antibodies against rPfGBP were produced and tested in western blot. Our results indicate that PfGBP is a nuclear protein that binds telomeric DNA *in vitro*, which could be part of the protein complex responsible for protecting and/or maintaining the telomere *in vivo*.

Keywords: telomere, Telomere binding protein, telomerase, hnRNPs, RRM, 3' overhang, recombinant protein, cloning.

PfGBP: uma proteína de ligação o telômero em *Plasmodium falciparum*

Resumo

Os telômeros são estruturas complexas de DNA e proteína localizadas no extremo dos cromossomos dos eucariotas. Sua principal função é proteger o extremo dos cromossomos para que não sejam reconhecidos e processados como DNAs fraturados. O anterior evita eventos de recombinação e fusão que conduzem à instabilidade nos cromossomos. O DNA telomérico tem sequências curtas e repetidas, ricas em guanina. A cadeia rica em guanina estende-se para formar uma região de cadeia simples chamada extremo 3' protuberante. As proteínas podem-se classificar em: dsBPs ou proteínas de união à cadeia dupla, GBPs que são as que reconhecem especificamente o extremo protuberante e, as proteínas que interligam mediante interações proteína-proteína. O gene PF3D7_1006800 de *Plasmodium falciparum* codifica para uma proteína similar a uma GBP de *Cryptosporidium parvum*. Com o objetivo de estabelecer se a proteína de *P. falciparum* apresenta a capacidade de união ao DNA telomérico, foi produzida uma proteína recombinante partindo da região codificante do gene, purificou-se e utilizou-se nos ensaios de união ao DNA e na geração de anticorpos policlonais específicos contra PfGBP. Os nossos resultados indicam que a proteína de *P. falciparum* é uma proteína nuclear com capacidade de união ao DNA telomérico *in vitro*, pelo que poderia fazer parte do complexo proteico encarregado de proteger e/ou manter o telómero *in vivo*.

Palavras-chave: telomerase, telômeros, hnRNPs, RRM, proteína recombinante, extremidade 3', clonagem.

Introducción

El telómero es una estructura compleja de ADN y proteína presente en los extremos de los cromosomas lineales eucariotes, cuya función principal es mantener la estabilidad del cromosoma protegiéndolo de degradación, fusión y recombinación, permitiendo así la replicación completa del ADN (1). El ADN telomérico consta de secuencias cortas, ricas en guaninas (G) que se repiten una tras otra. En la mayoría de organismos la cadena rica en G se extiende hacia el extremo 3' generando una región de ADN de cadena sencilla denominada extremo protuberante 3' u overhang (2). En cuanto a las proteínas teloméricas, éstas se pueden clasificar en tres grupos: aquellas que se unen al ADN de cadena doble o dsGBPs (double strand binding proteins), las que se unen al extremo protuberante o ssGBPs (single strand G rich binding proteins) y proteínas que las interconectan mediante interacciones proteína-proteína (3). Este complejo multiproteico cubre y protege el ADN de ser reconocido y procesado como ADN fracturado, por la maquinaria de reparación celular (4).

En células eucariotas, por cada división celular se presenta una pérdida de 50 a 200 bases de ADN telomérico, fenómeno conocido como el problema de la replicación final (5). En ausencia de mecanismos que compensen esta pérdida, se observa que luego de un número determinado de divisiones celulares los telómeros alcanzan una longitud crítica, lo cual interrumpe el crecimiento y lleva a un estado de senescencia y muerte celular (6). Este acortamiento telomérico es un mecanismo natural que limita la capacidad de proliferación de las células somáticas, contrario a lo que ocurre en células tumorales y en aquellas con alta tasa de replicación, en las que el problema de la replicación final es solucionado por la adición *de novo* de secuencias teloméricas llevada a cabo por un complejo de ARN y proteína denominado telomerasa (7). En presencia de telomerasa activa, los telómeros se extienden o mantienen, la senescencia replicativa es evitada, y las células alcanzan un estado de crecimiento indefinido o "inmortalización" (8).

En células que tienen telomerasa activa, la longitud del ADN telomérico es normalmente regulada y mantenida dentro de límites definidos (9). La telomerasa es activada cuando los telómeros llegan a ser muy cortos, e inactivada cuando se alcanza la longitud promedio; esta activación-inactivación del complejo enzimático es altamente regulada, siendo el acceso al sustrato telomérico, uno de los principales puntos de control. En este punto, las proteínas asociadas al telómero cumplen un rol fundamental, previniendo o por el contrario, promoviendo el acceso de la enzima al extremo protuberante 3' y por tanto permitiendo en el primer caso el acortamiento y en el segundo, la extensión (4,10).

Las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares o hnRNPs son una gran familia de proteínas de unión a ácidos nucleicos caracterizadas por dos motivos de reconocimiento de ARNs (RRMs) altamente conservados (11), están involucradas en la maduración del ARN mensajero y en el mantenimiento del telómero (12). En este aspecto, pueden actuar como ssGBPs las hnRNPs A1, A2/B1, A3, D, y E y proteínas homólogas de otros organismos (13, 14, 15, 16, 17), como proteínas que despliegan la estructura en G-cuádruplex las hnRNPs D, UP1 y A*2 (18, 19, 20), conformación adoptada por la cadena sencilla rica en guanina que secuestra el extremo telomérico e impide el acceso de telomerasa (21) y como proteínas que interactúan y regulan la actividad del complejo telomerasa, las A1, C1/C2 y D (22, 17). Se ha postulado que los motivos de unión a ácidos nucleicos les permitirían actuar como un adaptador molecular entre el telómero y la telomerasa; un sitio reconocería el sustrato telomérico (cadena sencilla rica en guanina), mientras que el otro reconocería la subunidad ARN del complejo telomerasa (23,15).

Se han descrito ssGBPs similares a las hnRNPs encontradas en *Chlamydomonas reinhardtii* CrGBP1, *Saccharomyces cerevisiae* ScGBP2 o RFL6 y NPL3 y *Cryptosporidium parvum* CpGBP (24, 25, 26, 27, 28);

organismos unicelulares que presentan alta tasa de multiplicación y que podrían mantener la longitud de sus telómeros vía telomerasa. *Plasmodium falciparum*, agente causante de la forma más severa de malaria humana, es un parásito protozoario que presenta un complejo ciclo de vida en el que la replicación del ADN, fundamental para la proliferación del parásito, tiene lugar en varios puntos del ciclo celular (29). Sólo en el huésped humano, cada parásito puede generar entre 16 a 32 células hijas en un periodo de tan solo 48 h. Esta gran capacidad de proliferación sugiere la existencia de un mecanismo para el mantenimiento de los telómeros que le permita compensar la pérdida de secuencias asociada a cada ronda de replicación y evitar la senescencia replicativa. Aunque la actividad telomerasa en este parásito fue reportada desde el año 1998 (30, 31, 32), aun no se han identificado las proteínas que regulan esa actividad enzimática.

Dado que el genoma de *Plasmodium* codifica para una proteína similar a CrGBP y que proteínas humanas pertenecientes a la misma familia, no solo se unen al ADN telomérico sino que regulan la actividad telomerasa, quisimos establecer si la proteína de *P. falciparum* puede reconocer y unirse a oligos de cadena sencilla que simulan el ADN telomérico. Para esto, se produjo y se purificó una proteína recombinante, con la cual se realizaron ensayos de retardación de ADN en gel. Además se produjeron anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína recombinante que fueron usados en ensayos de western blot.

Materiales y métodos

Alineamiento múltiple de secuencias

Se seleccionaron las secuencias de aquellas GBPs de organismos unicelulares (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Cryptosporidium parvum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Eimeria tenella*) de las que se tuviera alguna evidencia de su capacidad de unión a ADN telomérico, se descargaron de la base de datos del GenBank y se realizó el alineamiento con el programa MEGA 6 (33). Los números de acceso son: Cr GBP1: XP_001690066.1; CpGBP: AAO39067.1; ScGBP2: P25555.1; EtGBP: CDJ37022.

Amplificación de la región codificante de PF3D7_1006800

Se realizó un RT-PCR con RNA obtenido de trofozoitos de *P. falciparum* cepa 3D7, como plantilla y oligos específicos que permiten amplificar toda la región codificante del gen. La transcripción reversa y la amplificación se llevó a cabo en un solo tubo, bajo las siguientes condiciones: Buffer 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM), 50 ng de ARN, oligo antisentido BamHI-ATGTCGATG-GAAAATAATAG 0,5 µM, dNTPs 0,5 mM y 2 U de enzima M-MLV (PROMEGA) en un volumen final de 18 µL. Se incubó por una hora a 42 °C se adicionó el oligo sentido NotI-TTATTCGTTATTTTCATA-ATTAAC 0,5 mM y 2,5 U de Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo con el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de: denaturalización (94 °C por 30 s), anillaje (53 °C por 30 s) y extensión (72 °C por 30 s); finalmente una extensión a 72 °C por 7 min. La generación del producto específico de 741pb, se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Clonación, expresión y purificación de PfGBP

El producto de PCR obtenido fue insertado en los sitios BamHI y NotI del vector de expresión pGEX4T2, el cual permite la generación de la proteína de interés fusionada a glutatión S transferasa (GST). El

plásmido recombinante denominado pGEX-PfGBP fue utilizado para transformar bacterias *Escherichia coli* de la cepa Codon Plus e inducir la producción de la proteína de fusión por adición de IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), a una concentración final de 0,1 mM. Se permitió el crecimiento por 16 h a 37 °C, las bacterias se recolectaron por centrifugación a 6000xg por 10 min a 4 °C, se resuspendieron en buffer Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, glicerol 5% y se lisaron por tratamiento con lisozima 1 mg/mL y choque térmico; cinco ciclos de enfriamiento en nitrógeno líquido y calentamiento a 37 °C. Luego de centrifugación a 12000xg por 15 min a 4 °C se recuperó el sobrenadante y se llevó a cabo la purificación por cromatografía de afinidad con una resina de glutatión sefarosa. Se permitió la interacción resina-ligando por 4 horas a 4 °C, la resina se lavó con diez volúmenes de buffer de lisis y finalmente las proteínas unidas de manera específica se eluyeron por adición de glutatión reducido a una concentración de 10 mM. Todas las fracciones de la cromatografía se analizaron por SDS-PAGE y western blot; como anticuerpo primario se utilizó un anti GST comercial 1:2000 (Abcam) y como secundario un anti IgG de conejo conjugado a biotina 1:2000 (SIGMA).

Ensayos de unión ADN-proteína: Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Las reacciones fueron realizadas en buffer de unión 1X (Tris 10 mM pH 7,5, KCl 50 mM, DTT 0,1 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 5%) con 200 fmol de oligo biotinilado y 2-10 mg de GST-GBP en un volumen final de 20 μ L, por 60 min a 20 °C. Los complejos proteína – sonda fueron corridos en geles no denaturantes de poliacrilamida al 8%, transferidos a membranas de nylon y entrecruzados a la membrana por radiación con luz UV por 5 min. La detección se realizó por quimioluminiscencia con el kit LightShift EMSA (Thermo) según el protocolo sugerido por el fabricante. Los oligos utilizados se denominaron: Tel G Biotin: (GGGTT(T/C)A)₄ para el oligo que simula la cadena sencilla rica en guanina, Tel C Biotin: (T(G/A)AACCC)₄ para el oligo complementario y TSR₈Biotin: (GGGTT(T/C)A)₈ para el oligo que simula ADN telomérico de cadena doble.

Producción de anticuerpos específicos contra PfGBP

Cuatro ratones Balb/c de seis semanas de edad fueron inmunizados intraperitonealmente con 50 mg de proteína emulsificada en adyuvante completo de Freund. Al día 14 y 28 se realizaron refuerzos con 25 mg de proteína en adyuvante incompleto de Freund. El día 35 los animales fueron sacrificados, la sangre fue recolectada y el suero recuperado por centrifugación a 2500xg por 10 min. El suero fue suplementado con glicerol al 10% y almacenado a -80 °C.

Obtención de extractos proteicos del parásito y detección de PfGBP por western blot

Dos mil millones de parásitos (2×10^9) en el estadio de trofozoito maduro fueron resuspendidos en 1 mL de buffer TMG (Tris 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1,5 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 10 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma) e inhibidor de RNAsas (RNase OUT, Invitrogen) y lisados por incubación con NP40 al 0,5% a 4 °C por 30 minutos. Luego de centrifugación a 15.000xg por 30 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó, alicuotó y almacenó a -70 °C; esta fracción se denominó fracción citosólica. Para obtener extractos nucleares, el sedimento se resuspendió en buffer de extracción (TMG-NaCl 420 mM) y se incubó a 4 °C por 30 min en agitación constante. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 12.000xg por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante denominado fracción nuclear, se alicuotó y almacenó a -70 °C. La calidad de los extractos se verificó por SDS-PAGE y la concentración se determinó por el método de Bradford (34).

Para la detección de PfGBP por western-Blot, 50 mg de extracto proteico fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con TBST-L (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween al 0,1%, leche descremada al 5%), por 2 h a temperatura ambiente y probadas con el suero anti-GPB dilución 1:1000 por 1 h; como anticuerpo secundario se utilizó un anti IgG de ratón biotinilado (SIGMA) dilución 1:2000 y para la detección un conjugado de estreptavidina – fosfatasa alcalina (PROMEGA) dilución 1:3000.

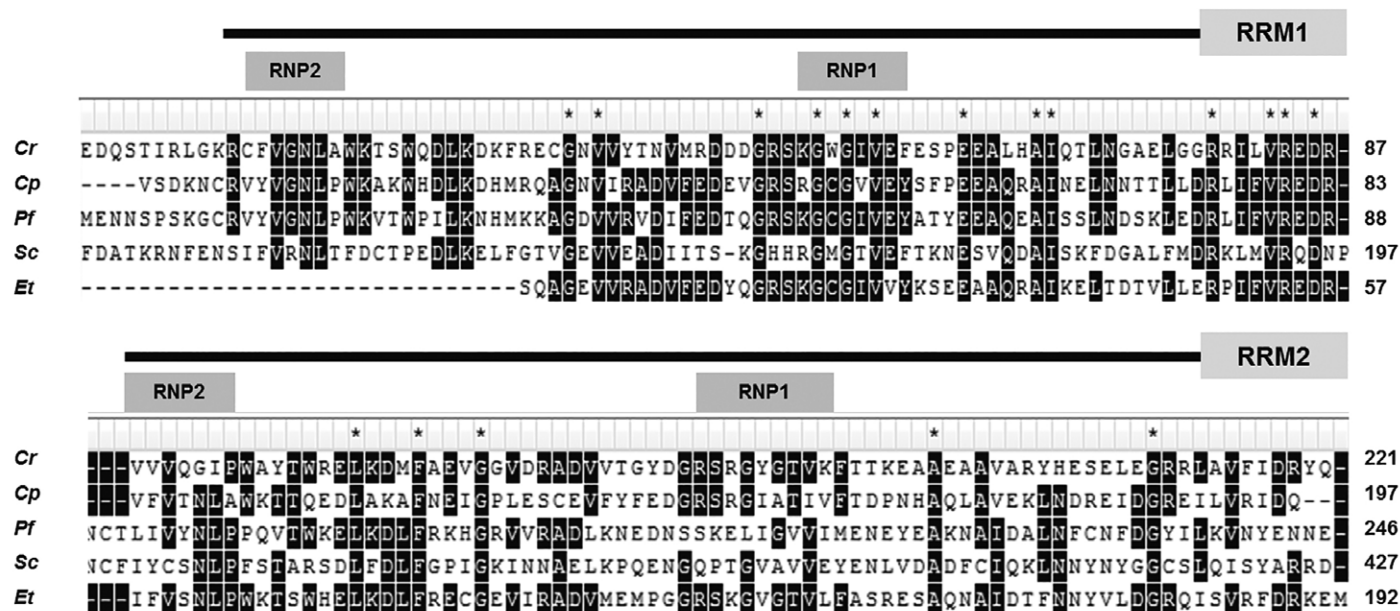


Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de GBPs. Las secuencias correspondientes a *Chlamydomonas reinhardtii* Cr: XP_001690066.1; *Cryptosporidium parvum* Cp: AA039067.1; *Saccharomyces cerevisiae* Sc: P25555.1; *Eimeria tenella* Et: CDJ37022, fueron alineadas con el programa MEGA 6. Se muestran solo los motivos de reconocimiento de ARN (RRM) y se localizan los submotivos de unión a ARN (RNP). Los aminoácidos conservados se resaltan en negro y los residuos idénticos están marcados con un asterisco.

Resultados

La búsqueda de proteínas similares a las GBPs en la base de datos de *Plasmodium* disponible en www.plasmodb.org se realizó por BLAST P (Basic Local alignment Search Tool), utilizando la secuencia AAO39067.1 de *C. parvum* como secuencia blanco. Como resultado se obtuvo la secuencia PF3D7_1006800 con un E value de $6e^{-35}$, una proteína putativa de unión a ARN de 246 aminoácidos la cual presenta dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM) localizados en los extremos de la proteína, conectados por una región central o bisagra. El RRM1 se ubica entre los aminoácidos 10 a 90 y el RRM2 entre el aa 170 y el 240. El motivo RRM1 de PF3D7_1006800 presenta una identidad del 62% y una similitud del 78% con el RRM1 de *Cp* AAO39067.1, mientras que el RRM2 es menos conservado, con una identidad del 39% y una similitud del 56%. Los RRM1s contienen dos submotivos denominados RBDs (RNA binding domains) o RNPs (11); en estos dos submotivos

del RRM1 (VYVGNLP y RGCGVVEY), la similaridad entre las dos secuencias llega a ser de 100% (Figura 1). Aunque la búsqueda arrojó otras proteínas de unión a ARN, el E value estuvo alrededor de 10^{-6} a 10^{-3} , razón por la cual se escogió la secuencia PF3D7_1006800 como la homóloga de *Cp* AAO39067 o *Cp*GBP1. Para establecer el grado de conservación de esta proteína con las GBPs reportadas hasta el momento, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los motivos de unión a ARN de cada proteína, mediante la herramienta CLUSTALW (Figura1). Dado que la secuencia presentó un alto grado de conservación tanto con la proteína de *C. parvum* como con las otras GBPs, específicamente en los RRM1s, se denominó PfGBP.

Para establecer si esta proteína podía reconocer y unirse a secuencias teloméricas, fue necesario producir una proteína recombinante en *E. coli*. La región codificante del gen se clonó en el vector de expresión pGEX 4T2 y se expresó como una proteína de fusión con GST. La proteína de 55 KDa fue purificada por cromatografía de afinidad (Figura 2A) y utilizada en ensayos de EMSA (Figura 2B-C). Estos ensayos mostraron que la pro-

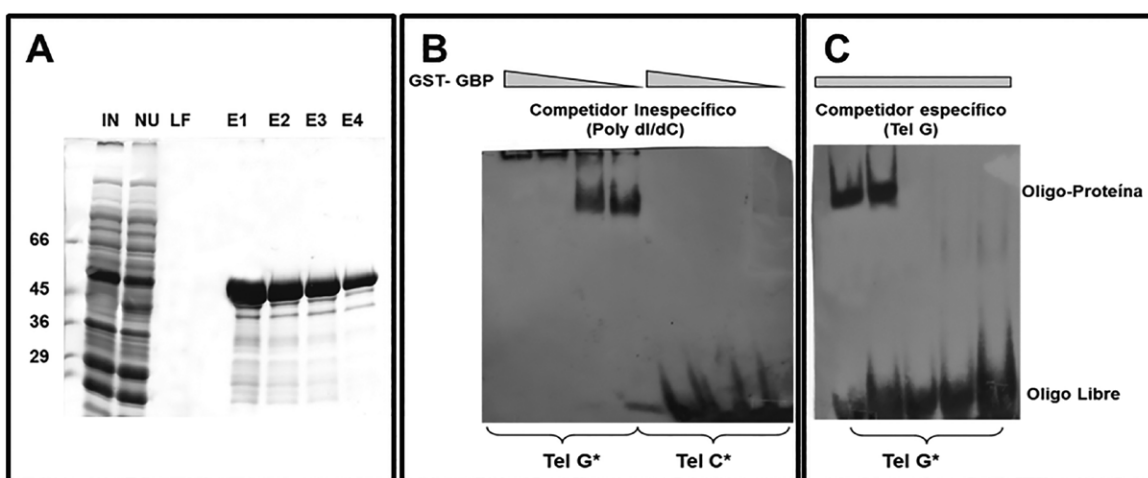


Figura 2. Purificación de GST-GBP y ensayos de movilidad electroforética (EMSA). A. Purificación de la proteína recombinante GST-PfGBP por cromatografía de afinidad. 15 mL de las fracciones de la cromatografía se analizaron por SDS-PAGE. IN: Extracto Inicial; NU: Proteínas no unidas; LF: Lavado final; E: Eluidos. B. EMSA: Se utilizaron 200 fmol de oligo biotinilado (TelG* o TelC*) y cantidades crecientes de GST-GBP (2,5; 5,0; 7,5 y 10,0 mg). La reacción de unión se realizó en presencia de un exceso poli dI/dC, como competidor inespecífico. C. EMSA. Se utilizaron 2,5 mg of GST-GBP, 200 fmol de oligo TelG biotinilado (TelG*) y cantidades crecientes de oligo no marcado TelG (0,0; 1,0; 5,0 y 10,0 pmol).

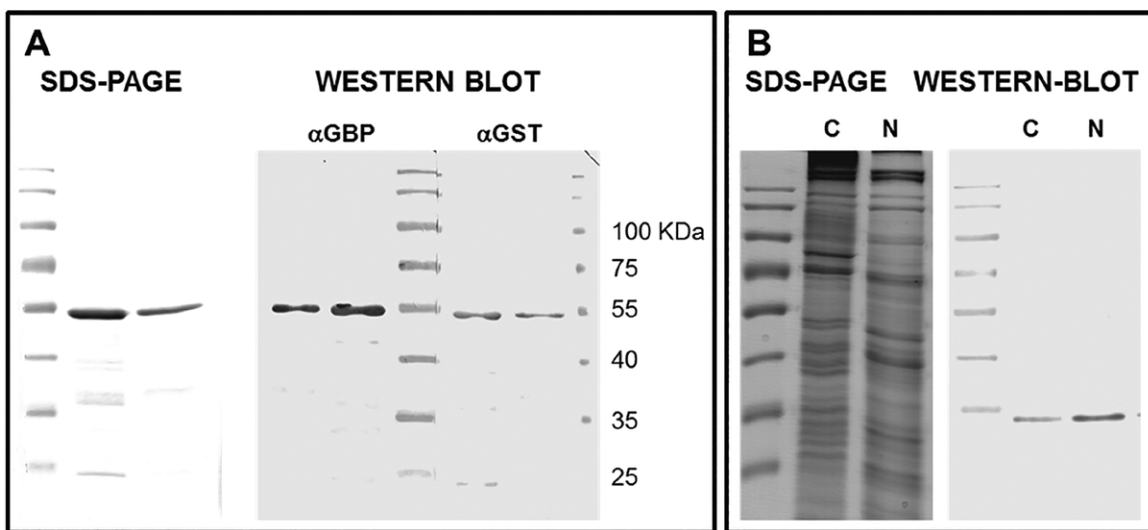


Figura 3. Detección de GST-GBP y Pf-GBP por Western Blot. A. Detección de GST-GBP. Como antígeno se utilizó la proteína GST-GBP purificada y como anticuerpo primario un anti GST comercial y el anti PfGBP obtenido; como anticuerpo secundario un anti IgG de ratón biotinilado y para la detección un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina. B. Detección de PfGBP. Como antígeno se utilizaron 50 mg de extractos citoplasmáticos (C) y nucleares (N), como anticuerpo primario el anti PfGBP obtenido; como anticuerpo secundario un anti IgG de ratón biotinilado y para la detección un conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina.

teína recombinante es capaz de seleccionar el oligo que simula el ADN telomérico de cadena sencilla de *P. falciparum* [GGGTT(T/C)A]₄, unirse a este y causar un cambio en su movilidad (Figura 2B), aun en presencia de un exceso de oligo competidor poli dI/dC que no la contiene. La proteína no se unió al oligo que simula la cadena complementaria [T(G/A)AACCC]₄ cadena sencilla rica en citosina, el oligo permanece libre, aun en presencia de 10 mg de la proteína (Figura 2B). Los ensayos de unión entre la proteína y el oligo biotinilado TelG* en presencia de un exceso del oligo no biotinilado demostraron que la unión es específica, pues la señal oligo-proteína va desapareciendo a medida que la cantidad de competidor aumenta, lo que indica que el oligo biotinilado es desplazado del complejo TelG*-proteína por el oligo no marcado (Figura 2C).

Para poder reconocer la proteína del parásito, se generaron anticuerpos específicos, utilizando como inmunógeno la recombinante producida. El anticuerpo generado detectó la proteína de fusión con GST en 55 kDa, como lo hace el anti GST comercial (Figura 3A) y una banda por debajo de los 35 kDa, en extractos del parásito que podría corresponder a PfGBP, cuyo peso molecular se estima en 30 kDa (Figura 3B). La proteína fue detectada tanto en extractos citosólicos como en nucleares, obtenidos a partir de parásitos en el estadio de trofos maduros y esquizontes tempranos, estadios en los que hay una replicación activa del ADN (29).

Discusión

La proteína codificada por el gen PF3D7_1006800 podría ser considerada como la GBP de *Plasmodium falciparum*, dado que presenta una similitud de secuencia considerable (50-66%) con las GBPs reportadas hasta el momento, cuya capacidad de unión al ADN telomérico de cadena sencilla reside en los motivos RRM. El análisis de su secuencia mostró alto grado de conservación en estos motivos, específicamente en los RBDs del RRM1. Al igual que la proteína de *C. parvum* (28), PfGBP se une de manera específica a oligos de cadena sencilla que simulan el ADN telomérico *in vitro* y se puede detectar en extractos nucleares del parásito. En CpGBP la capacidad de unión al ADN telomérico reside en el RRM1, proteínas truncadas que pierden este motivo y conservan el RRM2 pierden la habilidad para unirse al sustrato telomérico (28); cabe señalar aquí que los dos RBDs presentes en el motivo RRM1 son casi idénticos en las dos secuencias, por lo cual es posible que este motivo sea el responsable de la unión al sustrato telomérico en PfGBP. *C. parvum* al igual que *P. falciparum* es un parásito intracelular obligado, perteneciente al phylum apicomplexa, con un complejo ciclo de vida y con una alta tasa de proliferación (35), en el que el mantenimiento de los telómeros podría realizarse vía telomerasa, de aquí que sea de gran relevancia haber identificado proteínas de unión al telómero homólogas en estos dos organismos.

De otro lado, PfGBP presenta una similitud significativa con GBPs que han demostrado tener la capacidad de asociarse al telómero no solo *in vitro* sino *in vivo*, entre ellas EtGBP y NtGBP1. La proteína de *Eimeria tenella* (otro parásito apicomplexa) fue identificada recientemente siguiendo la misma estrategia presentada en este estudio. En este caso, los autores a través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, con un anticuerpo específico anti EtGBP demostraron que se da la unión de esta GBP al ADN telomérico en el parásito (36). La proteína de *Nicotiana tabacum*, la cual presenta una similitud del 46% con la proteína de *Plasmodium*, fue identificada en extractos nucleares utilizando un oligo que simula su ADN telomérico como oligo de afinidad, luego de purificarla y secuenciarla se identificaron los dos motivos RRM característicos de las hnRNPs, familia a la que pertenecen las GBPs (37). Más adelante se estableció que NtGBP es fundamental para mantener la estabilidad del genoma, pues células en las que los niveles de proteína fueron

disminuidos por ARN interferentes exhibieron telómeros más largos, círculos extracromosomales de ADN telomérico y puentes anormales durante la anafase (38), señales que indican que hubo una alteración en los telómeros y la maquinaria de reparación de ADN fue activada (4, 10). La asociación directa entre NtGbp, la actividad telomerasa y el mantenimiento del telómero fue establecida recientemente (39); células con actividad telomerasa y GBP disminuida presentaron un 3' overhang más corto, lo que llevó a una pobre unión de GBP dejando desprotegido y susceptible al ADN telomérico, lo que condujo a la activación de vías de reparación y a eventos de recombinación. Lee y Kim sugirieron que se debe mantener cierta longitud de la cadena sencilla por acción de la telomerasa, de manera que GBP se pueda unir y proteger al telómero de ser reconocido y procesado por la máquina celular (39).

Conclusión

La proteína denominada PfGBP se identificó por bioinformática, basándose en la presencia de motivos de RRM. Esta proteína se detectó en extractos nucleares del parásito y mostró tener capacidad de unión a oligos de cadena sencilla que simulan el telómero; esto sugiere que PfGBP podría formar parte del complejo proteico encargado de proteger y/o mantener el telómero en *P. falciparum*, sin embargo esta asociación con el ADN telomérico se debe demostrar *in vivo*.

Referencias

1. Blackburn, E. Structure and function of telomeres. *Nature*. **1991**, 350 (6319), 569-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/350569a0>.
2. Henderson, E.; Blackburn, E. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9(1), 345-348.
3. De Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **2005**, 19(18), 2100-2110.
4. Palm, W.; de Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **2008**, 42, 301-334.
5. Levy, M.; Allsopp, R.; Futcher, A.; Greider, C.; Harley, C. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **1992**, 225, 951-60. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90096-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90096-3).
6. Prescott, J.; Blackburn, E. Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Curr. Opin. Gen. Develop.* **1999**, 9, 368-373. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80055-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80055-0).
7. Greider, C.; Blackburn, E. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. **1985**, 43, 405-413. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9).
8. Kim, N.; Piatyszek, M.; Prowse, K. Specific association on human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **1994**, 266, 2011-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.7605428>.
9. Shampay, J.; Blackburn, E. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1988**, 85, 534-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.85.2.534>.
10. Bianchi, A.; Shore, D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol. Cell*. **2008**, 31, 153-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.013>.
11. Birney, E.; Kumar, S.; Krainer, A. Analysis of the RNA-recognition motif RS and RGG domains: Conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic. Acids. Res.* **1993**, 21, 5803-5816. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/21.25.5803>.
12. He, Y.; Smith, R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2009**, 66, 1239-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8532-1>.

13. Fiset, S.; Chabot, B. hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. *Nucleic. Acids. Res.* **2001**, *29*, 2268-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.11.2268>.
14. Zhang, Q.; Manche, L.; Xu, R.; Krainer, A. hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA*. **2006**, *12*, 1116-1128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1261/rna.58806>.
15. Moran-Jones, K.; Wayman, L.; Kennedy, D.; Reddel, R.; Snee, M.; Smith, R. hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere. *Nucleic. Acids. Res.* **2005**, *19*, 486-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki203>.
16. Huang, P.; Hung, S.; Wang, T. Telomeric DNA-binding activities of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1803*, 1164-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2010.06.003>.
17. Chen, L.; Lingner, J. AUF1/HnRNP D RNA binding protein functions in telomere maintenance. *J. Mol. Cell.* **2012**, *47*, 1-2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.031>.
18. Enokizono, Y.; Konishi, Y.; Nagata, K.; Ouhashi, K.; Uesugi, S.; Ishikawa, F.; Katahira, M. Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18862-18870. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411822200>.
19. Nagata, T.; Takada, Y.; Ono, A.; Nagata, K.; Konishi, Y.; Nukina, T.; Ono, M.; Matsugami, A.; Furukawa, A.; Fujimoto, N.; Fukuda, H.; Nakagama, H.; Katahira, M. Elucidation of the mode of interaction in the UP1-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity. *Nucleic. Acids. Res.* **2008**, *36*, 6816-6824. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn767>.
20. Wang, F.; Tang, M.; Zeng, Z.; Wu, R.; Xue, Y.; Hao, Y.; Pang, D.; Zhao, Y.; Tan, Z. Telomere- and telomerase-interacting protein that unfolds telomere G-quadruplex and promotes telomere extension in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2012**, *109*, 20413-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200232109>.
21. Wang, Q.; Liu, J.; Chen, Z.; Zheng, K.; Chen, C.; Hao, Y.; Tan Z. G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase. *Nucleic. Acids. Res.* **2011**, *39*, 6229-6237. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr164>.
22. Ford, L.; Suh, J.; Wright, W.; Shay, J. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 9084-9091. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.23.9084-9091.2000>.
23. Ford, L.; Wright, W.; Shay, J. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene.* **2002**, *21*, 580-583. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1205086>.
24. Petracek, M.; Konkel, L.; Kable, M.; Berman J. A Chlamydomonas protein that binds single-stranded G-strand telomere DNA. *EMBO J.* **1994**, *13*, 3648-58.
25. Johnston, S.; Lew, J.; Berman, J. Gbp1p, a protein with RNA recognition motifs, binds single-stranded telomeric DNA and changes its binding specificity upon dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 923-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.19.1.923>.
26. Konkel, L.; Enomoto, S.; Chamberlain, E.; McCune-Zierath, P.; Iyadura, S.; Berman J. A class of single-stranded telomeric DNA binding proteins required for Rap1p localization in yeast nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, *92*, 5558-5562. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.12.5558>.
27. Lee-Soety, J.; Jones, J.; MacGibeny, M.; Remaly, E.; Daniels, L.; Ito, A.; Jean, J.; Radecki, H.; Spencer, S. Yeast hnRNP-related proteins contribute to the maintenance of telomeres. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *426*, 12-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.144>.
28. Liu, C.; Wang, L.; Lancto, C.; Abrahamsen, M. Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G-strand telomeric DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *165*, 132-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.01.013>.
29. Janse, C.; van der Klooster, P.; van der Kaay, H.; van der Ploeg, M.; Overdule, J. Mitomycin-C is an unreliable inhibitor for study of DNA synthesis in *Plasmodium*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1986**, *21*, 33-6. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90076-9](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(86)90076-9).
30. Aldous, W.; Martin, R.; and Kyle, D. Stage specific detection and inhibition studies of *Plasmodium falciparum* telomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *95*, 281-285. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00111-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00111-X).
31. Bottius, E.; Bakhsis, N.; and Sherf, A. *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 919-925. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.18.2.919>.
32. Raj, D.; Das, B.; Dash, A.; Supakar, P. Identification of telomerase activity in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 685-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.056>.
33. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; and Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evolution.* **2013**, *30*, 2725-2729. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
34. Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-54. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
35. Fayer, R.; Xiao, L. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2ª Edición. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 2007; pp 11-20.
36. Zhao, N.; Gong, P.; Li, Z.; Cheng, B.; Li, J.; Yang, Z.; Li, H.; Yang, J.; Zhang, G.; Zhang, X. Identification of a telomeric DNA-binding protein in *Eimeria tenella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *451*, 599-602. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.030>.
37. Hirata, Y.; Suzuki, C.; Sakai, S. Characterization and gene cloning of telomere-binding protein from tobacco BY-2 cells. *Plant. Physiol. Biochem.* **2004**, *42*, 7-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.10.002>.
38. Lee, Y.; Kim, W. Tobacco GTBP1, a homolog of human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, protects telomeres from aberrant homologous recombination. *Plant. Cell.* **2010**, *22*, 2781-2795. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.076778>.
39. Lee, Y.; Kim, W. Telomerase-dependent 3' G-strand overhang maintenance facilitates GTBP1-mediated telomere protection from misplaced homologous recombination. *Plant. Cell.* **2013**, *25*, 1329-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.107573>.

Article citation:

Calvo, E. T.; Wasserman, M. L. PfGBP: una proteína de unión al telómero de *Plasmodium falciparum*. *Rev Colomb Quim.* **2015**, *44*(1), 5-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.53977>

Recibido: 11 de Febrero de 2015. Aceptado: 5 de marzo de 2015

Molecular and metabolic insights of creatine supplementation on resistance training

Abstract

In recent years the research problem in the field of sports supplementation has changed to explain the metabolic mechanisms by which creatine (Cr) administration enhances the performance of certain sports or simply benefits the muscular adaptation. In this review for first time the biochemical mechanisms of Cr ingestion in a cell signaling insight were analyzed, focusing on energetic bioavailability enhancement and optimization of the temporal and spatial buffering of Cr/PCr/CK system. Moreover, intensification in proliferation and differentiation processes of muscle cells (IGF-I/PI3K/Akt-PKB, SPHK1/MAPK/p38/MRFs, mTOR, cellular swelling, mitotic activity of satellite cells, actin polymerization, and myoblast fusion) and inactivation and/or reduction in the expression of ergolytic metabolites (GSK3 β , myostatin and AMPK regulation) were examined. In this way, we explained from a metabolic point of view the increase in muscle mass, strength, fatigue resistance, and performance of high intensity sports after Cr monohydrate supplementation.

Keywords: Cr/PCr/CK System, creatine monohydrate, muscle energy metabolism, MAPK, IGF-I, resistance training, high-intensity exercise.

Perspectivas moleculares y metabólicas de la suplementación con creatina en el entrenamiento de fuerza

Resumen

En los últimos años el problema de investigación en el campo de la suplementación deportiva ha cambiado al punto de explicar los mecanismos metabólicos por los cuales la administración de creatina (Cr) incrementa el rendimiento en ciertos deportes o simplemente beneficia la adaptación muscular. Esta revisión analiza por primera vez los mecanismos bioquímicos de la ingesta de Cr desde la perspectiva de señalización celular, enfocándose en la mayor biodisponibilidad energética de Cr y optimización de la acción buffer espacial/temporal que ofrece el sistema Cr/PCr/CK. Además, se examinan aspectos relacionados con el incremento en los procesos de proliferación y diferenciación de células musculares (IGF-I/PI3K/Akt-PKB, SPHK1/MAPK/p38/MRFs, mTOR, hinchamiento celular, actividad mitótica de células satélite, polimerización de actina y fusión de mioblastos) y la inactivación y/o reducción en la expresión de proteínas con funciones ergolíticas (GSK3 β , miostatina y regulación de AMPK). De esta manera, se explican el aumento de la masa muscular, la fuerza, la resistencia a la fatiga y el rendimiento en ejercicios de alta intensidad, producidos por la suplementación con monohidrato de Cr, desde un punto de vista metabólico.

Palabras Clave: sistema Cr/PCr/CK, monohidrato de creatina, metabolismo energético muscular, MAPK, IGF-I, entrenamiento de fuerza, ejercicio de alta intensidad.

Perspectivas moleculares e metabólicas da suplementação de creatina no treinamento de força

Resumo

Nos últimos anos, o problema de pesquisa no campo da suplementação de esportes mudou ao ponto de explicar os mecanismos metabólicos pelos quais a administração de creatina (Cr) aumenta o desempenho em alguns esportes ou benefícios de adaptação musculares. Neste artigo, vamos analisar primeiro os mecanismos bioquímicos de ingestão da Cr a partir da perspectiva de sinalização celular, com foco em maior biodisponibilidade de energia de Cr e otimização de tampão temporais/espacial ação oferecida pelo sistema Cr/PCr/CK. Além disso, são considerados aspectos relacionados com o aumento da os processos de proliferação e diferenciação de células musculares (IGF-I/PI3K/Akt-PKB, SPHK1/MAPK/p38/MRFs, mTOR, inchaço celular, atividade mitótica da célula satélite, a polimerização de actina e de fusão de mioblastos) e inativação e/ou a redução na expressão de proteínas com funções ergolíticas (GSK3, miostatina e regulação da AMPK). Desta maneira, é explicado o aumento da massa muscular, força, resistência à fadiga e desempenho em exercícios de alta intensidade, produzidos pela suplementação com Cr monohidratada, a partir de um ponto de vista metabólico.

Palavras-chave: sistema Cr/PCr/CK, creatina monohidratada, metabolismo energético muscular, MAPK, IGF-I, treinamento de força, treinamento de alta intensidade.

Introduction

Creatine (Cr) was discovered in 1832 by the French scientist Michel Eugene Chevreul, who extracted from meat a new organic constituent and named it creatine, from Greek *κρέας* = *kreas* flesh (1). Cr or *N*-(aminoiminomethyl)-*N*-methyl-glycine (CAS 57-00-1, 2006) is a metabolite with a molecular dimension similar to an amino acid (2) which is synthesized mainly in liver, kidney, and pancreas (3). Endogenous synthesis of Cr starts with the transfer of the amidino group of arginine to the amino group of glycine by L-Arginine-Glycine amidinotransferase (AGAT – EC 2.1.4.1) yielding L-ornithine and guanidinoacetate (3). Then, guanidinoacetate is methylated at the original nitrogen of glycine using S-adenosylmethionine as donor of the methyl group. This reaction produces Cr and S-adenosylhomocysteine and is catalyzed by Guanidinoacetate N-Methyltransferase (GAMT – EC 2.1.1.2) (Figure 1) (4, 5).

On the other hand, Cr is degraded spontaneously through a monomolecular reaction to creatinine (Crn, MW 113.1 g/mol), which is quantitatively excreted in the urine (6). The rate of excretion is estimated about 1.7% of the total Cr (TCr) body pool per day (7). Cr is primarily present in cells with high and intermittent energy (8). However, the tissues that store the highest concentrations of this metabolite do not synthesize it on their own but obtain it Cr from the bloodstream via a specific carrier (CreaT), nowadays denominated as SLC6A8 (9, 10, 11). Near 95% of the Cr reserves in the body are found in skeletal muscle and the other 5% remaining is distributed in heart, brain, liver, kidney, testicles, retina, and epithelial cells (8, 9, 12, 13). The average concentration of Cr in muscle tissue is 120 mmol/kg dry-mass (4). In muscle, Cr is found in a ~33% in natural form and the ~67% remaining in form of phosphocreatine (PCr), the energetically loaded form via creatine kinase (CK-EC 2.7.3.2), hence acting as a cellular buffer on H^+ ions (Figure 2).

High-energy phosphates, as PCr, provide the necessary energy for muscle contraction to the start-up of the activity and during explosive, short and high intensity exercise. In the periods of muscular inactivity, PCr is rapidly resynthesized, paradoxically this process requires the energy precedent of ATP hydrolysis from aerobic systems (14, 15).

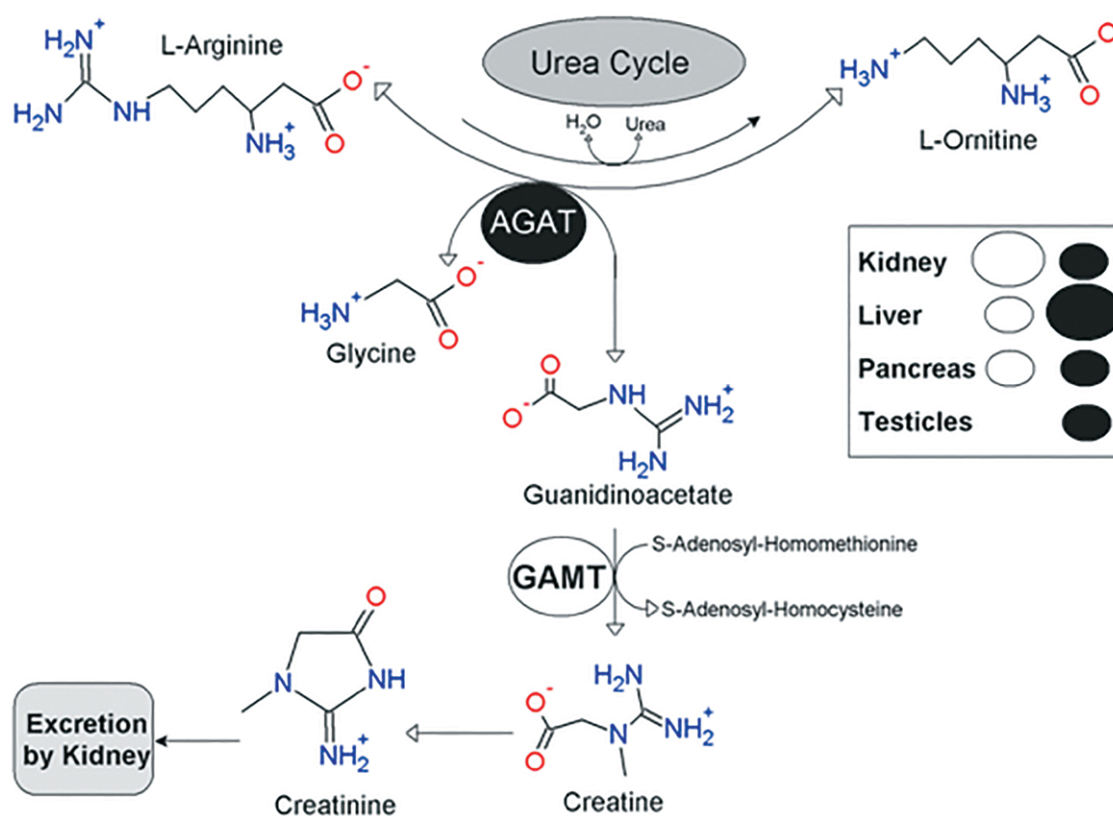


Figure 1. Creatine Synthesis and Degradation.

Software; Advanced Chemistry Development / ChemSketch (Freeware) 11.02.

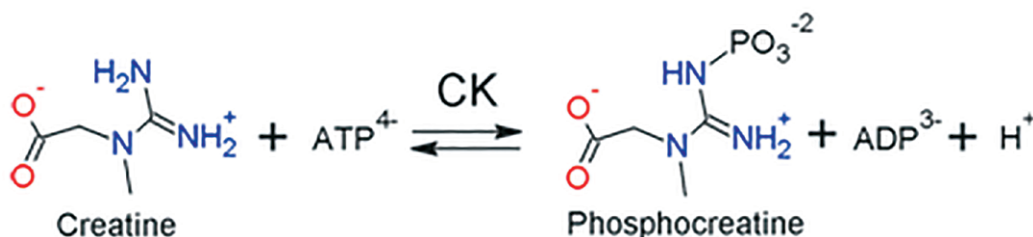


Figure 2. Creatine Kinase Reaction.

Software; Advanced Chemistry Development / ChemSketch (Freeware) 11.02.

Cr crystallizes from water as monoclinic prisms holding one molecule of water of crystallization per molecule of Cr (2), forming the popular dietary supplement known as Cr monohydrate, which makes part of the most frequent nutritional supplements used by amateur and elite athletes due to its ratified ergogenic effects on resistance training (16-27). However, the metabolic principles that explain the positive effects of Cr supplementation on athletic performance remains less understood currently.

Creatine supplementation on fatigue resistance

The main event after Cr ingestion is the increase in serum and muscular Cr levels, without variations on ATP concentrations (24, 28, 29). For example, in response to higher doses (20 g Cr), serum Cr concentration increased by 50-fold (peak value of serum Cr is approximately 2.17 ± 0.66 mM) 2.5 hours after ingestion. However, in response to lower doses (< 2 g Cr), the blood increase in Cr is insignificant (30). In skeletal muscle, Cr and PCr concentrations, before supplementation, are approximately 85 and 41 mmol/kg dry mass respectively, which equals to an intracellular TCr concentration of 40-50 mM (100-150 mmol/kg dry mass). Nevertheless, TCr levels increase by about 25% after Cr supplementation (31), and 37% if the Cr ingestion is accompanied of exercise (29). In this sense, it has been reported that Cr supplementation increases muscle PCr content approximately by 20%, generally from 70-90 to 85-105 mmol/kg dry mass (32). Accordingly, this suggests that the PCr/TCr ratio (do not confuse with the PCr/Cr ratio) diminishes after Cr supplementation at rest. Assuming equilibrium of the CK reaction, this decrease in PCr/TCr implies increased cytoplasmic ADP and decreased Gibbs free energy of ATP hydrolysis in muscle, which seems contrary to the reported ergogenic benefits of Cr supplementation. However, Braut *et al.* (33) showed that muscle concentrations of PCr and TCr increased linearly throughout 5 days of Cr supplementation (0.43 g/kg body mass/day) using ^{31}P and ^1H magnetic resonance spectroscopy (MRS). These results indicate that Cr supplementation does not alter the PCr/TCr ratio and hence the Gibbs free energy of ATP hydrolysis in muscle at rest. Indeed, during Cr supplementation the TCr muscle levels keep its normal homeostasis due to the increment in PCr and Cr by ~70% and ~30%, respectively. Meyer's (34) "electrical analog" model of respiratory control posits that the time constant (τ) for the exponential fall in muscle PCr concentration following the onset of muscle contractions is a function of the mitochondrial resistance and the metabolic capacitance. This capacitance leads to reduction of peak rates of ATP synthesis in cells with fluctuating energy consumption. Moreover, the capacitance allows repayment of energy "debt" during stages of high energy demand to occur between periods of low rates of energy consumption. The CK reaction concedes myocytes to sustain reduced mitochondrial volume, aid larger diameter fibers, and express faster isoforms of myosin (15). The Meyer's model predicts that an increase in mitochondrial density will result in a shorter τ (that is, faster PCr concentration, [PCr], kinetics) and that an increase in metabolic capacitance, determined predominantly by the muscle TCr content, will result in a longer τ (slower [PCr] kinetics) (35), and therefore benefits short duration high-intensity exercise. Currently, it is established that PCr concentration and VO_2 vary with similar kinetic profiles from the start-up of the exercise until a new state of energy production by oxidative metabolism. This data display that regulation of mitochondrial respiration is intimately linked to ATP/ADP and PCr/Cr ratios, by means of CK reaction (36). Jones *et al.* (35) developed a study to analyze the effect of Cr supplementation (20 g/day x 5 days) on [PCr] kinetics using ^{31}P MRS, following the onset and offset of both moderate-intensity and heavy-intensity exercise.

The results showed that Cr administration increments by ~8% the PCr/ATP relation consistent with the muscle TCr increase. Furthermore, τ for [PCr] was enhanced after Cr loading phase for moderate exercise and subsequent recovery and for heavy exercise but not for subsequent recovery. These data demonstrate, for the first time in humans, that an increase in muscle [PCr] results in a slowing of [PCr] dynamics in exercise and subsequent recovery.

Cr supplementation, besides regulating the muscular ATP and ADP concentrations, enhances myocellular PCr levels generating an increase in τ for [PCr] by means of a higher energy bioavailability of the CK system. This implies that ergogenic effects of Cr supplementation can be sustained from enhanced kinetic variables of PCr degradation process. Moreover, the augment of [PCr] generates a longer dependence of high energy phosphates metabolism to produce energy in a fast and effective way, also permitting less accumulation of fatigue-linked molecules as:

1. Inorganic Phosphate (Pi) and Hydrogen Ion (H^+): During short periods of high-intensity exercise, Pi and H^+ are accumulating within skeletal muscle originating apparition of fatigue through several mechanisms (37, 38). Cr supplementation has been shown to diminish the concentration of H^+ (30, 35, 39, 40) and Pi (39, 41). These phenomena also lead to less hypoxanthine accumulation (30, 42, 43).

2. Cytosolic Ca^{2+} concentration: High Ca^{2+} concentrations due to energy deficiency and less sarcoplasmic reticulum uptake during exercise are strongly associated with fatigue (44, 45, 46). Cr administration seems to improve the Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and parvalbumin (47, 48), while regulates the Ca^{2+} release during the excitation-coupling process (49, 50).

Creatine supplementation in the increasing lean body mass and muscle strenght

Increment of muscle protein synthesis is one of the Cr supplementation effects after resistance training, although it has converted an important point of debate due to tuneless findings of some investigations (51, 52). Nevertheless, since more than two decades many studies have revealed that Cr supplementation accompanying a period of resistance training increases muscle fibers size with respect to control subjects (53, 54, 55, 56, 57). In addition, *in vitro* studies have shown an increment in myotubes diameter after Cr exposition with regard to controls (58, 59, 60). However, a molecular point of view is needed in order to explain the myocellular responses to Cr supplementation, generally involving larger cross-sectional area and subsequent lean body mass and strength gain.

Nutrient, hormonal, and contractile stimuli often (but not always) converge at mammalian target of rapamycin (mTOR), suggesting that this protein is an important modulator of protein synthesis (61). mTOR is part of two multiprotein complexes; mTORC1, which activates downstream S6 kinase (S6K, also known as $\text{p}^{70\text{S6K}}$, which in turn phosphorylates the ribosomal protein S6 and other factors involved in translation, initiation and elongation stimulating protein synthesis) and phosphorylates the inhibitory eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4E-BP1); and mTORC2, which phosphorylates Akt (also called protein kinase B, PKB) at serine 473, this phosphorylation is required for maximum activation of Akt, thus regulating protein synthesis (62). Some investigations have analyzed the effect of Cr supplementation towards the proteins involved in the mTOR signaling pathway. Deldicque *et al.* (63) evaluated in a double-blind cross-over design the phosphorylation state of S6K1 and 4E-BP1 after Cr supplementation (21 g/day x day) in six men following 10 sets of 10 leg-press repetitions (every 5 s) at 70% of each individual 1-RM, and found that three hours post-exercise the

phosphorylation state of S6K1 increased by about 400% in both groups. However, the phosphorylation state of S6K1 returned to basal values 24 h post-exercise and Cr had no additional effect. In this way, the results of these investigations show that Cr supplementation has no effect on phosphorylation state of S6K1; notwithstanding, the association of S6K1 phosphorylation and muscle mass was demonstrated in human subjects after 12-weeks of resistance training; thus, it should be necessary the evaluation of long-term Cr supplementation on S6K1. On the other hand, though exists a potential Cr inhibition on 4E-BP1, it is important to stand out that 4E-BP1 phosphorylation is reduced during resistance exercise and is unchanged during post-exercise recovery. Thus, it appears that the contraction-induced increase in muscle protein synthesis is independent of changes in 4E-BP1 phosphorylation (61).

It has been demonstrated that Akt/PKB can activate directly the mTORC1 complex by phosphorylation on raptor or indirectly by means of phosphorylation and inhibition of the tuberous sclerosis complex (TSC) proteins 1 and 2 (62), moreover another novel negative regulator of mTORC1 is proline-rich Akt substrate-40 (PRAS40), which has been shown to bind mTOR via raptor to repress mTORC1 signaling. The inhibitory function of PRAS40 is reduced when phosphorylated by Akt/PKB (61). Additionally, mTORC1 is also positively regulated for amino acids, mainly leucine, by means of the vacuolar protein sorting-34 (Vps34) and mitogen activated protein kinase kinase kinase-3 (MAP4K3) (64). Finally, since synthesizing proteins is an energetically expensive cellular process, it is not surprising to find a specific regulator of mTORC1 function when energy is not sufficient. Indeed, mTORC1 has been shown to be inhibited by AMP-activated protein kinase (AMPK) through enhanced TSC2 activity and, recently, by phosphorylating raptor (61). Evidence suggests that Cr supplementation regulates the above upstream mTOR processes as we describe next.

Deldicque *et al.* (63) evaluated the effect of Cr supplementation (21 g/day x 5 days) on IGF-I and IGF-II mRNA expression pre and post-exercise in biopsies from vastus lateralis throughout RT-PCR, and found that in Cr group IGF-I and IGF-II mRNA expression at rest was increased by 30% and 46% than placebo, respectively. However, the mRNA expression measured after exercise was similar for the Cr and the placebo conditions. Burke *et al.* (65) reported a significant increase in intramuscular IGF-I concentration in Cr supplemented athletes (0.25 g Cr/kg mass dry x 7 days followed of 0.06 g Cr/kg mass dry x 49 days) following an 8 weeks-program of resistance training. In agreement with this, Snow *et al.* (66) determined the effects of Cr supplementation (0.8 g/kg body mass) and moderate intensity resistance training on the phosphorylation state of some proteins involved in the Akt/PKB pathway, finding that the phosphorylation state of Akt/PKB and GSK3 β increased significantly in Cr supplemented group at 1 and 5 days. Safdar *et al.* (67) reported an increment in mRNA (2.1 fold) and protein (4.2 fold) content of Akt/PKB after Cr supplementation (20 g/day x 3 days followed of 5 g/day x 7 days) without changes in placebo group. Furthermore, Cr administration reduces the leucine oxidation rate and flux ratio mitigating the protein catabolism in men (68) and at the same time generates a greater bioavailability of arginine and L-homoarginine in the body (69), which correlates with NO production during exercise. Although there is not enough scientific support in humans, some authors claim that Cr supplementation and its inherent increased PCr/Cr ratio could inactivate the AMP-activated protein kinase (AMPK) since it was shown *in vitro* that high PCr concentrations reduce AMPK activity to 50% which means this kinase is sensitive not only to ATP/AMP but also to PCr/Cr ratio (70).

In this way, the increasing lean body mass after Cr supplementation can be related to the stimulation of signaling pathways as IGF-I, mainly PI3K/Akt-PKB/mTOR which plays an important role in the regulation of muscular hypertrophy, and the probable leucine and AMPK regulation on mTOR. Stepping aside the direct effect of Akt/PKB on mTOR regulation, a novel mechanism mediating the effect of GSK3 β on muscle growth has been described recently. GSK3 β is able to phosphorylate nebulin

localized to the Z-disk, thus preventing the interaction of nebulin with neuronal Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP), which is involved in actin assembly (62). Therefore, IGF-I/Akt-PKB signaling controls myofibril growth and maintenance via the GSK3 β /nebulin/N-WASP pathway. This phenomenon could explain the findings of some researchers years ago. Dangott *et al.* (71) and Olsen *et al.* (72) showed that Cr supplementation increase the satellite cell population and its mitotic activity, while O'Connor *et al.* (59) showed that Cr stimulates the myoblast fusion *in vitro* and *in vivo* possibly mediated by actin polymerization.

In general, most of the investigations on Cr supplementation have reported an increase in the intracellular volume without notorious changes in extracellular volume (67, 73, 74, 75, 76), probably because of the high osmotic charge associated to the increase in Cr and Na⁺ in cytosol. In fact, cell swelling has been marked as an anabolic signal (77), which in turn can stimulate the activation of osmosensing molecules as G protein coupled receptors in the MAPK pathway and sphingosine kinase (SPHK1), creating a positive feedback motif. This osmotic effect of Cr supplementation on SHPK1 and the MAPKs p38 and ERK6 was confirmed by Safdar *et al.* (67) as well as other studies have shown a p38 overexpression after *in vitro* (58) and *in vivo* (79) Cr administration. Activation of MAPKs is crucial for muscle adaptations and development after exercise (80). For example, JNK/SAPK is involved in the transcription process of CK via p53 whereas p38 plays an important role in the up-regulation of Myogenic Regulatory Factors (MRFs) and myostatin down-regulation (81). MRFs are transcription factors involved in the differentiation and maintenance processes of muscle cells with multiple regulation points throughout the myogenic lineage (these include the proteins MyoD, Myogenin, Myf5, and MRF4/Myf6/Herculin), regulating the expression of important proteins such as CK and Myosin Heavy Chain (82). Particularly, Cr supplementation has safe (84) and conserved effects on increasing MRFs expression (mRNA and protein) even with different administration protocols in humans (55, 83, 85, 86).

In particular, Cr supplementation during an exercise training program can increase the muscle mass and strength (87) by means of positive regulation processes, which include the higher IGF-I and IGF-II expression and following turning on of the well-established Akt/GSK3 β /mTOR signaling pathway and the SHPK1/MAPK/MRF pathway and its downstream components activation by means of the creatine-induced cell swelling (all features pictured in Figure 3).

Conclusion

In summary the ergogenic effects of Cr supplementation are absolutely dependent upon Cr accumulation in myocyte and the subsequent optimization of the Cr/PCr/CK system which serves as a spatial/temporal buffer of ATP regeneration in proximity to myocellular ATPases. In addition, this improvement in energy homeostasis leads to positive regulation of anabolic hubs (such as IGF-I and MAPK), which stimulate synergically the faster muscle growth and strength gain.

References

1. Williams, M.; Kreider, R.; Branch, J. *Creatine: The power supplement*. Human Kinetics: Leeds, UK, 1999; pp 6-7.
2. Pischel, I.; Gastner, T. Creatine – its chemical synthesis, chemistry and legal status. *Subcell. Biochem.* **2007**, *46*, 275-289. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6486-9_15.
3. Brosnan, M.; Brosnan, J. Creatine: Endogenous metabolite, dietary and therapeutic supplement. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 241-261. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093621>.

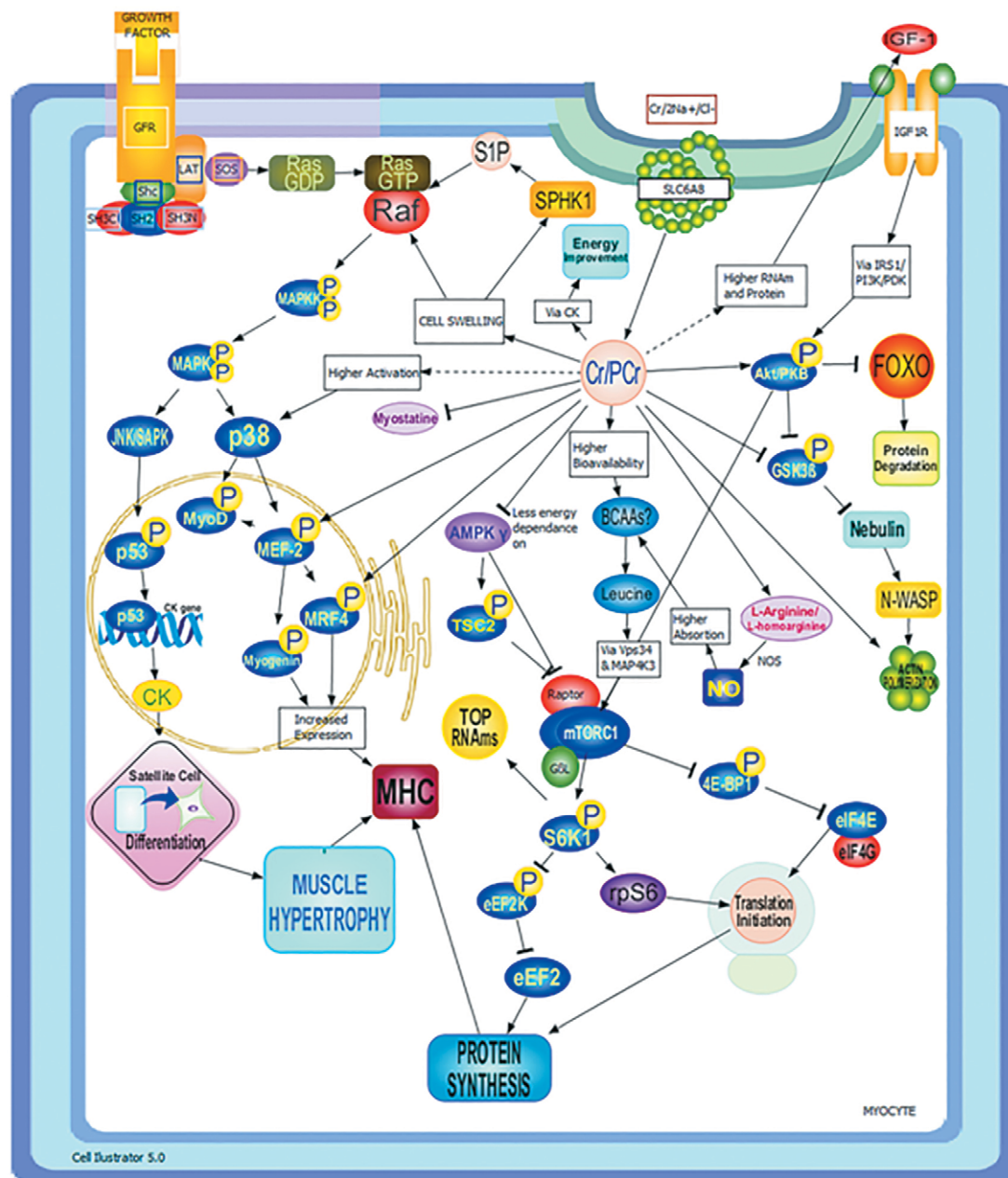


Figure 3. Signaling events during Cr/PCr accumulation in muscle. After supplementation, Cr enters to the myocyte through the CreaT/SLC6A8 favoring the muscular PCr/Cr ratio. During resistance training the augmented PCr/Cr ratio, besides preventing energy failure of ATP, increases the expression of IGF-I which activates Akt/PKB to possibly inhibit AMPK allowing indirect and direct activation of mTOR. Additionally, Cr effects on some amino acids homeostasis, especially leucine, regulate equally mTOR via Vps34 y MAP4K3. On the left side the Ras/MAPK pathway is represented. This activation can be mediated through growth factor binding or cell swelling via SHPK1, both stimulated after Cr supplementation. Subsequent MRFs activation allows optimizing the remodeling and recovery processes of myocyte a posteriori to exercise training. Software; Cell Illustrator 5.0.

- Stout, J.; Antonio, J.; Kalman, D. *Essentials of creatine in sports and health*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2008; pp 30-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-573-2>.
- da Silva, R.; Nissim, I.; Brosnan, M.; Brosnan, J. Creatine synthesis: Hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, 296, 256-261. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90547.2008>.
- Uzzan, M.; Nechrebeki, J.; Zhou, P.; Labuza, T. Effect of water activity and temperature on the stability of creatine during storage. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, 35(8), 1003-1008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03639040902755197>.
- Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* **2000**, 80, 1107-1213.
- Wallimann, T.; Tokarska-Schlattner, M.; Schlattner, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. **2011**, 40, 1271-1296. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3>.
- Snow, R.; Murphy, R. Creatine and the creatine transporter: A Review. *Mol. Cell. Biochem.* **2001**, 224, 169-181.
- Peral, M.; García-Delgado, M.; Calonge, M.; Durán, J.; De La Horra, M.; Wallimann, T.; Speer, O.; Ilundáin, A. Human, rat and chicken small intestinal Na⁺-Cl⁻ creatine transporter: Functional, molecular characterization and localization. *J. Physiol.* **2002**, 545(1), 133-144.

11. Christie D. Functional insights into the creatine transporter. *Subcell. Biochem.* **2007**, 46, 99-118. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6486-9_6.
12. Speer, O.; Neukomm, L.; Murphy, R.; Zanolli, E.; Schlattner, U.; Henry, H.; Snow, R.; Wallimann, T. Creatine transporters: A reappraisal. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 256, 407-424. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/B:MCBL.0000009886.98508.e7>.
13. Wallimann, T.; Hemmer, W. III-2 creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, 133/134, 193-220. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01267955>.
14. Bessman, S.; Carpenter, C. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 831-862. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.004151>.
15. Sweeney H. The importance of the creatine kinase reaction: the concept of metabolic capacitance. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1994**, 26(1), 30-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1249/00005768-199401000-00007>.
16. Zuniga, J.; Housh, T.; Camic, C.; Hendrix, R.; Mielke, M.; Johnson, G.; Housh, D.; Schmidt, R. The effects of creatine monohydrate loading on anaerobic performance and one-repetition maximum strength. *J. Strength and Cond. Research.* **2012**, 26(6), 1651-1656.
17. Dobginski, V.; Santos, M.; Campbell, B.; Kreider, R. Short-term creatine supplementation suppresses the cortisol response to a high-intensity swim-sprint workout. *J. Nutr. Health Sci.* **2014**, 1(204), 8-10.
18. Devries, M.; Phillips, S. Creatine supplementation during resistance training in older adults- a meta-analysis. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2014**, 46(6), 1194-1203.
19. Antonio, J.; Ciccone, V. The effects of pre versus post workout supplementation of creatine monohydrate on body composition and strength. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2013**, 10(36), 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1550-2783-10-36>.
20. Veggi, K.; Machado, M.; Koch, A.; Santana, S.; Oliveira, S.; Stec, M. Oral creatine supplementation augments the repeated bout effect. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* **2013**, 23, 378-387.
21. Kreider, R.; Wilborn, C.; Taylor, L.; Campbell, B.; Almada, A.; Collins, R.; Cooke, M.; Earnest, C.; Greenwood, M.; Kalman, D.; Kerk-sick, C.; Kleiner, S.; Leutholtz, B.; Lopez, H.; Lowery, L.; Mendel, R.; Smith, A.; Spano, M.; Wildman, R.; Willoughby, D.; Ziegenfuss, T.; Antonio, J. ISSN Exercise & sport nutrition review: Research & recommendations. *J. Inter. Soc. Sports Nutr.* **2010**, 7(7), 1-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1550-2783-7-7>.
22. Wallimann, T. Mehr energie: mehr leistung – kreatin: Warum, wann und für wen? *Schw. Zeitschrift für Ernährungsmedizin.* **2008**, 5, 29-40.
23. Stec, M.; Rawson, E. Benefits of creatine supplementation for older adults. *Braz. J. Biomotricity.* **2010**, 4(4), 215-226.
24. Kreider, R.; Jung, Y. Creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* **2011**, 15 (2), 53-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.5717/jenb.2011.15.2.53>.
25. Aguiar, A.; Januário, R.; Junior, R.; Gerage, A.; Pina, F.; do Nascimento, M.; Padovani, C.; Cyrino, E. Long-term creatine supplementation improves muscular performance during resistance training in older women. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2013**, 113, 987-996. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-012-2514-6>.
26. Kim, H.; Kim, C.; Carpentier, A.; Poortmans, J. Studies on the safety of creatine supplementation. *Amino Acids.* **2011**, 40(5), 1409-1418. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-0878-2>.
27. Carrillo, P.; Gilli, M. Los efectos que produce la creatina en la performance deportiva. *Invenio.* **2011**, 14(26), 101-115.
28. Cooper, R.; Nacheiro, F.; Allgrove, J.; Jimenez, A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2012**, 9(33), 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1550-2783-9-33>.
29. Brosnan, M.; Edison, E.; da Silva, R.; Brosnan, J. New Insights into creatine function and synthesis. *Advan. Enzyme Regul.* **2007**, 47, 252-260. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.12.005>.
30. Mesa, J.; Ruiz, J.; González-Gross, M.; Gutiérrez, A.; Castillo, M. Oral creatine supplementation and skeletal muscle metabolism in physical exercise. *Sports Med.* **2002**, 32(14), 903-944. DOI: <http://dx.doi.org/10.2165/00007256-200232140-00003>.
31. Persky, A.; Brazeau, G. Clinical Pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 161-176.
32. del Favero, S.; Roschel, H.; Artioli, G.; Ugrinowitsch, C.; Tricoli, V.; Costa, A.; Barroso, R.; Negreli, A.; Otaduy, M.; da Costa, C.; Lancha-Junior, A.; Gualano, B. Creatine but not betaine supplementation increases phosphorylcreatine content and strength performance. *Amino Acids.* **2012**, 42, 2299-2305. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-0972-5>.
33. Brault, J.; Towse, T.; Slade, J.; Meyer, R. Parallel increases in phosphocreatine and total creatine in human vastus lateralis muscle during creatine supplementation. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* **2007**, 17(6), 624-634.
34. Meyer R. Linear dependence of muscle phosphocreatine kinetics on total creatine content. *Am. J. Physiol.* **1989**, 257, 1149-1157.
35. Jones, A.; Wilkerson, D.; Fulford, J. Influence of dietary creatine supplementation on muscle phosphocreatine kinetics during knee-extensor exercise in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2009**, 296, 1078-1087. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajp-regu.90896.2008>.
36. Kemp G. Interpreting the Phosphocreatine time constant in aerobically exercising skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **2009**, 106(1), 350 (author replay 351). DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.91297.2008>.
37. Allen, D.; Clugston, E.; Petersen, Y.; Röder, I.; Chapman, B.; Rudolf, R. Interactions between intracellular calcium and phosphate in intact mouse muscle during fatigue. *J. Appl. Physiol.* **2011**, 111(2), 358-366. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01404.2010>.
38. Davies, R.; Eston, R.; Fulford, J.; Rowlands, A.; Jones, A. Muscle damage alters the metabolic response to dynamic exercise in humans: A ³¹P-MRS study. *J. Appl. Physiol.* **2011**, 111(3), 782-790. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01021.2010>.
39. Rico-Sanz, J. Creatine reduces human muscle PCr and pH decrements and Pi accumulation during low-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* **2000**, 88, 1181-1191.
40. Santos, M.; López, P.; González, J.; Moreno, A.; Alonso, J.; Cabañas, M.; Pons, V.; Porta, J.; Arús, C. Efecto de la suplementación oral con monohidrato de creatina en el metabolismo energético muscular y en la composición corporal de sujetos que practican actividad física. *Rev. Chil. Nutr.* **2003**, 30(1), 58-63. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182003000100008>.
41. Yquel, R.; Arsac, L.; Thiaudiere, E.; Canioni, P.; Manier, G. Effect of creatine supplementation on phosphocreatine resynthesis, inorganic phosphate accumulation and pH during intermittent maximal Exercise. *J. Sports Sci.* **2002**, 20, 427-437. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/026404102317366681>.
42. Greenhaff, P.; Casey, A.; Short, A.; Harris, R.; Soderlund, K.; Hultman, E. Influence of oral creatine supplementation on muscle torque during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. *Clin. Sci.* **1993**, 84, 565-571. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/cs0840565>.
43. McConell, G.; Shinewell, J.; Stephens, T.; Stathis, C.; Canny, B.; Snow, R. Creatine supplementation reduces muscle inosine monophosphate during endurance exercise in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2005**, 37, 2054-2061. DOI: <http://dx.doi.org/10.1249/01.mss.0000179096.03129.a4>.
44. Li, J.; Wang, X.; Fraser, S.; Carey, M.; Wrigley, T.; McKenna, M. Effects of fatigue and training on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **2002**, 92, 912-922. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00643.2000>.
45. Scarpa, A.; Carafoli, E.; Papa, S. *Ion motive ATPases: Structure, function and regulation*. First Edition, New York Academy of Sciences:

- New York, 1992; pp 671.
46. Kindig, C.; Howlett, R.; Stary, C.; Walsh, B.; Hogan, M. Effects of acute creatine kinase inhibition on metabolism and tension development in isolated single myocytes. *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 541-549. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00354.2004>.
 47. Pulido, S.; Passaquin, A.; Leijendekker, W.; Challet, C.; Wallimann, T.; Ruëegg, U. Creatine supplementation improves intracellular Ca^{2+} handling and survival in mdx skeletal muscle cells. *FEBS Letters.* **1998**, *439*, 357-362. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01399-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01399-4).
 48. Gallo, M.; MacLean, I.; Tyreman, N.; Martins, K.; Syrotuik, D.; Gordon, T.; Putman, C. Adaptive responses to creatine loading and exercise in fast-twitch rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *294*, 1319-1328. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00631.2007>.
 49. Calderón-Rivera, A.; Vega, A.; Ávila, G. Creatine supplementation upregulates excitation-contraction coupling in C2C12 Myotubes. *J. Receptor Ligand Channel Res.* **2010**, *3*, 63-71.
 50. Yang, Y.; Fann, M.; Chang, W.; Tai, L.; Jiang, J.; Kao, L. Regulation of sodium-calcium exchanger activity by creatine kinase under energy-compromised conditions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(36), 28275-28285. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.141424>.
 51. Louis, M.; Poortmans, J.; Francaux, M.; Berre, J.; Boisseau, N.; Brassine, E.; Cuthbertson, D.; Smith, K.; Babraj, J.; Waddell, T.; Rennie, M. No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2003**, *285*, 1089-1094. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00195.2003>.
 52. Moon, A.; Heywood, L.; Rutherford, S.; Cobbold, C. Creatine supplementation in the elderly: is resistance training really needed?. *J. Nutr. Health Sci.* **2015**, *2*(1), 103.
 53. Volek, J.; Duncan, N.; Mazzetti, S.; Staron, R.; Putukian, M.; Gómez, A.; Pearson, D.; Fink, W.; Kraemer, W. Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1999**, *31*, 1147-1156. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00005768-199908000-00011>.
 54. Forbes, S.; Waltz, X.; Candow, D. Creatine timing on muscle mass and strength: appetizer or dessert?. *Agro. Food Ind. Hi. Tech.* **2014**, *25*(4), 19-21.
 55. Willoughby, D.; Rosene, J. Effects of Oral Creatine and Resistance Training on Myosin Heavy Chain Expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2001**, *33*(10), 1674-1681. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00005768-200110000-00010>.
 56. Gualano, B.; Macedo, A.; Rodrigues, C.; Roschel, H.; Takayama, L.; de Sá, A.; Rodrigues, F.; Rodrigues, R. Creatine supplementation and resistance training in vulnerable older women: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Exp. Gerontol.* **2014**, *53*, 7-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.02.003>.
 57. Saremi, A.; Gharakhanloo, R.; Sharghi, S.; Gharaati, M.; Larijani, B.; Omidfar, K. Effects of Oral Creatine and Resistance Training on Serum Myostatin and GASP-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *317*, 25-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.019>.
 58. Deldicque, L.; Theisen, D.; Bertrand, L.; Hespel, P.; Hue, L.; Francaux, M. Creatine Enhances Differentiation of Myogenic C2C12 Cells by Activating both p38 and Akt/PKB Pathways. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2007**, *293*, 1263-1271. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00162.2007>.
 59. O'Connor, R.; Steeds, C.; Wiseman, R.; Pavlath, G. Phosphocreatine as an Energy Source for Actin Cytoskeletal Rearrangements during Myoblast Fusion. *J. Physiol.* **2008**, *586*(12), 2841-2853. DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.151027>.
 60. Ohira, Y.; Matsuoka, Y.; Kawano, F.; Ogura, A.; Higo, Y.; Ohira, T.; Terada, M.; Oke, Y.; Nakai, N. Effects of Creatine and Its Analog, β -Guanidinopropionic Acid, on the Differentiation of and Nucleoli in Myoblasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*(6), 1085-1089. DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100901>.
 61. Drummond, M.; Dreyer, H.; Fry, C.; Glynn, E.; Rasmussen, B. Nutritional and Contractile Regulation of Human Skeletal Muscle Protein Synthesis and mTORC1 Signaling. *J. Appl. Physiol.* **2009**, *106*(4), 1374-1384. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.91397.2008>.
 62. Schiaffino, S.; Mammucari, C. Regulation of skeletal muscle growth by the igf1-akt/pkb pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle.* **2011**, *1*(4): 1-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>.
 63. Deldicque, L.; Louis, M.; Theisen, D.; Nielsens, H.; Dehoux, M.; Thisen, J.; Rennie, M.; Francaux, M. Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2005**, *37*(5), 731-736. DOI: <http://dx.doi.org/10.1249/01.MSS.0000162690.39830.27>.
 64. Mackenzie, M.; Hamilton, D.; Murray, J.; Taylor, P.; Baar, K. mVps34 is Activated following high-resistance contractions. *J. Physiol.* **2009**, *587*(1), 253-260. DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159830>.
 65. Burke, D.; Candow, D.; Chilibeck, P.; MacNeil, L.; Roy, B.; Tarnopolsky, M.; Ziegenfuss, T. Effect of creatine supplementation and resistance-exercise training on muscle insulin-like growth factor in young adults. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2008**, *18*, 389-398.
 66. Snow, R.; Wright, C.; Quick, M.; Garnham, A.; Watt, K.; Russell, A. The effects of acute exercise and creatine supplementation on akt signalling in human skeletal muscle. *Proc. Aust. Physiol. Society.* **2008**, *39*, 92P.
 67. Safdar, A.; Yardley, N.; Snow, R.; Melov, S.; Tarnopolsky, M. Global and targeted gene expression and protein content in skeletal muscle of young men following short-term creatine monohydrate supplementation. *Physiol. Genomics.* **2008**, *32*, 219-228. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00157.2007>.
 68. Parise, G.; Mihic, S.; MacLennan, D.; Yarasheski, K.; Tarnopolsky, M. Effects of acute creatine monohydrate supplementation on leucine kinetics and mixed-muscle protein synthesis. *J. Appl. Physiol.* **2001**, *91*, 1041-1047.
 69. Paddon-Jones, D.; Børsheim, E.; Wolfe, R. Potential ergogenic effects of arginine and creatine supplementation. *J. Nutr.* **2004**, *134*: 2888S-2894S.
 70. Ponticos, M.; Lu, Q.; Morgan, J.; Hardie, D.; Partridge, T.; Carling, D. Dual regulation of the amp-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.* **1998**, *17*(6), 1688-1699. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.6.1688>.
 71. Dangott, B.; Schultz, E.; Mozdziaik, P. Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy. *Int. J. Sports Med.* **2000**, *21*, 13-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2000-8848>.
 72. Olsen, S.; Aagaard, P.; Kadi, F.; Tufekovic, G.; Verney, J.; Olesen, J.; Suetta, C.; Kjær, M. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J. Physiol.* **2006**, *573*, 525-534. DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2006.107359>.
 73. Ziegenfuss, T.; Lemon, P.; Rogers, M.; Ross, R.; Yarasheski, K. Acute creatine ingestion: Effects on muscle volume, anaerobic power, fluid volumes, and protein turnover. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **2000**, *29*(5), S127. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00005768-199705001-00731>.
 74. Arazi, H.; Rahmaninia, F.; Hosseini, K.; Asadi, A. Effects of short term creatine supplementation and resistance exercises on resting hormonal and cardiovascular responses. *Sci. Sports.* **2015**, *30*(2), 105-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scispo.2014.03.006>.
 75. Kilduff, L.; Georgiades, E.; James, N. The Effects of creatine supplementation on cardiovascular, metabolic and thermoregulatory re-

- sponses during exercise in the heat in endurance-trained humans. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2004**, *14*, 443-460.
76. Lopez, R.; Casa, D.; McDermott, B.; Ganio, M.; Armstrong, L.; Maresh, C. Does creatine supplementation hinder exercise heat tolerance or hydration status? a systematic review with meta-analyses. *J. Athl. Train.* **2009**, *44*(2), 215-223. DOI: <http://dx.doi.org/10.4085/1062-6050-44.2.215>.
 77. Haussinger, D.; Roth, E.; Lang, F.; Gerok, W. Cellular hydration state: An important determinant of protein catabolism in health and disease. *Lancet.* **1993**, *341*, 1330-1332.
 78. Murray, R.; Granner, D.; Mayes, P.; Rodwell, V. *Harper's illustrated biochemistry*. 26th Edition. McGraw-Hill Medical: Toronto, 2003; pp 150. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90828-5](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)90828-5).
 79. Deldicque, L.; Atherton, P.; Patel, R.; Theisen, D.; Nielens, H.; Renne, M.; Francaux, M. Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **2008**, *104*, 371-378. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00873.2007>.
 80. Akimoto, T.; Pohnert, S.; Li, P.; Zhang, M.; Gumbs, C.; Rosenberg, P.; Williams, R.; Yan, Z. Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(20), 19587-19593. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M408862200>.
 81. Al-Khalili, L.; Krämer, D.; Wretenberg, P.; Krook, A. Human skeletal muscle cell differentiation is associated with changes in myogenic markers and enhanced insulin-mediated MAPK and PKB phosphorylation. *Acta. Physiol. Scand.* **2004**, *180*, 395-403. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01259.x>.
 82. Perry, R.; Rudnicki, M. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front. Biosci.* **2000**, *5*, 750-767. DOI: <http://dx.doi.org/10.2741/Perry>.
 83. Hespel, P.; Op't Eijnde, B.; Leemputte, M.; Ursø, B.; Greenhaff, P.; Labarque, V.; Dymarkowski, S.; Hecke, P.; Richter, E. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J. Physiol.* **2001**, *536*(2), 625-633. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0625c.xd>.
 84. Lugaesi, R.; Leme, M.; Painelli, V.; Murai, I.; Roschel, H.; Sapienza, M.; Lancha-Junior, A.; Gualano, B. Does long-term creatine supplementation impair kidney function in resistance-trained individuals consuming a high-protein diet?. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2013**, *10*(26), 1-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1550-2783-10-26>.
 85. Willoughby, D.; Rosene, J. Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2003**, *35*(6), 923-929. DOI: <http://dx.doi.org/10.1249/01.MSS.0000069746.05241.F0>.
 86. Candow, D.; Zello, G.; Ling, B.; Farthing, J.; Chilibeck, P.; McLeod, K.; Harris, J.; Johnson, S. Comparison of creatine supplementation before versus after supervised resistance training in healthy older adults. *Res. Sports Med.* **2014**, *22*(1), 61-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15438627.2013.852088>.
 87. de Salles, P.; Alves, V.; Ugrinowitsch, C.; Benatti, F.; Artioli, G.; Lancha-Junior, A.; Gualano, B.; Roschel, H. Creatine supplementation prevents acute strength loss induced by concurrent exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2014**, *114*(8), 1749-1755. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-014-2903-0>.

Article citation:

Bonilla, D. A.; Moreno, Y. Molecular and metabolic insights of creatine supplementation on resistance training. *Rev. Colomb. Quim.* **2015**, *44*(1), 11-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.53978>

Recibido: 9 de Marzo de 2015. Aceptado: 31 de Marzo de 2015

Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)

Resumen

En este estudio se realizó la validación de los métodos establecidos por la UNODC para la cuantificación y extracción de benzoilmetilecgonina (cocaína) presente en las hojas de *Erythroxylum coca*, en té de coca y en clorhidrato de cocaína. El primer método de extracción, recomendado por la UNODC, es una extracción sólido-líquido (ESL), sin embargo, los resultados obtenidos indican que esta no es lo suficientemente eficiente para lograr una señal de analito distinguible de la relación señal a ruido (S/N) para las muestras de hojas de *Erythroxylum coca* y té de coca. El segundo método propuesto es la extracción soxhlet, los resultados indican que esta resulta más eficiente para aislar y cuantificar el analito de interés por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización por llama (CG-FID). Después de someter las muestras al proceso de extracción soxhlet y cuantificación por CG-FID se encontró que la hoja de té posee $7,66 \times 10^2$ mg de cocaína/kg de muestra, las hojas de coca 17,15 mg de cocaína/kg de muestra y el clorhidrato de cocaína $7,15 \times 10^5$ mg de cocaína/kg de muestra. El método de análisis escogido se caracteriza por arrojar bajos límites de detección (0,169 mg/L) y por poseer parámetros estadísticos y cromatográficos ideales.

Palabras claves: *Erythroxylum coca*, cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG/FID), benzoilmetilecgonina (cocaína), extracción soxhlet.

Analysis of cocaine in different samples by gas chromatography flame ionization detector (GC-FID)

Abstract

In this study validate the methods established by the UNODC for quantification and extraction benzoilmetilecgonina (cocaine) in the leaves of *Erythroxylum coca*, coca tea and cocaine hydrochloride. The first extraction method recommended by the UNODC is a solid-liquid extraction (ESL), however, the results indicate that this is not efficient enough to achieve analyte signal distinguishable from the signal to noise ratio (S/N) for samples *Erythroxylum coca* leaves and coca tea. The second proposed method is soxhlet extraction, the results indicate that this is more efficient to isolate and quantify the analyte of interest by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). After submitting the samples to the soxhlet extraction process and quantification by GC-FID it found that tea leaf has 7.66×10^2 mg of cocaine/kg sample, coca leaves 17.15 mg of cocaine/kg sample and cocaine hydrochloride concentration corresponded to 7.15×10^5 mg of cocaine/kg sample. The chosen analysis method is characterized by low detection limits shed (1.69 mg/L) and possessing ideal chromatographic and statistical parameters.

Keywords: *Erythroxylum coca*, gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID), benzoilmetilecgonina (cocaine), soxhlet extraction.

Análise de cocaína em diferentes amostras por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID)

Resumo

Neste estudo validaram-se os métodos estabelecidos pelo UNODC para a quantificação e extração de benzoilmetilecgonina (cocaína) nas folhas de *Erythroxylum coca*; em chá de coca e cloridrato de cocaína. O primeiro método de extração recomendado por UNODC é uma extração sólido-líquido (ESL), no entanto, os resultados indicam que esta não é suficientemente eficaz para atingir um sinal de analito distinguível da relação sinal-ruído (S/N) para amostras de folhas *Erythroxylum coca* e chá de coca. O segundo método proposto é uma extração soxhlet, os resultados indicam que este é mais eficiente para isolar e quantificar o analito de interesse por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID). Depois de enviar as amostras para o processo de extração soxhlet e quantificação por GC-FID descobriu-se que as folhas de chá têm $7,66 \times 10^2$ mg de cocaína/kg de amostra, as folhas de coca 17,15 mg de cocaína/kg de amostra e o cloridrato de cocaína $7,15 \times 10^5$ mg de cocaína/kg de amostra. O método de análise escolhido é caracterizado por ter baixos limites de detecção (1,69 mg/L) e possuir parâmetros estatísticos e cromatográficos ideais.

Palabras clave: *Erythroxylum coca*, cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC / FID), benzoilmetilecgonina (cocaína), extração soxhlet.

Introducción

La *Erythroxylum coca* ha sido utilizada desde tiempos antiguos en donde los nativos las mascaban como parte de sus rituales. Sin embargo, no fue hasta 1859 cuando el químico Alemán Albert Niemann realizó la extracción de benzoilmetilecgonina (cocaína) a partir de las hojas de *Erythroxylum coca*. Esta se empezó a utilizar como medicamento en 1880, pero su uso se prohibió en 1922 tras observar sus efectos estimulantes y adictogénicos sobre el sistema nervioso (1). Su uso prolongado representa un alto riesgo debido al bloqueo en los receptores de dopamina (2,3), creando una adicción y estimulación en el sistema nervioso central.

En este estudio se desarrolló una metodología de análisis (4) de benzoilmetilecgonina (cocaína) en distintas matrices (té de coca, hojas de *Erythroxylum coca* secas y clorhidrato de cocaína), con la finalidad de cuantificar la cantidad de alcaloide presente en cada una de ellas. Este estudio resulta relevante pues la cocaína es extraída en su mayoría de las hojas de *Erythroxylum coca* (5). El proceso de cuantificación requiere de una mayor exigencia y calidad para determinar con precisión y exactitud la cantidad del alcaloide presente por hectárea de coca cultivada en el país.

El sistema integrado de Monitoreo de Cultivos Ilícitos (SIMCI) ha realizado la determinación de benzoilmetilecgonina en *Erythroxylum coca*, usando las imágenes satelitales del Landsat 8 OLI. De esta manera se cuantificó la cantidad aproximada de cocaína por hectárea producida en el país en el período de 2001 a 2013 (5). Además, la UNODC cuantificó la cocaína presente en hojas de coca seca y pulverizada de tres variedades de *Erythroxylum coca* (6). Estos resultados (Tabla 1), expresados como porcentaje en peso, se utilizaron para verificar los resultados de este estudio.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las muestras que se usaron en este trabajo son: clorhidrato de cocaína, hojas de *Erythroxylum coca* y té de coca comercial (Figura 1); las dos

primeras fueron suministradas por la Fiscalía General de la Nación, y la tercera fue conseguida en un mercado local. Se empleó etanol como agente de extracción. (Con un n=3 para cada método de extracción).

Preparación de muestras y extractos

El clorhidrato de cocaína se preparó mediante su disolución en etanol con el estándar interno de tetracosano (C_{24}) a 100 mg/L. Las muestras de hoja de *Erythroxylum coca* y el té de coca se prepararon de acuerdo a los procedimientos descritos por la UNODC (4), este método consiste en un calentamiento de la muestra a 40 °C por 12 h, seguido de un proceso de molienda. Luego se pesan 0,5 g de muestra y se añaden 10 mL de etanol con tetracosano (C_{24}) (100 mg/L).

Además se realizó un análisis de las muestras para mejorar el proceso de extracción de los analitos presentes por extracción sólido líquido tipo soxhlet en un equipo Büchi Extraction System B-811. El procedimiento de lavado cíclico con disolvente mejoró la extracción y se obtuvo una señal del analito por encima del límite de detección. Para el análisis se tomaron 0,1 g de muestra y 60 mL de etanol. La mezcla resultante se sometió a tres ciclos de lavado de aproximadamente 30 minutos; esta metodología permitió aumentar la solubilidad de los analitos en etanol. Posteriormente las soluciones fueron filtradas con una membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno) de 0,45 µm. Finalmente se analizaron las muestras bajo los siguientes rangos de concentración, correspondientes a: clorhidrato de cocaína entre 200 a 800 mg/L; té de coca entre 20 a 100 mg/L y hoja de coca entre 100 a 1000 µg/L.

Análisis cromatográfico

El análisis cuantitativo y cualitativo del analito (cocaína $t_R=13,50 \pm 0,25$ min) se realizó por medio de estándar de cocaína-HCl (Lipomed COC-156-HC), realizando una curva de calibración con estándar interno (n-tetracosano C_{24} $t_R=11,50 \pm 0,25$ min) y una posterior inyección por la técnica de cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID). La solución de partida se trató con florisil para eliminar los pigmentos coloreados y con sulfato de sodio anhidro para

Tabla 1. Cantidad de cocaína presente normalmente en tres variedades de *Erythroxylum coca*

Variedad <i>Erythroxylum coca</i>	Contenido normal de cocaína en la hoja seca
Coca Var. <i>Ipadu</i>	0,11-0,41% p/p
Novo Var. <i>Novogranatense</i>	0,17-0,76% p/p
Novo Var. <i>Truxillense</i>	0,42-1,02% p/p

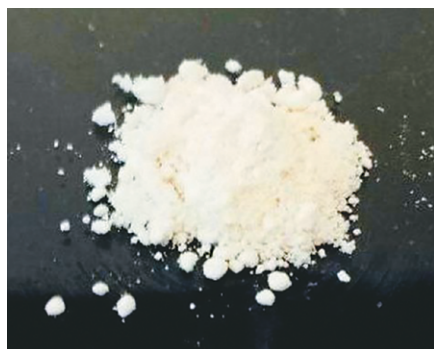


Figura 1. Muestras a analizar.

Izquierda. Clorhidrato de cocaína. Centro. Té de coca. Derecha. Hoja de coca

eliminar el agua. Se inyectó 1 μL de muestra en un equipo Shimadzu referencia QP-2010 plus. Las condiciones fueron las siguientes: se utilizó una columna DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) con He como gas de arrastre y gas auxiliar a un flujo de 1,4 mL/min y 28,6 mL/min respectivamente. La temperatura del inyector fue de 280 °C. El flujo del Split fue de 7,0 mL/min y su relación de 1:5. El flujo de purga del septum de 3,0 mL/min. El detector se utilizó con flujos de 30,0 mL/min de hidrógeno y 300,0 mL/min de aire a una temperatura de 280 °C. Finalmente el programa de temperatura del horno fue de 180 °C (Durante 3 min) seguido de una rampa a 10 °C/min hasta 280 °C (Durante 25 min) con un tiempo de equilibrio de 0,5 min para un tiempo total de corrida de 38 min.

Resultados y discusión

Cuantificación de cocaína en diferentes matrices

Se estudiaron un total de dieciocho muestras entre clorhidrato de cocaína, té de coca y hoja de coca de una sola variedad. La concentración de benzoilmetilecgonina (cocaína) se calculó por medio de interpolación en la curva de calibración con estándar interno a partir de las muestras de clorhidrato de cocaína mostrando valores de $7,15 \times 10^5$ mg de cocaína/kg de muestra (71,47% p/p), en el té de coca se encontró una mayor dispersión en los valores obtenidos, además, dado que el resultado varió en cada una de las réplicas se obtuvo un valor promedio de $7,66 \times 10^2$ mg de cocaína/kg de muestra (0,077% p/p). La cuantificación del analito en la hojas secas representó un desafío en la medida en la que su concentración era inferior a 2,0 mg de cocaína/kg de muestra, de ahí que la

metodología de extracción establecida por UNODC no fue exhaustiva para este análisis. Para la cuantificación de las muestras se generaron tres rectas de calibración correspondientes (Figura 2A-C), las cuales son lineales en el rango de concentración trabajado (Tabla 2).

Validación del método

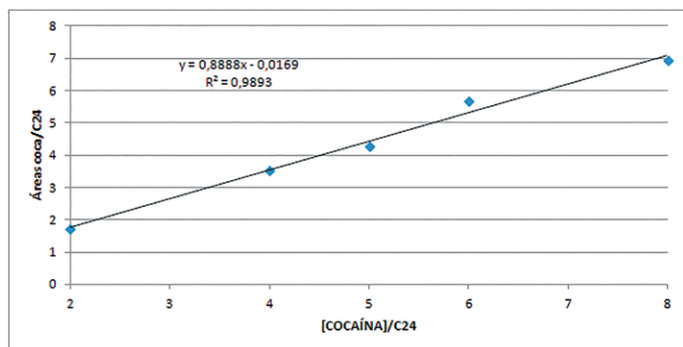
Los parámetros cromatográficos (resolución ($R_s > 1,5$), factor de retención ($k' > 0,5$), factor de separación o selectividad (k o $\alpha > 1,0$) y número de platos teóricos ($N > 60000$) (Tabla 2) y las características analíticas de desempeño (rango de linealidad, coeficiente de regresión (R^2), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión (RSD) y porcentaje de recuperación) indican que el método utilizado tiene capacidades de desempeño suficientes para la cuantificación de cocaína en las diferentes matrices estudiadas (7).

Los parámetros cromatográficos indican que para cada tipo de matriz se cumplen los criterios de aceptación, esto sugiere que la metodología es útil para separar y resolver los analitos presentes en las distintas matrices estudiadas con una buena separación y resolución. Los límites de detección cuantificación son bajos y cumplen con las exigencias del análisis. Además, se evaluó la eficacia del proceso de extracción por medio de la cuantificación de la concentración real de los puntos de la curva de calibración, la desviación estándar relativa (%RDS) y el porcentaje de recuperación (%R) sobre estándares a bajas, medias y altas concentraciones de la curva de calibración (Ecuación [1]). En esta ecuación, X_r es el valor verdadero y $\bar{X}$ el promedio de tres mediciones (Tabla 3).

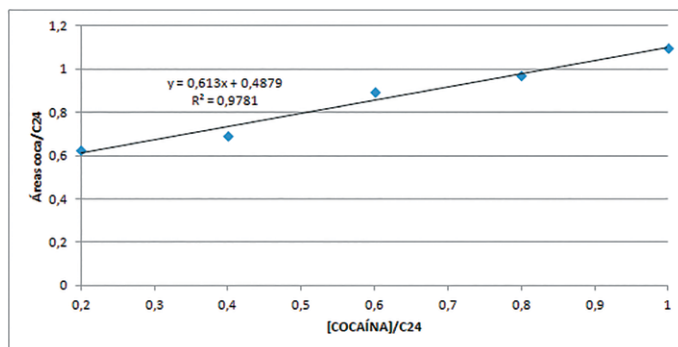
$$\%R = \frac{\bar{X}}{X_r} \times 100 [1]$$

Figura 2. Curvas de calibración correspondientes a las diferentes matrices de estudio para la respectiva cuantificación de cocaína. (C24 : Estándar interno de n-Tetracosano)

A. Clorhidrato de cocaína



B. Té de coca



C. Hoja de coca

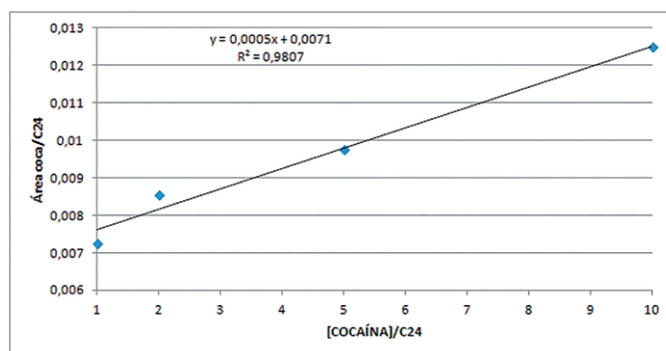


Tabla 2. Parámetros cromatográficos establecidos para la validación del método

Parámetros cromatográficos: [1] R^2 – Resolución, [2] LOD – Límite de detección, [3] LOQ – Límite de cuantificación. [4] R_s – Resolución, [5] y [6] k' – Factor de retención, [7] α – Factor de separación, y [8] N – Número de platos teóricos. *LOD y LOQ en $\mu\text{g/L}$.

Nº	Parámetro	Clorhidrato de cocaína	Té Coca	Hoja Coca
1	R^2	0,99	0,97	0,98
2	LOD (mg/L)	0,97	0,17	1,69*
3	LOQ (mg/L)	3,23	0,57	5,66*
4	R_s	14,43	10,63	12,70
5	k' de C ₂₄	3,78	4,18	3,41
6	k' de Cocaína	3,13	3,54	8,44
7	k o α	1,21	1,18	2,47
8	N	99191	73713	64783

Tabla 3. Parámetros estadísticos establecidos para la exactitud y precisión del método.

Clorhidrato de cocaína				Té de coca			
[ppm]	[Cocaína] _{Real}	% RDS	% R	[ppm]	[Cocaína] _{Real}	% RDS	% R
200	192,49	6,97	96,25	20	22,37	2,638	111,84
400	394,15	2,92	98,54	40	33,25	0,33	83,12
500	479,96	5,53	95,99	60	66,07	1,04	110,11
600	635,79	8,32	105,97	80	78,78	1,87	98,42
800	778,62	5,44	99,63	100	99,63	0,62	97,33

Conclusiones

La metodología de extracción con solvente (método UNODC) no resultó eficiente porque no fue posible discriminar la señal del analito del ruido instrumental. Esto se debe a que el método de extracción es poco exhaustivo y al poco contenido de la benzometilecgonina en las muestras. Como resultado se recomienda utilizar métodos de preparación de muestras como la extracción soxhlet utilizada y métodos miniaturizados asistidos por ultrasonido (8). La metodología de extracción soxhlet aumentó el factor de concentración del analito de interés. Esto permitió su cuantificación en las distintas matrices estudiadas (hoja de coca, 17,15 mg de cocaína/kg de muestra y té de coca $7,66 \times 10^2$ mg de cocaína/kg de muestra). El método de extracción soxhlet cumplió con los criterios cromatográficos y estadísticos que otorgaron una buena confiabilidad, precisión y exactitud; obteniendo intervalos entre 2,9 %RSD a 6,9 %RSD de desviación estándar relativa (%RSD) y un porcentaje de recuperación (%R) entre 95 %R a 98 %R para el estándar utilizado en las rectas de calibración.

Referencias

- Volkow, N. D. Cocaína: abuso y adicción. *NIH publication*. **2010**, 10-4166(S), 1-8.
- Guerri, C. Bioquímica de las adicciones. *SEBBM*. **2012**, 172, 4-7.
- Cruz Martin del Campo, S. L. El cerebro y el consumo de droga. *Cinvestav*. **2006**, Abril-Junio, 36-45.
- Reyes, A. Informe consultoría taller “análisis de muestras de interés forense por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)”. La Paz, Bolivia, 13 al 17 de agosto. **2012**, 40-52. Disponible en: <http://www.comunidadandina.org/DS/Inf.%20GC-MS.pdf> [Consultado el 10 de Enero de 2015].
- SIMCI. Colombia. Monitoreo de cultivos de coca 2013. **2014**, 14-20. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/cropmonitoring/Colombia/Colombia_Monitoreo_de_Cultivos_de_Coca_2013_web.pdf [Consultado el 12 de Diciembre de 2014].
- Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. Nueva York, **2012**, 17-36. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_S.pdf [Consultado 02 de Enero de 2015].
- Centro Nacional de Metrología. Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 2^{da} ed. Los Cués, México. Disponible en: <http://www.metroquimica.com.ar/descargas/Eura-chem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf> [Consultado el 05 de Febrero de 2015].
- Rosero-Moreano, M. H. Desarrollo de métodos miniaturizados de preparación de muestras para el análisis de diversos analitos en matrices ambientales. Tesis de Doctorado, Universidad de Zaragoza, Diciembre 2013.

Article citation:

López, A. M.; Garzón, W. F.; Rosero-Moreano, M.; Taborda, G. Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). *Rev. Colomb. Quim.* **2015**, 44(1), 19-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54010>

Determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano por microextracción en fase sólida- cromatografía de gases en Pereira, Colombia

Resumen

La desinfección del agua con cloro genera subproductos como los trihalometanos (THM's), a los cuales se les atribuyen propiedades cancerígenas y con efecto adverso en el sistema reproductivo. Se estandarizó un método simple, rápido y libre de solventes fue para la determinación de THM's en aguas para consumo humano utilizando microextracción en fase sólida con espacio de cabeza combinada con cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones (HS-SPME-GC- μ ECD). Fueron estudiados y optimizados parámetros experimentales. Las condiciones optimizadas fueron: 20 min de extracción a 37 °C en presencia de 25% de NaCl y con una agitación de 200 rpm; con tiempo de desorción de 4 min a 250 °C. Se determinaron los límites de detección y cuantificación del método y se realizó el análisis de los trihalometanos de 75 muestras de agua de la planta de tratamiento de Aguas y Aguas de la ciudad de Pereira. El rango lineal de 5-100 mg/L fue establecido con una desviación estándar relativa (%RSD) en el rango 6,1-10,1 %. Los límites de detección estuvieron en el rango 3,8-7,8 mg/L. El promedio de la concentración de THM's fue de 55,5 mg/L.

Palabras claves: trihalometanos, microextracción en fase solida con espacio de cabeza, cromatografía de gases, agua de consumo humano, microcaptura de electrones

Determination of trihalomethanes in drinking water by solid phase microextraction-gas chromatography in Pereira, Colombia

Abstract

Water disinfection with chlorine generates byproducts such as trihalomethanes (THM's), to which cancer risk and a potential adverse effect on the reproductive system properties are attributed. The maximum permitted level of THM's in the United States is 80-100 μ g/L, while in Colombia it is 200 μ g/L. In this study a simple, fast and solvent-free method was developed for the determination of THM's in drinking water using solid phase microextraction in combination with head space gas chromatography microcapture electron detector (HS-SPME-GC- μ ECD) and used for quantification of THM's in drinking water. Experimental parameters such as extraction time, extraction temperature, desorption temperature, magnetic stirring, and addition of salt were studied. Limits of detection and quantification were determined and the analysis of THM's in 75 samples of water from the treatment plant of Pereira city were performed. Optimized conditions were 20 min extraction at 37 °C in the presence of 25% NaCl and with stirring at 200 rpm; with a desorption time of 4 min at 250 °C. Linear range of 5-100 μ g/L was established with a relative standard deviation (% RSD) in the range 6.1-10.1%. Detection limits ranged from 3.8 to 7.8 μ g/L. Average concentration of THMs was 55.5 μ g/L which was within International and National requirements.

Keywords: Trihalomethanes, headspace-solid-phase microextraction, gas chromatography, drinking water, electrons microcapture

Determinação de trihalometanos na água para consumo humano por microextração em fase sólida -cromatografia em fase gasosa em Pereira, Colômbia

Resumo

A desinfecção da água com cloro gera subprodutos como trihalometanos (THM's), aos quais são atribuídos o risco de câncer e efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo. Foi estandarizado um método simples, rápido e livre de solventes para a determinação de THM's nas águas para consumo humano usando microextração em fase sólida com espaço de cabeça em combinação de cromatografia gasosa com microcaptura de elétrons (HS-SPME-GC- μ ECD). Foram estudados e otimizados os parâmetros experimentais. As condições otimizadas foram de 20 minutos de extração, a 37 °C na presença de 25% de NaCl, com agitação de 200 rpm e com tempo de desorção de 4 min a 250 °C. Os limites de detecção e quantificação do método foram determinados e foi realizada a análise de trihalometanos em 75 amostras de água da estação de tratamento da cidade de Pereira. A gama linear de 5-100 mg/L foi estabelecida com um desvio-padrão relativo (%RSD) na gama de 6,1-10,1%. Os limites de detecção foram de 3,8 a 7,8, mg/L. A média de concentração de THM's foi de 55,5 mg/L.

Palavras-chave: trihalometanos, microextração em fase sólida com espaço de cabeça, cromatografia em fase gasosa, água potável, microcaptura de elétrons.

Introducción

La desinfección del agua con cloro como técnica estándar de tratamiento ha disminuido en gran cantidad la mortalidad por enfermedades infecciosas y es considerado uno de los mayores avances en la salud pública (1,2). El cloro además de producir una acción desinfectante residual, genera sub-productos de desinfección (DBP's, por sus siglas en inglés) al reaccionar con la materia orgánica natural presente en el agua. Aproximadamente 600 subproductos han sido descubiertos y entre los más investigados se encuentran incluidos los trihalometanos (THM's), los ácidos haloacéticos (HAA's), los haloacetoneitrilos y haloacetonas (3,4). La presencia de THM's en el agua de consumo ha suscitado en los últimos años un creciente interés desde la perspectiva de la salud pública, desde que fueron detectados por primera vez en el agua a comienzos de la década de los setenta, numerosos estudios epidemiológicos han sugerido la existencia de una posible relación entre la exposición a largo plazo a subproductos de la cloración y un mayor riesgo de cáncer y un potencial efecto adverso en el sistema reproductivo (1,5-8).

La preocupación emergente sobre los riesgos para la salud asociados a los THM's y su prevalencia en el agua de consumo ha promovido que muchos países establezcan valores máximos para estos contaminantes. En efecto, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) establece un nivel de 80 µg/L de THM's totales (9), la Unión Europea y el Ministerio de la Protección Social en Colombia una concentración máxima de 200 µg/L (10,11). De la misma forma, la Organización Mundial de la Salud ha establecido concentraciones máximas de referencia para las cuatro especies de THM's más frecuentes, cloroformo (CHCl_3), bromodichlorometano (CHCl_2Br), dibromoclorometano (CHClBr_2) y bromoformo (CHBr_3) en 300, 60, 100 y 100 µg/L respectivamente, y aunque no se ha definido para el total de THM's se recomienda que los valores de estos en el agua de consumo humano se mantengan tan bajos como sea posible, siempre y cuando se asegure una desinfección eficaz (1).

Las concentraciones de THM's en aguas naturales y de consumo humano son del orden de ng/L a µg/L, por esta razón se requiere de procedimientos analíticos muy sensibles. Diferentes métodos para la extracción y preconcentración de las muestras en la determinación de THM's han sido reportados en la literatura, así como la extracción líquido-líquido con n-pentano o n-hexano y técnicas de espacio de cabeza (HS, por sus siglas en inglés), dinámico con purga y trampa y espacio de cabeza con microextracción en fase sólida (HS-SPME, por sus siglas en inglés) (12-17).

La técnica HS-SPME tiene grandes ventajas: la extracción de la muestra y preconcentración es rápida, es simple y proporciona una alta sensibilidad; es libre de disolventes orgánicos y reutilizable; no requiere un alto costo y se ha aplicado con éxito en el análisis de diversos contaminantes como benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos (BTEX), pesticidas organoclorados, hidrocarburos aromáticos poli-insaturados (PHA's), bifenilos policlorados (PCBs) y compuestos orgánicos volátiles en muestras de agua (18-21). Esta técnica se basa en la extracción de analitos a partir de la matriz de la muestra utilizando una fibra capilar de sílice fundida recubierta con un adsorbente, en la mayoría de los casos, un polímero, seguido de desorción térmica de los analitos (16,17). Adicional a las técnicas de preparación y concentración de las muestras, estos compuestos volátiles se separan por cromatografía de gases usando columnas capilares de polaridad media, seguido por detectores de captura de electrones (ECD), microcaptura de electrones (µ-ECD), detector de masas (MSD) o plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICP-MS) (15-17). Sin embargo, todos los trihalometanos incluyen uno o más elementos halogenados en su estructura química, lo cual hace que los detectores ECD o µECD sean lo más apropiados para su identificación y cuantificación, dado que estos presentan mayor selectividad y sensibilidad para compuestos halogenados que los MS y otros detectores.

En este estudio nos propusimos estandarizar un método simple, rápido y libre de solventes para la determinación de THM's en aguas para consumo humano utilizando microextracción en fase sólida con espacio de cabeza combinada con cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones y determinar los niveles de THM's y su variabilidad en aguas de consumo humano en la red de distribución de Pereira-Colombia.

Materiales y métodos

Soluciones estándar

Una solución en metanol de una mezcla de THM's (CHCl_3 , CHCl_2Br , CHClBr_2 y CHBr_3) conteniendo 0,2 mg/mL de cada compuesto (Supelco) fue utilizada como solución estándar. Soluciones acuosas de trabajo fueron preparadas diariamente por dilución del estándar metanólico con agua de alta calidad (ultrapura) obtenida usando un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore) y almacenadas a 4 °C. Las concentraciones finales de los estándares para la curva de calibración estuvieron en el rango de 5 a 100 µg/L para cada analito.

Optimización del método HS-SPME

El método fue estandarizado y optimizado tomando como referencia los métodos desarrollados por Aguirre-Gonzales et al. (15), Bahri et al. (16) y Rosero et al. (17). Se utilizó un soporte SPME con ensamble de la fibra para muestreo manual y fibra de poli(dimetilsiloxano) de 65 µm (PDMS, Supelco). Antes de las mediciones la fibra fue acondicionada de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Previo a la evaluación de los parámetros del método y a la preparación de la curva de calibración se evaluaron las variables agitación (0 y 200 rpm), adición de sal (2,5 y 25%), temperatura de extracción (35 y 37 °C), tiempo de extracción (10, 20 y 30 min) y tiempo de desorción (2, 4 y 6 min) para lo cual se procesó un estándar de 10 µg/L y se evaluó el área bajo la curva para definir el mejor resultado de cada parámetro.

Las soluciones estándar acuosas fueron preparadas por adición de la cantidad apropiada de solución estándar de trabajo. Las extracciones HS-SPME se realizaron adicionando 2 mL de muestra o estándar a un vial de 4 mL con septa PTFE, el cual fue posteriormente inmerso en un baño de agua con temperatura controlada durante el proceso de muestreo. El equilibrio HS-SPME se llevó a cabo con agitación de la muestra por 20 min, tiempo durante el cual los analitos son adsorbidos sobre la fase estacionaria de la fibra. Después de la extracción, la fibra fue térmicamente desorbida por 4 min en el liner del inyector del cromatógrafo de gases a 250 °C. Cada día antes del uso, la fibra SPME fue acondicionada por 5-15 min a 250 °C. La identificación de los cuatro analitos se obtuvo usando el tiempo de retención y la cuantificación se realizó comparando el área de los picos con la respuesta de un curva de calibración obtenida con estándares de la mezcla de THM's desde 5 hasta 100 µg/L (n=5). A partir de las curvas de calibración se determinó la linealidad para cada uno de los compuestos analizados.

Análisis HS-SPME-GC-µECD

Se usó un cromatógrafo Thermo Fisher Scientific Trace GC 1310 equipado con puerto de inyección Split/Splitless con geometría optimizada, un detector de microcaptura de electrones (µECD) de ^{63}Ni , operado por el software Chromeleon v 7.1 para los experimentos de optimización de las condiciones de la microextracción HS-SPME y la obtención de los

parámetros del método. Para la separación de los cuatro compuestos se usó una columna Rtx®-1701 (Crossbond® 14% cyanopropylphenyl / 86% dimethyl polysiloxane, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm df, Resteck) y helio como gas de arrastre a un flujo de 1 mL/min. El inyector del cromatógrafo fue operado en modo Splitless por 1 min, con un flujo Split de 25 mL/min y calentamiento isotérmico a 250 °C. La temperatura del horno fue mantenida a 30 °C por 5 min, y a continuación una rampa a 5 °C/min hasta 90 °C, y finalmente 40 °C/min hasta 220 °C, temperatura que fue mantenida por 3 min adicionales. Para la medición de los analitos el detector µ-ECD fue mantenido a 270 °C usando N₂ como gas make-up a un flujo de 40 mL/min. Con la finalidad de determinar los límites de detección, de cuantificación, la precisión y la exactitud, se usó un estándar de baja concentración (10 µg/L) y fue analizado 10 veces.

Concentración de trihalometanos en el agua de la ciudad de Pereira

Con la finalidad de determinar los niveles de THM's y su variabilidad, 75 muestras fueron tomadas en tres puntos diferentes durante los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre de 2013: 30 muestras a la entrada de la planta de tratamiento, 30 muestras en un punto de distribución de la planta y 15 muestras en un punto de distribución seleccionado a una distancia a conveniencia de la planta y del sistema de

distribución de la empresa Aguas y Aguas de la ciudad de Pereira. Las muestras fueron recolectadas en recipientes ámbar de borosilicato (100 mL) conteniendo 3 mg de tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro libre y detener la formación de subproductos de la cloración. Los recipientes fueron llenados completamente para evitar la evaporación de los compuestos volátiles. Las muestras fueron transportadas y mantenidas a 4 °C y analizadas durante los dos días siguientes a la recolección.

Resultados y discusión

Un método simple, rápido y sensible para la extracción y cuantificación de THM's en el agua potable por microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) combinada con cromatografía de gases capilar – detector de microcaptura de electrones (GC-µECD) fue optimizado, evaluado y aplicado al suministro de agua potable de la ciudad de Pereira. Un total de 75 muestras fueron analizadas en tres puntos diferentes del sistema de distribución para evidenciar la concentración y la variabilidad de trihalometanos. Las Figuras 1A y 1B muestran cromatogramas de un estándar (10 µg/L para cada compuesto) y análisis de los picos de una muestra, respectivamente. En ellas se ilustra que la separación de los compuestos fue completa consiguiendo una buena

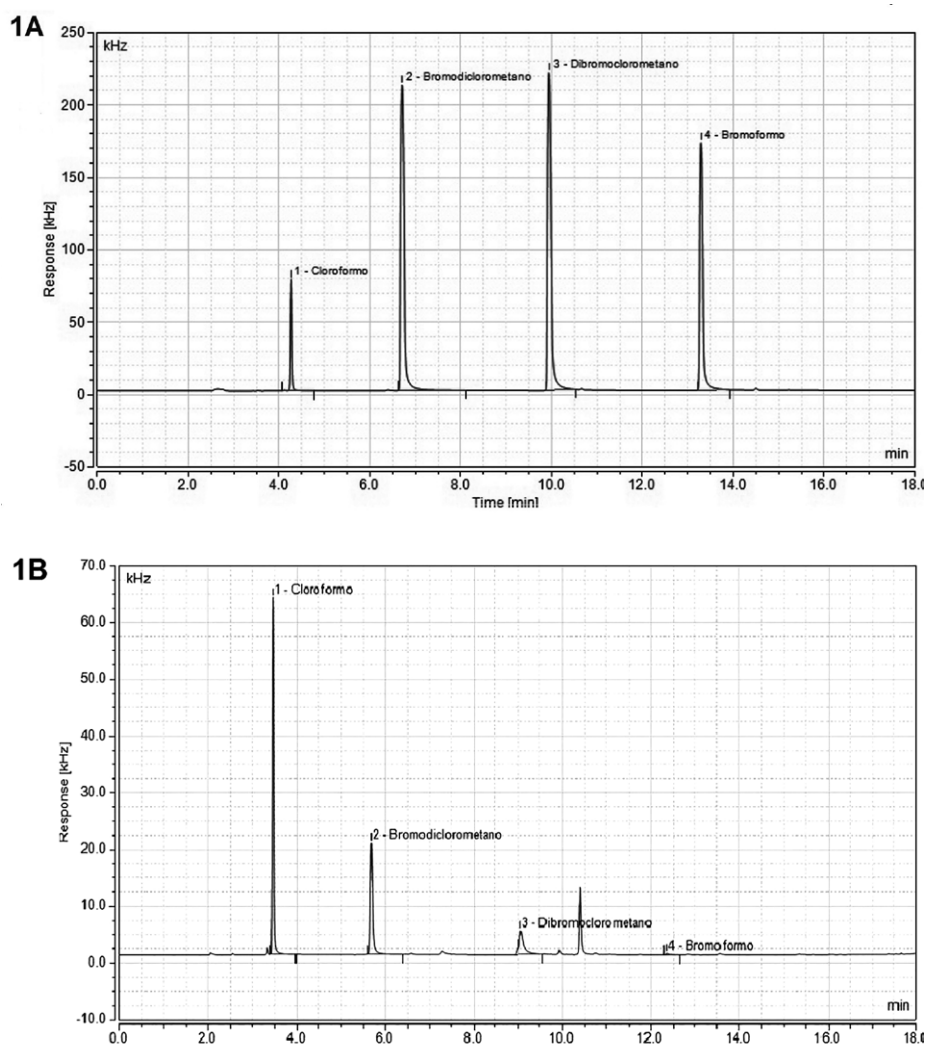


Figura 1. Cromatogramas. 1A) Cromatograma de estándar de 10 µg/L para cada compuesto. 1B) Cromatograma de análisis de picos, para la muestra de la red de distribución (Tanque Consota) Aguas y Aguas de Pereira.

resolución y una alta eficiencia de separación con elusión de todos los picos de interés antes de los 15 min. En efecto, se encontró una resolución de 22,23-24,64; un número de platos teóricos de 35444-186115; un factor de asimetría de 1,11-1,58 con tiempos de retención de 4,3; 6,7; 9,9 y 13,3 min para los picos analizados de los compuestos cloroformo, bromodichlorometano, dibromodichlorometano y bromoformo, respectivamente.

Optimización del método

Efecto de adición de sal

En cuanto al efecto de la adición de sal durante la extracción, se ha reportado que generalmente esto cambia la presión parcial, la solubilidad, la conductividad térmica, la densidad y la tensión superficial de un analito dando como resultado una variación en el equilibrio vapor/líquido (16) y como consecuencia la difusión en el espacio de cabeza se ve favorecida. Al evaluar el efecto de volatilización de los analitos presentes en la muestra provocado por la adición de diferentes concentraciones de NaCl, 2,5% y 25% se observó una mayor respuesta para la concentración

de 25%; resultado que concuerda con lo encontrado por Bahri et al. (16), quienes afirman que la adición de NaCl puede mejorar la eficiencia de extracción para los componentes, puesto que estudiaron el efecto de NaCl a diferentes concentraciones y obtuvieron que la respuesta óptima para dichos componentes es con una adición de NaCl a 25%. En efecto, las áreas de los picos de CHCl_3 , CHCl_2Br , CHClBr_2 y CHBr_3 en estas condiciones fueron: 3,027; 18,877; 20,506 y 13,601; veces mejores que las áreas de los estándares con 2,5% de sal.

Efecto de la agitación

En los ensayos realizados de los patrones a diferentes concentraciones se evaluó el efecto que causa la agitación. Como se observa en la Figura 2, los patrones a los cuales se les realizó el proceso de agitación tienen una mayor transferencia de analitos desde la muestra acuosa hacia la fibra, obteniendo así una mayor respuesta. Este resultado concuerda con lo encontrado por Bahri et al. (16), donde se afirma que la agitación de la muestra acuosa incrementa la eficiencia de extracción, dado que la agitación acelera la transferencia de los componentes desde la muestra acuosa hacia el espacio de cabeza y por lo tanto se ve reflejado significativamente en la respuesta en la lectura de THM's.

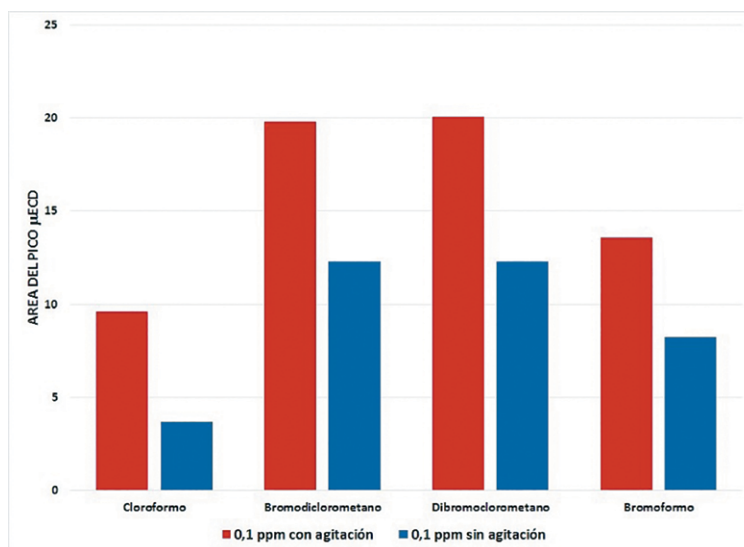


Figura 2. Efecto de la agitación de las muestras. Tiempo de extracción 20 min a 37 °C, desorción de 5 min a 250 °C, concentración: 0,05 mg/L. n=5

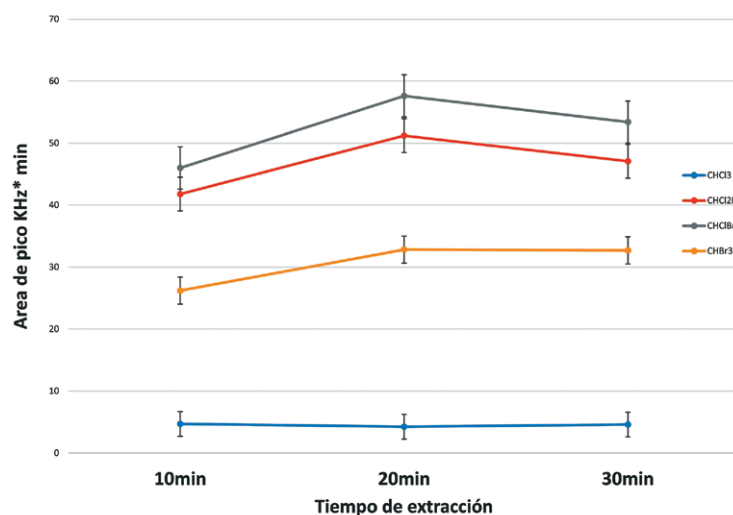


Figura 3. Efecto del tiempo de extracción (10, 20 y 30) min. Temperatura de extracción 37 °C, tiempo de desorción 4 minutos a 250 °C. Concentración: 50 µg/L. n=5.

Efecto del tiempo de adsorción y desorción

De acuerdo a los resultados del estudio sobre el tiempo de extracción presentados en la Figura 3, son necesarios 20 min para lograr un equilibrio aceptable HS-SPME para que los analitos se adsorban sobre la fase estacionaria de la fibra y 4 min para conseguir una desorción completa. Por tanto, el tiempo de exposición de la fibra para esta técnica de extracción debe ser mantenido exactamente para obtener datos precisos y reproducibles. El tiempo de extracción reportado en estudios previos (16) es variable y está en el rango de 5 a 50 min, considerando 35 min el tiempo óptimo; estos valores dependen del tipo de fibra utilizada, temperatura seleccionada para la extracción, entre otras variables.

Temperatura de desorción

En los ensayos realizados se obtuvieron las siguientes áreas: 50 y 65 kHz para CHCl_3 , 32 y 45 kHz para CHCl_2Br , 22 y 35 para CHClBr_2 kHz y, 7 y 12 kHz para CHBr_3 a 200 °C y 250 °C, respectivamente. Por tanto, la temperatura óptima de desorción es 250 °C ya que ésta presenta una mayor eficiencia, resultado que concuerda con los parámetros de análisis determinados por Aguirre et al. (15), donde se establece que 250 °C es la temperatura óptima de trabajo. A pesar de observar un notable incremento del área con el incremento de temperatura, el valor máximo de temperatura que soporta la columna es 270 °C lo que imposibilita continuar aumentando la temperatura de desorción.

Efecto del volumen de muestra

En los ensayos realizados con 1 y 2 mL de muestra se encontró un área mayor de 76,3%; 29,4%; 19,1% y 50% para CHCl_3 , CHCl_2Br , CHClBr_2 y CHBr_3 , respectivamente, en las muestras con 2 mL frente a las de 1 mL. Al realizar la comparación del volumen de muestra a utilizar en los análisis se observa claramente que hay una mejor respuesta cuando se utiliza 2 mL, comparado con 1 mL, dado que en 2 mL existe una mayor cantidad de analitos presentes en la muestra. Los viales y el volumen de muestra uti-

lizado para realizar este ensayo concuerda con lo desarrollado por Aguirre et al. (15), en donde para la evaluación de variables, se toman 2 mL de muestra y se transfieren a viales de 4 mL que contienen cloruro de sodio, lo cual se asemeja a los ensayos previamente realizados en este trabajo.

Parámetros analíticos del método

El rango lineal del método fue evaluado mediante la construcción de curvas de calibración a partir de estándares en el rango de 5-100 $\mu\text{g/L}$ ($n=5$). Los límites de detección y cuantificación se determinaron teniendo en cuenta 3σ y 10σ de 5 réplicas de un estándar de 10 $\mu\text{g/L}$ y teniendo en cuenta una señal/ruido de radio 3. Los coeficientes de correlación (r^2) y los límites de detección y cuantificación obtenidos para los cuatro compuestos evaluados son mostrados en la Tabla 1. Se encontró que los mejores coeficientes de correlación siguen el modelo de regresión cuadrática. Los coeficientes de correlación se pueden comparar con los obtenidos por Bahri et al (16), en donde los valores están en un rango de 0,9947 a 0,9979. Los resultados del estudio de precisión y exactitud para los cuatro compuestos evaluados son mostrados en la Tabla 2, de acuerdo con estos datos el método presenta una buena confiabilidad.

Concentración de trihalometanos en la ciudad de Pereira

El método descrito ha sido utilizado exitosamente para determinar las concentraciones de THM's a la entrada (Planta Pisamo), salida de la planta de tratamiento (tanque Otún) y en un punto de distribución del sistema de la empresa Aguas y Aguas (tanque Consota). La planta trata en promedio 95403 $\text{m}^3/\text{día}$ mediante cloración como única técnica de desinfección y suministró el agua a cerca de 396.774 habitantes de la

Tabla 1. Parámetros de calidad analítica del método

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	R2	%RDS	Límite de detección ($\mu\text{g/L}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g/L}$)
CHCl_3	5,146	0,9955	10,11	3,8	12,8
CHCl_2Br	7,491	0,9963	9,11	0,75	2,50
CHClBr_2	10,037	0,9967	8,63	0,89	3,0
CHBr_3	12,414	0,9984	6,06	0,148	0,148

Tabla 2. Ensayos de Repetibilidad. Estándar de 10 $\mu\text{g/L}$.

Compuesto	$\bar{x} \cdot \mu\text{g/L}$ ($n=4$)	Precisión		Exactitud
		Desviación estándar	%RSD*	% Error
Cloroformo	11,0	0,57	5,18	10,1
BDCM	11,9	1,39	11,68	19,2
DBCM	11,8	1,07	9,07	17,9
Bromoformo	11,5	1,3	11,30	15,1

*%RSD. Porcentaje de desviación estándar relativa.

Tabla 3. Concentración de THM's ($\mu\text{g/L}$) de la planta de tratamiento de Aguas y Aguas de la ciudad de Pereira. $\bar{x} \pm \sigma$

Compuesto	Antes de la cloración (Pisamo) N=30	Salida de la planta (Tanque Otún) N=30	Red de distribución (Consota) N=15
CHCl_3	< LD*	50,25 $\pm$ 42,40	42,39 $\pm$ 37,71
CHCl_2Br	< LD*	2,26 $\pm$ 1,38	1,88 $\pm$ 0,86
CHClBr_2	< LD*	1,59 $\pm$ 0,48	1,60 $\pm$ 0,34
CHBr_3	< LD*	1,39 $\pm$ 0,31	1,37 $\pm$ 0,41
THM's	< LD*	55,5 $\pm$ 42,97	47,5 $\pm$ 40,69

*<LD: menor al límite de detección

ciudad de Pereira, en el año 2013. Como se observa en la Tabla 3, el cloroformo fue el compuesto encontrado en mayor concentración en todas las muestras que fueron analizadas después del tratamiento. El promedio de concentración de THM's totales y de cloroformo en las muestras de la salida de la planta (tanque Otún) fue de 55,5 y 50,25 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Todas las muestras analizadas se encuentran dentro de los valores máximos permitidos en las regulaciones tanto internacionales como nacionales (10-11). En este estudio se confirmó la producción de THM's durante el tratamiento de aguas en la planta de Aguas y Aguas de Pereira y la ausencia de estos contaminantes en la entrada a la planta.

Conclusiones

Se realizó la cuantificación de los trihalometanos en la planta de tratamiento de Aguas y Aguas de la ciudad de Pereira. La primera etapa fue la estandarización de las variables que influyen en su determinación por microextracción en fase sólida, seguido de cromatografía de gases con microcaptura de electrones (μECD). Las condiciones establecidas para cuantificar los trihalometanos son: un tiempo de extracción de 20 min a 37 °C en presencia de 25% de NaCl y con una agitación de 200 rpm; con tiempo de desorción de 4 min a 250 °C para 2 mL de muestra.

Se realizó la confirmación del método analizando los atributos de calidad como son los coeficientes de correlación, el %RDS y los límites de detección, valores que dan confiabilidad a la metodología empleada de acuerdo a los resultados obtenidos.

Se pudo observar que el cloroformo es el subproducto que presenta una mayor concentración en las muestras analizadas, es decir, es el compuesto más representativo del grupo de los cuatro THM's evaluados.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la Universidad Tecnológica de Pereira. Agradecemos en particular a la Empresa de Aguas y Aguas de Pereira por su colaboración en la recolección de las muestras para la ejecución del proyecto.

Referencias

1. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality*; WHO Press; 4th edition: Geneva, 2008.
2. Health Canada. *Guidelines for canadian drinking water quality*; Ottawa, 2008.
3. Richardson, S. D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *Trends. Anal. Chem.* **2003**, 22 (10), 666–84. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01003-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01003-3).
4. Hu, J.; Song, H.; Addison, JW.; Karanfil, T. Halonitromethane formation potentials in drinking waters. *Water Res.* **2010**, 44(1), 105-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.006>.
5. Kumar, S.; Forand, S.; Babcock, G.; Richter, W.; Hart, T.; Hwang, S. A. Total trihalomethanes in public drinking water supply and birth outcomes: a cross-sectional study. *Matern Child Health J.* **2014**, 18(4), 996-1006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10995-013-1328-4>.
6. Nieuwenhuijsen, M. J.; Toledano, M. B.; Bennett, J.; Best, N.; Ham-bly, P.; de Hoogh, *et al.* Chlorination disinfection by-products and risk of congenital anomalies in England and Wales. *Environ Health Perspect.* **2008**, 116(2), 216-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.10636>.
7. Richardson, S. D.; Plewa, M. J.; Wagner, E. D.; Schoeny, R.; Demarini, D. M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat. Res.* **2007**, 636(1-3), 178-242. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001>.
8. Font-Ribera, L.; Kogevinas, M.; Nieuwenhuijsen, MJ.; Grimalt, JO.; Villanueva, CM. Patterns of water use and exposure to trihalomethanes among children in Spain. *Environ Res.* **2010**, 110(6), 571-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2010.05.008>.
9. United States Environmental Protection Agency (USEPA). National primary drinking water regulations: stage 2 disinfectants and disinfection by products rule: final rule. *Fed. Reg.* **2006**, 71 (2).
10. República de Colombia, Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución 2115 de 2007. Diario oficial No 46.679 de 4 de Julio de 2007.
11. de la Cruz-Vera, M.; Palero-Sanz, J. M.; Lucena-Rodríguez, R.; Cárdenas-Aranzana, S.; Valcárcel-Cases, M. Análisis de la directiva europea 98/83/CE: paradigma de la justificación y establecimiento

- de los valores paramétricos: El caso concreto de los plaguicidas. *Rev. Esp. Salud Pública.* **2012**, 86(1), 21-35.
12. Lara-Gonzalo, A.; Sánchez-Uría, J. E.; Segovia-García, E.; Sanz-Medel, A. Critical comparison of automated purge and trap and solid-phase microextraction for routine determination of volatile organic compounds in drinking waters by GC-MS. *Talanta.* **2008**, 74(5): 1455-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.09.036>.
 13. Chary, NS.; Fernandez-Alba, AR.; Determination of volatile organic compounds in drinking and environmental waters. *Trends. Anal. Chem.* **2012**, 32, 60-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.011>.
 14. Campillo, N.; Viñas, P.; López-García, I.; Aguinaga, N.; Hernández-Córdoba, M. Purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection for volatile halogenated organic compounds determination in waters and beverages. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1035(1), 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.029>.
 15. Aguirre-Gonzalez, M.; Taborda-ocampo, G.; Dussan-lubert, C.; Nerin, C.; Rosero-moreano, M. Optimization of the HS-SPME technique by using response surface methodology for evaluating chlorine disinfection by-products by gc in drinking water. *J. Braz. J. Chem. Soc.* **2011**, 22(12), 2330-6.
 16. Bahri, M.; Driss, MR.; Development of solid-phase microextraction for the determination of trihalomethanes in drinking water from Bizerte, Tunisia. *Desalination.* **2010**, 250(1), 414-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.067>.
 17. Rosero, M. M.; Aguirre, M.; Pezo, D.; Taborda, G.; Dussán, C.; Nerin, C. Solventless microextraction techniques for determination of trihalomethanes by gas chromatography in drinking water. *Water Air Soil Pollut.* **2012**, 223, 667-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-011-0891-9>.
 18. Behzadi, M.; Noroozian, E.; Mirzaei, M. Preparation and application of carbon nanotubes/poly(o-toluidine) composite fibers for the headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes. *J Sep Sci.* **2013**, 36(21-22), 3550-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201300682>.
 19. Bianchin, J. N.; Nardini, G.; Merib, J.; Dias, A. N.; Martendal, E.; Carasek, E. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure. *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1233, 22-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.022>.
 20. Derouiche, A.; Driss, M. R.; Morizur, J. P.; Taphanel, M. H. Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1138 (1-2), 231-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.064>.
 21. Raposo-Júnior, J. L.; Ré-Poppi, N. Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta.* **2007**, 72(5), 1833-41.

Article citation:

Vallejo, O.; Beltrán, L.; Franco, P.; Montoya, C.; Alzate, E.; Reyes, H. Determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano por microextracción en fase sólida- cromatografía de gases en Pereira, Colombia. *Rev. Colomb. Quim.* **2015**, 44(1), 23-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54041>

Recibido: 10 de febrero de 2015. Aceptado: 9 de marzo de 2015.

Relevant chemistry topics for the clinical practice of a physiotherapist

Abstract

Physiotherapist is a discipline whose aim is to preserve, restore, and improve the health status of individuals with motor disturbances or at risk of developing and to improve the quality of life of people and community. The aim of this article was to determine which are the most important topics of general organic and biological chemistry courses within the physiotherapist undergraduate career at the University Bernardo O'Higgins. For this purpose we followed a model of qualitative study, applied in two different groups of people: educators of the physiotherapist career (PE) and clinical physiotherapist (CP), who were asked about the importance of topics related to chemistry courses, general, organic and biological (GOB courses). Each participant must choose a category for each topic: "important", "relevant" or "not important" for a physiotherapist clinical activity. Results show that the more frequently topics considered as "important" in both groups were from biological chemical course: proteins and its metabolism. Secondly, none of the interviewed subjects considered any of the topics of the course of organic chemistry as "important" for the clinical activity of a physiotherapist. Thus, the aim of the study is widely fulfilled and it might be concluded that future studies are required involving a larger sample size in these and other universities that will generate results for a good curricular articulation.

Key words: Chemistry, clinical education, physiotherapist.

Tópicos de química relevantes para la práctica clínica de un fisioterapeuta

Resumen

La fisioterapia es una disciplina cuyo objetivo es conservar, restaurar y mejorar la salud de los individuos que presentan o tienen riesgo de tener alteraciones motoras. El objetivo de este artículo fue determinar cuáles son los tópicos más importantes de química general, orgánica y biológica para la práctica clínica en la carrera de fisioterapia en la Universidad Bernardo O'Higgins. Para lo anterior se siguió un modelo de estudio cualitativo aplicado en dos grupos de personas: educadores de la carrera de fisioterapia (PE) y fisioterapeutas clínicos (CP) que fueron encuestados en relación a los tópicos de los cursos de química general, orgánica y biológica, denominados cursos GOB. Cada participante debía elegir una categoría: "importante", "relevante" y "no importante" de acuerdo a la práctica clínica para cada uno de los tópicos preguntados. Los tópicos que presentaron mayor frecuencia como "importante" en ambos grupos entrevistados fueron tópicos del curso de química biológica: proteínas y su metabolismo. Además, ninguno de los encuestados consideró ninguno de los tópicos del curso de química orgánica como "importante" para la actividad clínica de los fisioterapeutas. El objetivo del estudio se cumplió completamente y se puede concluir que son necesarios estudios a futuro que involucren mayor cantidad de encuestados de esta y otras universidades, de este modo se generarán más resultados para una buena articulación curricular.

Palabras clave: química, educación clínica, fisioterapeuta.

Tópicos químicos relevantes para a prática clínica de um fisioterapeuta

Resumo

A terapia física é uma disciplina cujo objetivo é conservar, restaurar e melhorar a saúde dos indivíduos que têm um estado de risco de comprometimento motor. O objetivo deste artigo foi determinar quais são os temas mais importantes da química geral, orgânica e biológica para a prática clínica na carreira de fisioterapia na Universidade Bernardo O'Higgins. Para o anterior efetuouse um estudo qualitativo aplicado a dois grupos de pessoas: educadores da carreira de fisioterapia (PE) e fisioterapeutas clínicos (CP). Eles foram entrevistados em relação aos temas dos cursos de química geral, orgânica e biológica, chamados cursos GOB. Cada participante devia escolher uma categoria: "importante", "relevante" e "sem importância" de acordo com a prática clínica para cada um dos temas questionados. Os temas mais frequentemente apresentados como "importante" em ambos grupos entrevistados foram os temas do curso de química biológica: proteínas e metabolismo. Além disso, nenhum dos inquiridos considerou qualquer dos tópicos do curso em química orgânica como "importante" para a atividade clínica dos fisioterapeutas. O objetivo do estudo foi completamente cumprido, e pode-se concluir que são necessários estudos futuros envolvendo um maior número de entrevistados nesta e em outras universidades, desse jeito se gerarão mais resultados para uma boa articulação curricular.

Palavras chave: química, educação clínica, fisioterapeuta.

Introduction

Physiotherapist is a discipline whose aim is to preserve, restore, and improve the health status of individuals with motor disorders and risk of having a stroke movement, also to improve the quality of life of the people and community (1). Physiotherapist has had a fundamental development in recent years due to increase disabled that people every day are added as a result of increased life expectancy, the increasing number of elderly people, and the grow number of chronic degenerative diseases (2).

This discipline bases its work on the human body motion, where the connection between molecules, cells, tissues, systems and organs, as well as the person in the environment, and the individual in society, are influenced by the movements of a person and, therefore, has a strong link with medicine. There have been great advances in this career, very significant in the development of public health programs in Chile. In this sense, in 1989 the Acute Respiratory Infections (ARI) rooms were created with the intention to decrease in less than ten years the high rates of infant mortality from pneumonia in Chile. Along with this, rooms of Adult Respiratory Diseases (ARD), rehabilitation and community centers were created, further enhancing of the work of physiotherapist in Primary Health Care (PHC) (3). Both examples show the public health physiotherapists importance.

During the formation of a physiotherapist, in the first career years, they have a strong education in basic science courses, centered in chemistry and biological courses, which are taught by experts in this area and not necessarily by physiotherapist. This often has consequences in relation to the contents that must be taught and how deep should be made, which may have an impact on future student performance.

According to our knowledge there are no published studies related to analyze the perception of basic science courses on the physiotherapist career. Thus, regarding the physiotherapist career importance in the health system in Chile, the main objective of the study was to determine which are the most important topics of the general, organic and biological (GOB) courses within the undergraduate of physiotherapist career.

Materials and methods

Methodology

This is a qualitative study in two different groups of people: educators of the physiotherapist career (PE) and clinical physiotherapist (CP). Both groups were asked through a semi-structured survey, about the importance of topics related to the chemistry area (general, organic and biological), these courses were call GOB courses. The topics asked in interviews are all topics that currently have the GOB courses at the University Bernardo O'Higgins, where the study was conducted, and the goal was to fairly evaluate the perception of the topics currently being taught.

The participants of the two groups categorized if the topics of the GOB courses that were asked were: "important", "relevant" or "not important" to the formation of a physiotherapist considering that they will work in clinical activity. According to the applied interview, the definition of the three categories is as follows:

- Important: have a direct relationship with clinical practice.
- Relevant: facilitate the understanding of central subjects, but are not directly related to clinical practice.

- Not important: it has no direct or indirect relationship with the clinical practice of a clinical physiotherapist.

The interview applied also included the possibility of each subject to add comments about their perception of each chemistry topic according to their experience, and this also was included in the results.

The list of topics that contained the survey was obtained from current programs of the institution where the study was performed and that also correspond to established topics in chemistry textbooks (4, 5, 6, 7, 8).

Participants

The study sample consisted a group of PE with an extensive academic career over 10 years ($n=18$) corresponding to 40% of all teachers that participate in the kinesiology school at the University Bernardo O'Higgins. Also were interviewed a second group of CP ($n=11$), within the last three years of graduates from the University of Bernardo O'Higgins, corresponding to 60% of graduates, since this is a relatively new career at the University.

The PE, which participated in this study, have a long academic career with undergraduate students in the following courses: rehabilitation, occupational health, exercise physiology, functional anatomy, cardiovascular therapist, and basic emergency care, among others. It is for this reason that they were an important population to categorize topics, based in their own perception of basic science courses, also because they have an extensive experience, focused on clinical specialty courses.

The CP participants corresponded to graduate students from University Bernardo O'Higgins within the last three years, which allow them to provide the latest vision of how the topics of the GOB courses influence clinical practice.

Data collection

The data collection was conducted through individual interviews to the participating subjects where a semi-structured survey was applied. This method allows categorizing all the topics of the GOB courses according to individual experience and knowledge of participants (9).

Applied interview had all the topics of the GOB courses, each respondent had to categorize each topic in one of the three possible categories: "important", "relevant" or "not important", choosing only one of these. In addition, each interview had a section for writing comments, which make it a semi-structured interview. The only previous bounding provided to participants was to categorize each topic according to the clinical activity that physiotherapist would perform.

The objective of interviewing two groups of people was to understand the diverse perceptions and interpretations of the chemical topics for the clinical practice of a physiotherapist. The results of the interviews were digitally transferred for further analysis.

Data analysis

The first result analyzed was the frequency of the categorization for each topic of the GOB courses according to the applied interview. Subsequently, those topics that were chosen as "important" for PE and CP in a frequency equal to or greater than fifteen (half of the sample) were selected to generate a final list of the most important topics of chemical area (GOB courses) for clinical practice of physiotherapists.

Results

The frequencies obtained per topics in each GOB course are presented in tables 1, 2 and 3, together some comments of certain topics are presented. Finally table 4 presents the list of the most “important” topics of the GOB courses, this list is constructed according to the methodology previously explained. For each GOB course the results details are presented.

General chemistry

The results obtained for the topics of the general chemistry course are shown in Table 1. According to PE the most important topic is “Acids, Bases and Salts” (n=10). On the other hand, according to the CP, the most important topics in general chemistry topics are: “Basic Topics”, “Covalent Bonds” and “Gas, Liquid and Solid” (n=7). some educator emphasizes the concept of basic topics and one teacher (PE 03) states:

Table 1. Distribution of the categorization of the general chemistry topics according to the teachers and clinical physiotherapist.

Topic	Expert	Important	Relevant	Not Important
Basic Topics	PE	8	5	5
	CP	7	4	0
Chemistry Measurements	PE	2	6	10
	CP	3	4	4
Atomic Structure and Periodic Table	PE	2	7	9
	CP	2	4	5
Ionic Bonds	PE	4	5	9
	CP	4	5	2
Covalent Bonds	PE	4	5	9
	CP	7	3	1
Chemistry Calculation	PE	4	5	9
	CP	1	4	6
Gas, Liquids and Solids	PE	9	5	4
	CP	7	3	1
Solutions	PE	4	5	9
	CP	2	5	4
Chemistry Reactions	PE	6	5	7
	CP	3	5	3
Acids, Bases and Salts	PE	10	3	5
	CP	6	4	1
Nuclear Chemistry	PE	0	7	11
	CP	0	6	5

Table 2. Distribution of the importance of Organic Chemistry topics according to experts

Topic	Expert	Important	Relevant	Not Important
Saturated Hydrocarbons	PE	4	6	8
	CP	2	5	4
Unsaturated Hydrocarbons	PE	3	7	8
	CP	2	5	4
Alcohols, Phenols, Ethers	PE	3	7	8
	CP	2	4	5
Aldehydes and Ketones	PE	3	8	7
	CP	1	5	5
Carboxylic Acids, Esters	PE	3	8	7
	CP	2	5	4
Amines and Amides	PE	5	3	10
	CP	3	3	5

Table 3. Distribution of the importance of biological chemistry topics according to experts

Topic	Expert	Important	Relevant	Not Important
Carbohydrates	PE	14	4	0
	CP	10	1	0
Lipids	PE	15	3	0
	CP	9	2	0
Proteins	PE	15	3	0
	CP	10	1	0
Enzymes and Vitamins	PE	14	4	0
	CP	10	1	0
Nucleic Acids	PE	12	3	3
	CP	8	1	2
Biochemical Energetics	PE	13	4	1
	CP	11	0	0
Carbohydrates Metabolism	PE	14	4	0
	CP	11	0	0
Lipids Metabolism	PE	14	4	0
	CP	10	1	0

Table 4. Most important topics of the GOB courses in the physiotherapist practice

Topics	Total Frequency
Basic aspects of matter	15
Gas, liquids solids	16
Acid, bases, salts	16
Carbohydrates	24
Lipids	24
Proteins	25
Enzymes and vitamins	24
Nucleic acids	20
Biological chemistry and energy production	24
Carbohydrates metabolism	24
Lipids metabolism	24
Proteins metabolism	25

“The relevance is in the appropriate management of basic topics related to chemistry and biology”.

On the other side, it was mentioned by one teacher (PE 10) respect to “acid, base and salts” topic the following: “It is important and depends directly on the area of practice, since in the respiratory area these concepts are relevant compared to the esthetics features”. Among the interviewed group, any of them considered the nuclear chemistry as an important topic.

Organic chemistry courses

In the organic chemistry courses the results are shown in Table 2, where the most frequencies are in the “relevant” or “not important” to clinical activity. In fact none of the topics have a frequency of 15 or higher for the “important” category.

Biological chemistry topics

The results for topics of the biological chemistry are showed in Table 3.

The topics “Lipids”, “Proteins” and “Proteins metabolism” were considered as “important” (n= 15) for the clinical practice according to PE. Together and with a frequency of 14 the topics: “Carbohydrates”, “Enzymes and Vitamins”, “Carbohydrates metabolism” and “Lipid metabolism” were considered as “important” in the PE group.

On the other hand, all the subjects in the CP group (n= 11) consider the topic “Carbohydrates metabolism” as “important” for clinical practice. In general all topics of the biological chemistry course were considered “important” for clinical practice in both groups interviewed PE and CP. It is observed that many of those topics are related between each other; for instance, in the carbohydrates metabolism field, which is important to understand the expenditure and energy generation directly

related to muscle function and clinical activity of a physiotherapist. The latter obviously is associated with physical exercise; this aspect is emphasized by one of the physiotherapist educator (PE 09), which stands: "biological chemistry knowledge is fundamental to understand many of the benefits of controlled physical exercise".

Important GOB topics for clinical practice

According to the results in tables 1, 2 and 3, it was generated the table 4, which shows the topics considered "important" more frequently for the clinical practice, according to the study participants. Importantly, the topics listed in Table 4 corresponds to all the topics of the GOB courses that had 15 or more frequency responses adding the two groups of participants (PE and CP).

It is shown that among total of topics incorporated into the interview (n=26), 12 are considered as "important" to the clinical practice of physiotherapists. Of these 12, nine (75%) are topics of biological chemistry; the other three (25%) correspond to general chemistry topics, however none of the topics of organic chemistry exceeded the frequency of 15 to be considered in the final list.

Discussion

This is the first study that evaluates the perception of teachers and physiotherapist on the importance of topics of chemistry courses in the physiotherapist career, which had been studied before in other health careers such as nursing (10).

In relation to general chemistry course any of the participants considered nuclear chemistry topic as "important", however this course is essential to understand the radiation and radioactivity, which are used to comprehend radiology aspects, it is relevant in respiratory clinic and cardiac areas. These relationships are demonstrated in some CIU (Critical Illness Unit) patients whose muscle membrane excitability is reduced, as observed in critical illness myopathy (CIM) patients (1). Nevertheless, most of the participants considered nuclear chemistry as "not important".

Additionally, the biggest difference between the PE and CP groups in general chemistry was on the acids, bases and salts topic, where PE considered as "important" topic with a difference of 4 points over CP group. The acids, bases and salts topics are essential to understand the pH regulation and buffers in the organism, which could be related to muscle function. Here the main issue is to understand the respiratory system and its pH regulation, what it becomes very important considering the places, on public health, where a physical therapist can work, as was mentioned in the ARI and ARD rooms. On the other hand, draws attention that any topic of organic chemistry course was considered as "important" at a high frequency, in fact the majority of the participants in both groups considered the organic chemistry topics as "not important". This is rare because these topics are central to acquire knowledge of biological chemistry, thus the function of a molecule cannot be fully understood if its structure is not known. This shows, as was mentioned above, that the topics of organic chemistry are not directly considered important for physiotherapist clinical practice and its relevance would rather be indirect, as it helps to acquire knowledge of biological chemistry, according to interviewed perceptions.

Relative to biological chemistry topics is interesting how all the listed topics are considered as "important" in both groups. Which was expected, if we think that glucose is one of the energetic sources for the organism and the glycolysis process is related with the generation of energy, and that knowledge could be relevant for clinical practice, especially in areas as rehabilitation, and even in other actions not directly

related with clinical activity as sports. Therefore, the ability of the muscle cell to sense, process, and respond to mechanical stimuli is an important regulator of gene expression and protein synthesis (1). Moreover, the energy production is highly related to ATP production and ATP hydrolysis, which is directly related with motion process.

In addition the high choice of the biological chemistry topics as "important" in both groups, could be explained, in part, because it is important for physiotherapist formation the knowledge about some metabolic frequent pathologies such as diabetes, hypertension and obesity, particularly for those professionals that would work at primary health centers. (11).

The fact that this study has found that most PE and CP interviewed did not consider the topics of organic chemistry as "important", does not mean it is actually so, because it remains a small sample. In this sense the Brown's study performed in nursing career found among the most important topics, those that belong to organic chemistry course like: alcohols, phenols, ethers, carboxylic acids, esters, amines and amides, that in our study were classified as "important". That variance could be related to the difference in the clinical activity that each professionals do.

Another important fact to consider is that all the choices that every participant made to rank each GOB course topic were determined by individual experiences of each subject, which reinforces, even more, the idea that we cannot extrapolate or generalize the results obtained in this study.

However the results obtained represent the first report to analyze the relationship between topics of basic science and clinical activity according to individual perception of school physiotherapy members.

Conclusion

This study showed that: the topics chosen most often as "important" considering both groups were proteins and its metabolism, generally all topics of biological chemistry course were listed as important. Furthermore, it was found that none of the topics of the course of organic chemistry were listed as "important" by any of all interviewed. Thus the aim of the study is widely fulfilled, however is important to consider that this work corresponds to an exploratory study. Thus establishing that the results obtained in this study, although are preliminary, are a first attempt to analyze how the people that work in physiotherapist school perceived these courses.

In this study we included evaluation of topics of chemistry courses in one career at University Bernardo O'Higgins, therefore we cannot extrapolate the obtained results to the rest of the health careers of our university or other physiotherapist career in some other university. Future studies are required involving a larger sample size in this and other universities that will generate results for a good curricular articulation.

Acknowledgments

This work was supported by Fondecyt 11130007.

References

1. Llano-Diez, M.; Renaud, G.; Andersson, M.; Gonzales Marrero, H.; Cacciani, N.; Engquist et al. Mechanisms underlying intensive care unit muscle wasting and effects of passive mechanical loading. *Crit. Care.* **2012**, *16*, 1-16.
2. Von Kondratowitz, H.-J. The Futures of Old Age. *IJAL.* **2007**, *2*, 7-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.3384/ijal.1652-8670.0721119>.

3. Ministry of Health. Chile 2015. Available from: www.minsal.cl. [Accessed on January 11th 2015].
4. Chang, R.; Goldsby, K. *Chemistry*, 11th ed.; McGraw-Hill Education: New York, 2013; pp 38-328.
5. McMurry, J. *Organic Chemistry*, 8th ed.; Brooks/Cole: Massachusetts, 2011; pp 74-344, 620-1088.
6. Klein D. *Química orgánica*, 1st ed.; Editorial Medica Panamericana: Madrid, 2013; pp 120-173.
7. Timberlake, K. *Química general, orgánica y biológica*, 10th ed.; Prentice-Hall: Madrid, 2011; pp 209-382, 513-591.
8. Karp, G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, 2^d ed.; McGraw-Hill Interamericana: México, D. F., 2014; pp 86-120.
9. Merriam, S. B. *Qualitative research and case study applications in education: Revised and expanded from case study research*. Jossey Bass Education Series: San Francisco, CA., 2001; pp 69-150.
10. Brown, C. E.; Henry, M. L. M.; Barbera, J.; Hyslop, R. M. A bridge between two cultures: uncovering the chemistry concepts relevant to the nursing clinical practice. *J. Chem. Educ.* **2012**, 89, 1114-1121. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ed200041x>.
11. Di Fabio, R. P. Efficacy of manual therapy. *PTJ*. **1992**, 72, 853-864.

Article citation:

Ramírez, R.; Ocaranza, J.; Chávez, N.; Valladares, M. Relevant chemistry topics for the clinical practice of a physiotherapist. *Rev. Colomb. Quim.* **2015**, 44(1), 30-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54043>

Recibido: 15 de Enero 2015. Aceptado: 17 de Febrero de 2015

Una metodología para el estudio de las ideas previas sobre química a través del análisis de expresiones gráficas

Resumen

Se examinaron las respuestas gráficas de hombres y mujeres jóvenes, de 17 años en promedio, inscritos en cursos de nivelación en ciencias. Se encontró que predominan en toda la población alusiones a material de laboratorio y a experimentos. La categoría denominada Iconos/Iconemas (representaciones de sensaciones o sentimientos, o figuras geométricas aisladas) aparece con frecuencia en la población de 17 años. Los análisis muestran que el porcentaje de población que incluye el cuerpo humano en sus expresiones nunca es superior al 30%. Cuando aparecen figuras humanas sus escenarios dejan ver que son experimentadores, no se muestra el cuerpo humano como parte del estudio químico. Al indagar sobre la orientación vocacional, se encontró que los hombres prefieren carreras científicas y las mujeres optan por programas del área de la salud. El artículo concluye que es posible indagar y analizar la percepción esencial sobre el área de la química gracias al estudio de expresiones gráficas y considerar correspondencias entre edad, sexo y orientación vocacional. Esta información es útil tanto para planear y orientar las actividades de aula, como para inquirir paradigmas y concepciones, y establecer el grado de abstracción y el conocimiento de los estudiantes sobre el alcance y la aplicabilidad de la química.

Palabras clave: paradigmas, expresiones gráficas, ideas previas.

A methodology to the study of preconceptions about chemistry through the analysis of graphics expressions

Abstract

Graphic answers about meaning of chemistry were examined in men and women (around 17 years old) enrolled in remedial courses in sciences areas. Representations of laboratory material and chemical experiments predominated. The icons category (representations of sensations and feelings or isolated geometric figures) appears frequently in population around 17 years old. The analysis shows the percentage of population that includes the human body in their representation is never upper than 30%; when human representations were done, seems they are experimentalists; the human body is not part of the chemical study. By vocational orientation examination, predominance for men in scientific careers and women in health areas were found. The research concludes is possible enquire the essential perception about the chemistry by analyzing of graphic expressions and considering correlations between age, sex and vocational orientation. This information is useful to planning and orienting the classroom activities. In addition, it is possible to investigate paradigms and preconceptions and to establish the abstraction level and the knowledge about scope and applicability of the chemistry.

Keywords: Paradigms, graphics expressions, preconceptions.

Uma metodologia para o estudo das idéias preconcebidas sobre a química através do analises de expressões gráficas

Resumo

Na esta pesquisa, examinaram as repostas gráficas de homens e mulheres jovens, de 17 anos na media, inscritos nas disciplinas de nivelção em ciências. A majoritária das repostas, com na população pesquisada, são referências ao material do laboratório e experimentos. A categoria denominada Ícones (representações de sensações ou sentimentos, ou figuras geométricas isoladas) aparece com frequência na população de 17 anos. Os analises apresentam que a percentagem da população que usa as expressões corporais nunca é maior que 30%. Quando aparecem figuras humanas, os seus cenários mostram que são experimentadores; o corpo humano não faz parte do estudo químico. Al perguntar sobre a orientação vocacional, encontrou se que os homens preferem carreiras científicas e as mulheres escolhem os programas da área da saúde. O artigo conclui que é possível indagar e analisar a percepção essencial sobre a química com a ajuda do estudo de expressões gráficas e encontrar correlações entre a idade, o sexo e a orientação vocacional. Esta informação é útil tanto para planear e orientar as atividades da aula quanto para inquirir paradigmas e concepções, e estabelecer o grau de abstração e o conhecimento dos estudantes sobre o alcance e a aplicabilidade da química.

Palavras-chave: paradigmas, expressões gráficas, idéias preconcebidas.

Introducción

La comunicación entre el profesorado y el alumnado de ciencias naturales enfrenta una serie de dificultades como aquella asociada a la brecha que se produce entre el lenguaje cotidiano (en sus aspectos sintácticos y semánticos) y el lenguaje científico. Dichos obstáculos conducen a desencuentros y sinsentidos en la clase. La problemática del contexto en el lenguaje es un importante tema de investigación ya que evidencia la fractura entre lo denominado ciencia erudita y ciencia escolar. El lenguaje, por ser instrumento de expresión de ambas ciencias, exhibe semejanzas y diferencias al ser usado de una u otra manera; además se producen deformaciones en la transición de una ciencia hacia la otra (1,2). La comparación entre el conocimiento construido y el conocimiento científico para establecer las dificultades de los alumnos en relación con la práctica docente, ha sido abordada en estudios recientes considerando los contenidos específicos de alguna asignatura (3). Además, otra dificultad importante que impide que se produzcan aprendizajes significativos tiene que ver con las grandes diferencias entre las diversas representaciones idiosincrásicas que construyen los alumnos acerca del mundo natural y las correspondientes representaciones científicas. Se puede afirmar entonces, que la diferencia entre los modelos mentales involucrados en uno y otro extremo de la comunicación, entre expertos y novatos, involucra tanto aspectos lingüísticos –semánticos y sintácticos– como representacionales (4).

Según Galagovsky *et al* (5), los dibujos son la parte gráfica que representa, en forma simplificada y concreta, algunos conceptos abstractos y sumamente complejos de cualquier modelo científico que, extrapolado con el “qué, cómo y de qué manera dibujan las personas lo que entienden o piensan sobre las ciencias”, se convierte en un método fundamental de evaluar diferentes parámetros, desde lo simple y concreto (desarrollo del concepto de química desde la concepción primaria), hasta elementos o ideas en niveles superiores, incluyendo lo abstracto y más complejo.

El estudio de las representaciones gráficas es bien conocido en indagaciones del tipo: “El dibujo de un científico” (6,7). En estos análisis se plantean indicadores y la correlación entre su uso y la evolución de los estándares, la edad, la situación socioeconómica, sexo y rasgos culturales particulares, entre otros. También son de interés los análisis de las imágenes en los libros de ciencia de la escuela (8,9) y las que aparecen en artículos de prensa o de divulgación de ciencia y tecnología. Así como las imágenes visuales de los textos tienen convenios específicos en su construcción (10,11), las expresiones gráficas de las personas embeben ciertas convenciones que permiten reconfigurar su contenido semántico.

La noción conceptual de lo que es y abarca el área de la química es en principio entendida como una construcción académica dentro de la labor docente-estudiante; esta construcción se basa fundamentalmente en el trabajo de aula, pero no desconoce el bagaje cultural y social relacionado con esta disciplina. La continua evolución de las ideas debe evaluarse considerando los parámetros dentro de los cuales el individuo se desarrolla, lo cual está relacionado con su identidad (rol de género –socialmente influenciado–, edad en la que se encuentra, sociedad a la cual pertenece, influencia cultural, etc.) (12). Las indagaciones sobre temas específicos de química antes del trabajo de aula pueden establecer y analizar las evocaciones de los jóvenes a través del análisis de representaciones sociales que aparecen en la intersección entre la ciencia y el sentido común; estas representaciones pueden concebirse como una forma de entender “cómo el conocimiento producido en el ambiente académico pasa a formar parte del sentido común de la gente” (13). Las diferencias entre el conocimiento construido por los jóvenes y el conocimiento científico se deben también a las representaciones sociales particulares de los docentes que han tenido los individuos (14) y del léxico conocido y comprendido; en general, como los procesos de

enseñanza y aprendizaje son fenómenos sociales, en la elaboración y expresión del conocimiento van a confluir tanto elementos y aspectos personales como sociales (15).

La consideración de las ideas previas es un tema abordado desde hace tres décadas, al menos, y se ha discutido tanto su valor como punto de partida para el desarrollo de nuevos temas, como las desventajas que estas ideas erróneas puedan generar en el proceso enseñanza-aprendizaje. La investigación sobre el origen, persistencia y modificación de las concepciones de los alumnos tiene objetivos como la propuesta de estrategias de aula para generar aprendizaje significativo (16). Las ideas expresadas sobre los diversos temas de un área como la química son comúnmente diferentes a las aceptadas por los profesionales de la química y la gran variedad de concepciones alternativas se pueden manifestar en las discusiones de aula y durante la resolución de problemas (17). Las ideas espontáneas son construcciones personales sobre las que se han identificado semejanzas en estudiantes de diferentes países y sistemas educativos (18,19).

En principio se puede exaltar lo complejo que resulta el desarrollo conceptual comprometido en la respuesta a la pregunta ¿Qué es la química? Dar la respuesta es un proceso más complejo aún si se tiene en cuenta que la población que se examina da sus opiniones de acuerdo con los parámetros establecidos por los diversos elementos de su identidad; la respuesta puede ser una construcción individual que se logra de manera intuitiva y perceptiva. Además, la población de interés podría estar en edades en las cuales las habilidades de expresión escrita no están maduras. Esta situación lleva a plantearse sobre formas eficientes de evaluar y estudiar las respuestas considerando las influencias que pesan sobre ellas.

Materiales y métodos

La población escogida para hacer la prueba y establecer la metodología fue un grupo de estudiantes de secundaria de escuelas públicas y privadas, inscritos en cursos libres de ciencias y de matemáticas básicas. Su inscripción en dichos cursos busca reforzar sus conocimientos antes de presentar el examen de admisión a las universidades públicas del país. Dado su carácter exploratorio, este estudio se llevó a cabo solo con este grupo de 110 jóvenes de modo que aún no es estadísticamente representativo.

La prueba se aplicó el primer día de clases antes de realizar actividades relacionadas con el área de química, consistió en completar un formato donde se hacía énfasis en la siguiente leyenda: “Dibuje, dentro del cuadro, lo que significa para usted la palabra **QUÍMICA**. Tiempo disponible: 3 minutos.” Se les solicitaba relacionar su nombre, edad, sexo y orientación profesional (carrera a seguir).

Luego de obtener los resultados, estos se analizaron y se organizaron de acuerdo a las categorías relacionadas a continuación; después de cada categoría, se exponen ejemplos de cada una:

- **Naturaleza:** Conjunto, orden y disposición de todo lo que compone el universo (20) Además de lo que puede resultar bastante intuitivo como conjuntos de estos elementos (árboles, montañas, nubes, ríos, etc.), se incluyen elementos aislados de estos; de acuerdo con la definición de la Real Academia Española, que se toma como referencia para esta categoría, se consideran también otras construcciones relacionadas con el universo, como los planetas (ver Figura 1).
- **Lenguaje químico:** En esta categoría se incluyen modelos de representación atómica, fórmulas químicas y ecuaciones químicas; además de representaciones alusivas a tablas periódicas y elementos (ver Figura 2).



Figura 1. Ejemplos de representaciones de la categoría naturaleza.

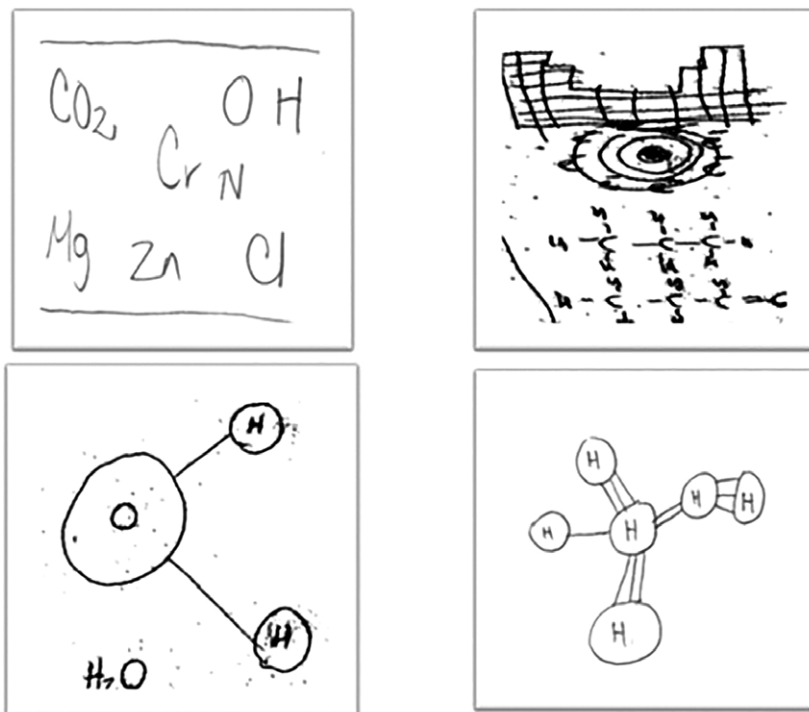


Figura 2. Ejemplos de representaciones de la categoría lenguaje químico.



Figura 3. Ejemplos de representaciones de la categoría cuerpo humano

- **Cuerpo Humano:** Se consideran construcciones complejas o parciales del cuerpo humano, esto es, se incluyen dentro de esta categoría representaciones del cuerpo completo y partes de este como ojos, brazos y manos. También se incluyen otras

construcciones que hacen alusión a todas las consideraciones anteriores (ver Figura 3).

- **Construcciones Ingenieriles:** En esta categoría se incluyen los elementos que indican el uso de recursos opuestos a lo natural.

Se tiene en cuenta la elaboración de elementos con conjuntos de figuras geométricas bien definidas como cuadrados, rectángulos, triángulos y círculos. En esta categoría hay: edificios, casas, vehículos, mesas, y otro tipo de elementos de desarrollo humano (ver Figura 4).

- **Material de laboratorio:** En esta categoría se incluye todo tipo de material utilizado en el laboratorio y dibujos alusivos a experimentos (ver Figura 5).

- **Íconos/Iconemas:** Se incluyen todas aquellas representaciones que definen una sensación o sentimiento; por ejemplo, caras felices, caras tristes, corazones, estrellas (no ubicadas en el contexto del universo), etc.; aquellas figuras geométricas aisladas no ubicadas en el contexto del dibujo principal, por ejemplo, círculos, cuadrados, triángulos, gotas, etc.; se hace referencia en esta categoría, además, a expresiones escritas y flechas (ver Figura 6).

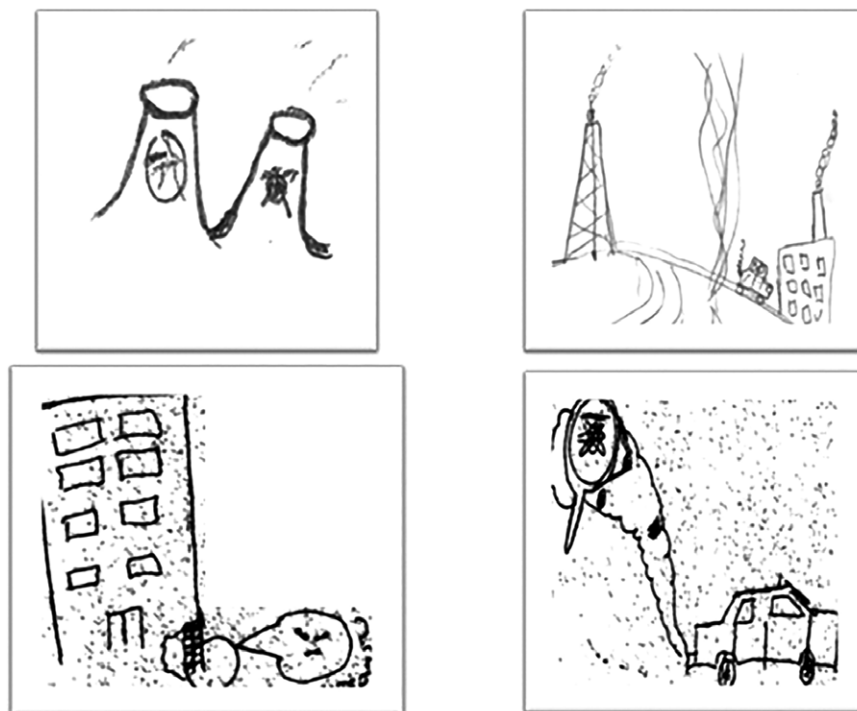


Figura 4. Ejemplos de representaciones de la categoría construcciones ingenieriles

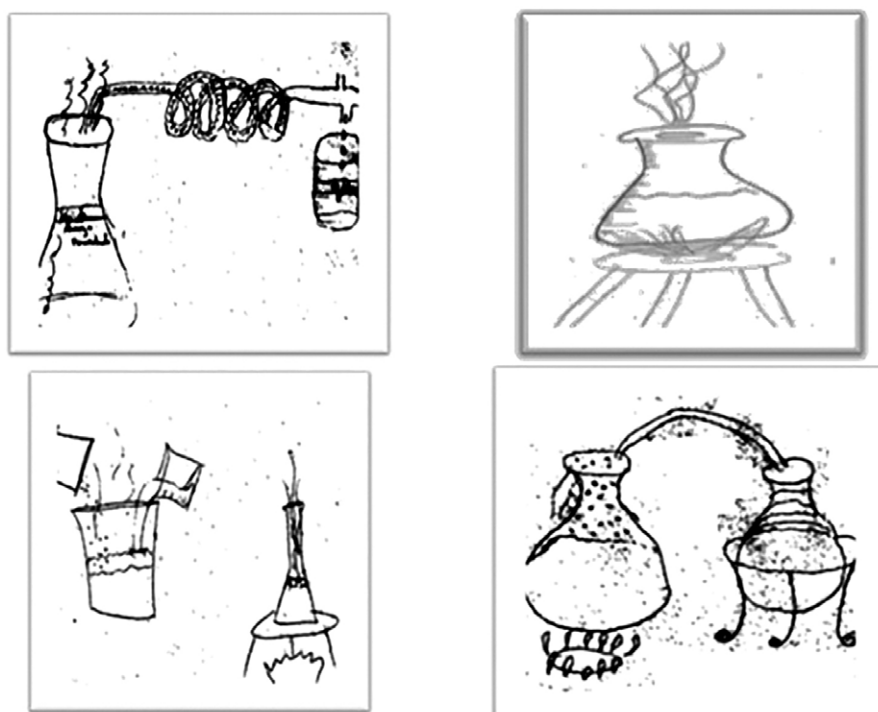


Figura 5. Ejemplos de representaciones de la categoría material de laboratorio

Las imágenes podían ser clasificadas en una o varias categorías, según la cantidad de información contenida.

Validez estadística de los resultados

Se realizó un análisis factorial múltiple; este es un método de análisis descriptivo multivariante para variables de tipo dicotómico y categórico (nominal u ordinal). El análisis se realizó empleando el Paquete Estadístico R® (versión 3.1.3 –Smooth Sidewalk). Se usó el programa Excel® para la visualización de los resultados. El análisis factorial múltiple arroja el círculo de correlaciones de las variables.

Para verificar las anteriores relaciones se hizo uso de la prueba Chi-cuadrado, la cual plantea como hipótesis nula que las variables son independientes, es decir, que no están correlacionadas.

La prueba arroja un valor que es usado para determinar si se rechaza o no la hipótesis nula de independencia entre las variables. Se usó un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$). Cuando el valor (denominado P) es menor a 0,05, se rechaza la hipótesis nula.

Resultados y discusión

Generalidades obtenidas en las categorías

La Tabla 1 muestra la organización dada a las categorías. La numeración no refiere jerarquía. La Figura 7 muestra el porcentaje de población que manifestó en sus expresiones gráficas, elementos de cada una de las categorías. Los números del 1 al 6 en esta gráfica se refieren a las categorías de la Tabla 1.

Se encontró que gran parte de la población encuestada usa la representación de “Material de Laboratorio” para expresar lo que es química; esto sugiere que para la mayoría esta ciencia está relacionada principalmente con lo que se desarrolla en los laboratorios. La categoría “Lenguaje Químico” es importante en la medida que muestra que los jóvenes tienen presente que esta ciencia maneja un lenguaje particular y propio; de acuerdo con el análisis estadístico aplicado se encuentra además que los estudiantes que relacionan las muestras gráficas de “Material de Laboratorio” lo hacen de manera conjunta con “Lenguaje Químico”. Es notable

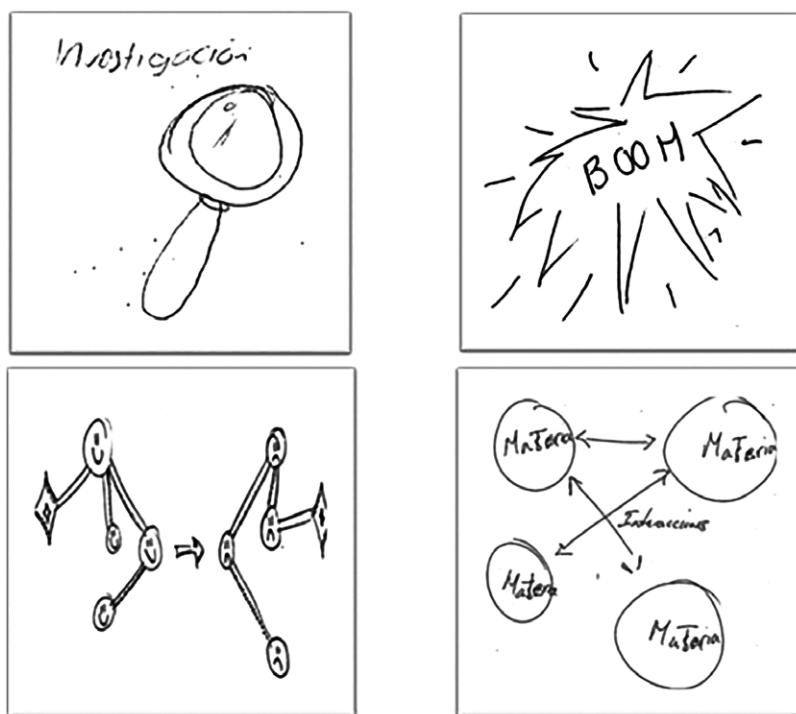


Figura 6. Ejemplos de representaciones de la categoría íconos/iconemas

Tabla 1. Nombre de las categorías de acuerdo con el número de correspondencia.

Categoría	Nombre
1	Naturaleza
2	Lenguaje químico
3	Cuerpo Humano
4	Construcciones Ingenieriles
5	Material de laboratorio
6	Iconemas e iconos

la baja referencia a la categoría “Naturaleza”, esto puede estar relacionado con la exclusión de las correlaciones entre la química y el entorno que usualmente se hacen al aplicar metodologías de enseñanza tradicionales, sin el uso de salidas de campo o ejercicios de contexto, entre otros. La categoría “Cuerpo Humano” es la más baja, lo que muestra que el ser humano también está excluido de la consideración del área de la química. La Figura 8 muestra algunos ejemplos de expresiones gráficas que incluyeron personas. Nótese que las personas son, en la mayoría de los casos, experimentadores y no están presentes como parte de la acción de la disciplina. Son individuos analizando un entorno lejano encasillado en los laboratorios. Al parecer, el científico conocedor no tiene relación con la naturaleza, con la sociedad o con él mismo. Según los indicadores manejados por otros estudios (6), los dos ejemplos que se muestran en la Figura 8 incluyen varios de los elementos encontrados en las repre-

sentaciones más elaboradas de un científico (blusa de laboratorio, gafas, cabello despeinado, símbolos de investigación y expresiones relevantes).

La Figura 9 relaciona la preponderancia de las categorías en relación a la edad para esta muestra. Los números del 1 al 6 en esta gráfica se refieren a las categorías de la Tabla 1. Es notable que la categoría 1 “Naturaleza”, pierde importancia a medida que aumenta la Edad. La representación de cuerpo humano es baja en todas las edades.

Al observar los resultados de las categorías 2 y 6 (“Lenguaje Químico” e “Iconos/Iconemas” respectivamente), según las edades, se pueden plantear algunas asociaciones de estos tipos de representaciones con la capacidad de abstracción y la percepción del mundo desde lo sensorial y difícilmente descriptible; esto es, a mayor grado de complejidad en el desarrollo del área, se plantea un mayor uso de diferentes recursos. En otro estudio (21) se mencionan problemas encontrados en la diferenciación

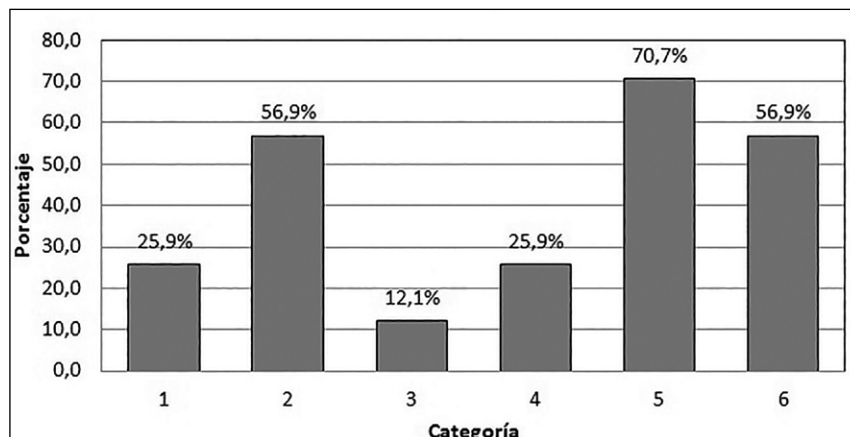


Figura 7. Porcentaje de jóvenes con expresiones en cada categoría de la Tabla 1.



Figura 8. Ejemplos de expresiones gráficas con personas (Categoría 3).

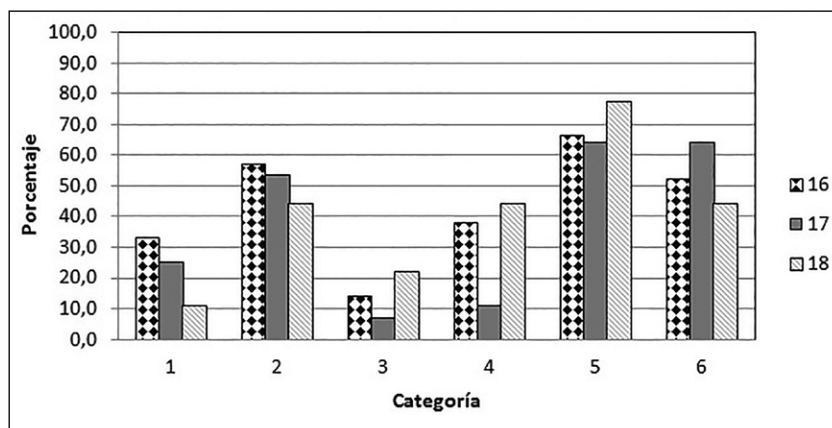


Figura 9. Porcentaje por categoría de la Tabla 1 con relación a las edades de estudio consideradas en la muestra.

de hechos observables e inferencias, en la identificación de argumentos significativos y en la elaboración de argumentos coherentes. También se encuentran graves dificultades en el manejo de la terminología científica porque muchas veces no se distingue entre los términos de uso científico y los de uso común y se utilizan palabras propias del lenguaje coloquial. La complejidad que representa la apropiación del léxico de la química hace que los jóvenes, al sentir inseguridad sobre su capacidad de razonar, expresen mejor sus sensaciones o sus ideas pseudo-estructuradas, haciendo uso frecuente de lo que recuerdan de un lenguaje que no terminan de comprender. Se observa en el presente trabajo que cuanto más complejo se percibe el conocimiento de la disciplina o área del conocimiento, más compleja es la respuesta sensorial del estudiante con la que se trata de describir la química. Se encuentran entonces, con mucha frecuencia, no solo nociones sobre el lenguaje de la química sin

precisión, sino también las representaciones de lo que se siente cuando se piensa en ella.

Al comparar la predominancia de las categorías, separando la población según el género (hombre o mujer) para este estudio (Figura 10, los números del 1 al 6 en esta gráfica se refieren a las categorías de la Tabla 1), no se observan diferencias notables. Se nota que algunas mujeres recurren a elementos de la “Naturaleza”, al uso del “Lenguaje Químico” y al “Material de Laboratorio” y es menos frecuente la utilización de “Iconos/Iconemas”, sin que se puedan establecer diferencias significativas con respecto a los hombres, debido al tamaño de la muestra.

Cuando se analiza la Orientación Vocacional (Tabla 2 y Figura 11) se distinguen dos tendencias interesantes: los hombres tienen marcada preferencia por las ingenierías y afines, y las mujeres se identifican más con profesiones del área de la salud (nutrición, enfermería, odontología)

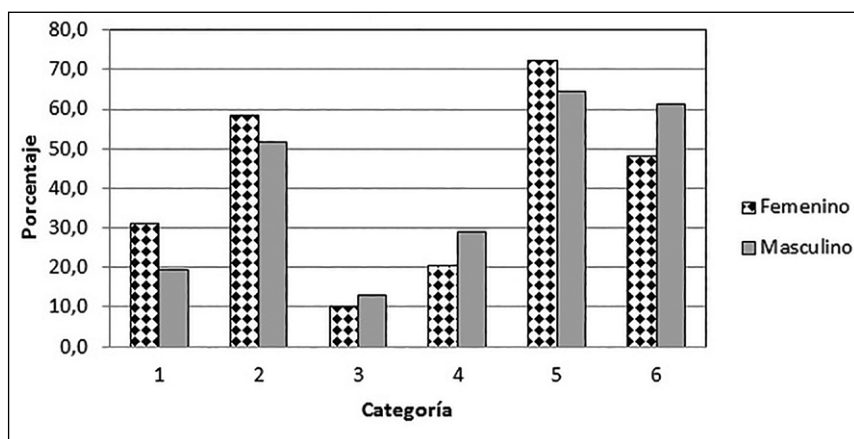


Figura 10. Porcentaje en cada categoría de la Tabla 1, con relación al Género.

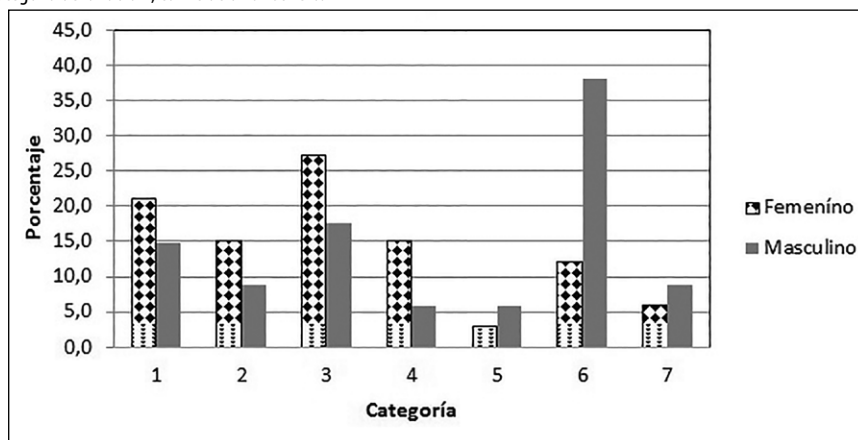


Figura 11. Porcentaje del número de resultados por Orientación Vocacional en relación al Género, en cada categoría de la Tabla 1.

Tabla 2. Orientación vocacional de acuerdo con el número de correspondencia.

Categoría	Nombre
1	Áreas Administrativas
2	Artes
3	Ciencias de la Salud
4	Ciencias Humanas
5	Ciencias
6	Ingeniería y afines
7	No Saben

e incluso, con ciencias sociales, artes y con áreas relacionadas con administración. Esto corrobora la existencia de una tendencia mas o menos definida debida al rol social aprendido y, seguramente, por otros factores influyentes como los medios de comunicación, los arquetipos de comportamiento y acción, etc. Lo anterior, ha sido reportado en otros estudios (22) y ha sido discutido a profundidad en los estudios sociales de la ciencia (23).

El área de las ciencias no es elegida en gran porcentaje, lo que muestra que si estos estudiantes se encuentran en cursos nivelatorios de ciencias y matemáticas, lo hacen por necesidad y no porque tengan un especial gusto o curiosidad por su estudio. Cierta porcentaje no se ha definido aún por alguna carrera en particular.

La utilidad del círculo de correlaciones (Figura 12) es que permite observar la dirección y la proximidad entre las variables, así se obtiene una idea de lo que está midiendo cada una, y a su vez se tiene una idea de cuales variables están correlacionadas entre sí. Se observa que la variable Género al encontrarse en el centro del gráfico es poco representativa

para el estudio; no está correlacionada con las otras variables, es decir, no se pueden hacer conclusiones sobre el Género y el resto de variables. El círculo de correlaciones indica que no hay una relación entre el Género y la categoría, por ejemplo, “*elementos de la naturaleza*”, es decir, las mujeres no recurren a los elementos de la naturaleza con mayor frecuencia que los hombres. La Tabla 3 muestra algunas correlaciones relevantes de acuerdo con el círculo.

En el círculo se observa que las variables Edad y “*Construcciones Ingenieriles*” están correlacionadas por la proximidad que hay entre ellas y porque apuntan en la misma dirección. En este caso se pueden inferir correlaciones a partir del gráfico de frecuencias, ya que hay suficiente evidencia estadística que soporta la relación entre estas variables. Puede deducirse que a medida que aumenta la Edad en esta muestra, la percepción que las personas tienen de la química a través de elementos de la categoría “*Construcciones Ingenieriles*” disminuye.

Las variables “*Material de Laboratorio*” y “*Lenguaje Químico*” parecen estar correlacionadas, esto puede deberse a que son conceptos que

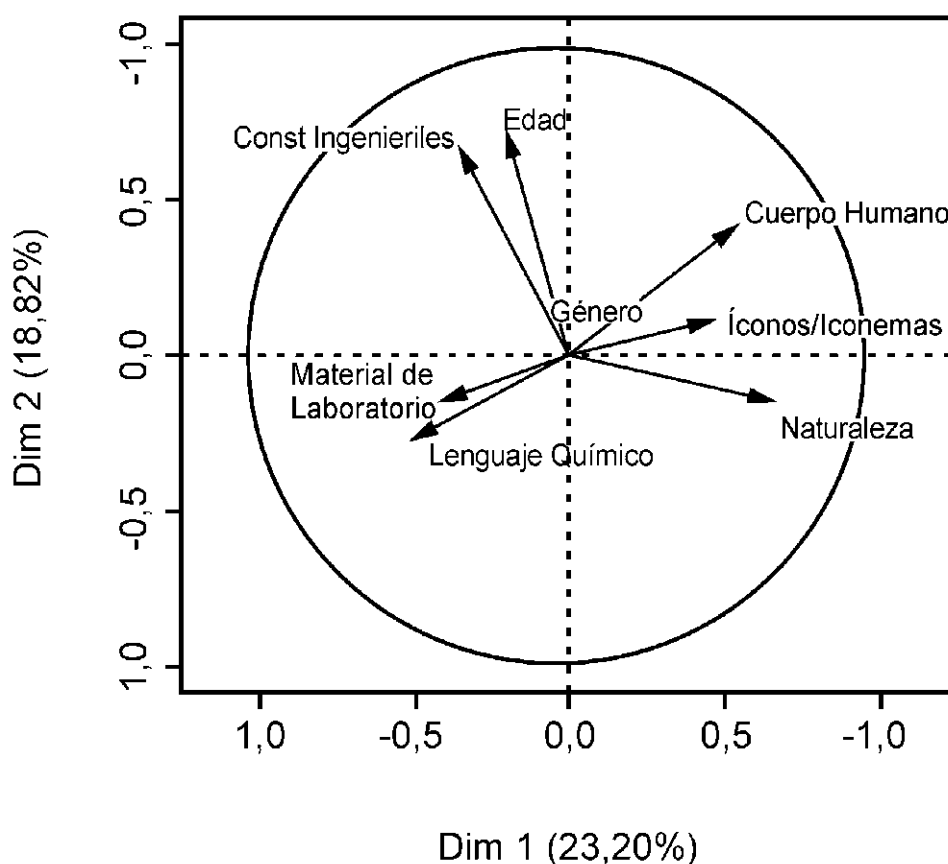


Figura 12. Círculo de correlaciones entre las variables de estudio.

Tabla 3. Prueba Chi- cuadrado para las correlaciones más relevantes de acuerdo con el círculo de correlación.

Hipótesis nula: Las variables son independientes			
Variables		P-valor	alfa=0.05
Laboratorio	Lenguaje Químico	0,0341	Se rechaza la hipótesis nula
Edad	Construcciones Ingenieriles	0,028	Se rechaza la hipótesis nula
Naturaleza	Iconos/Iconemas	0,5805	No se rechaza la hipótesis nula

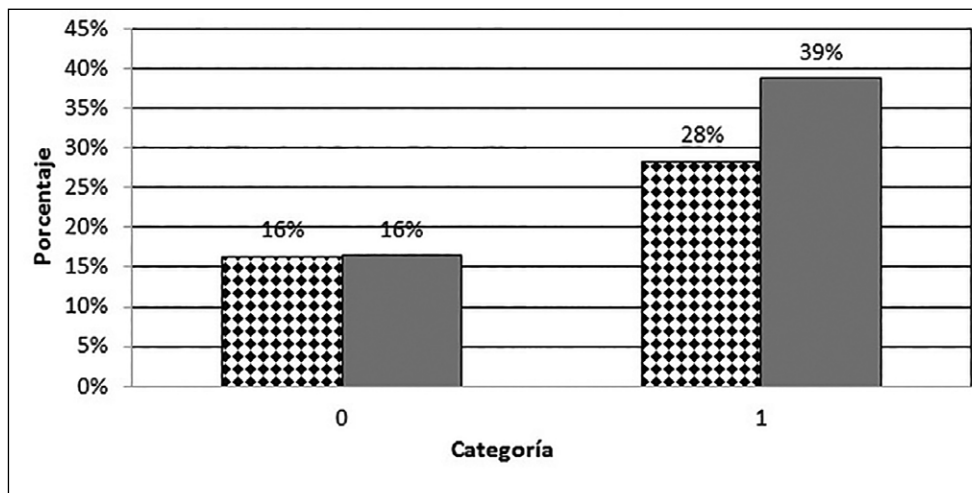


Figura 13. Relación entre la frecuencia de aparición de “Material de Laboratorio” y “Lenguaje químico”.

se asocian fácilmente. En la Figura 13 se evidencia que los jóvenes que representan la química a través de elementos de laboratorio también emplean elementos asociados al lenguaje químico.

Las variables “Cuerpo Humano”, “Iconos/Iconemas” y “Naturaleza” no están correlacionadas en el círculo, además no apuntan en la misma dirección, de modo que se puede suponer que estas variables pueden estar midiendo percepciones diferentes no asociadas entre sí.

Para las variables “Laboratorio” y “Lenguaje Químico” se rechazó la hipótesis nula, es decir, que definitivamente las personas de la muestra de trabajo que asocian la química con elementos de laboratorio, también la relacionan con fórmulas.

Al realizar todas las posibles pruebas se encontró que “Naturaleza”, “Personas” e “Iconos/Iconemas” no se relacionan entre sí, ni con ninguna de las demás variables. Por ejemplo, se observa que entre “Naturaleza” e “Iconos/Iconemas” las personas que no dibujan elementos correspondientes a la categoría “Naturaleza” tienen casi la misma proporción de dibujar o no dibujar “Iconos/Iconemas”, al igual que las personas que dibujan elementos representativos de esta.

En cuanto a las categorías de “Material de Laboratorio” y “Lenguaje Químico” se encontró que no hay una correlación con la variable de Edad, así como tampoco se encuentra en ninguna otra categoría, exceptuando la de “Construcciones Ingenieriles”.

Conclusiones

La química es, para los jóvenes de este estudio, una disciplina alejada de sus contextos urbanos, que poco se relaciona con sus espacios cotidianos (donde normalmente se desarrolla el individuo y se conecta con el mundo) y con la naturaleza. No aparece con recurrencia el ser humano, y cuando este se dibuja, es un manipulador en los espacios asociados a la química, pero no forma parte de su estudio. Además, las personas que trabajan en química se muestran como personajes muy elaborados, con características especiales y poco comunes. El lenguaje químico es percibido como un elemento importante, pero cuando se recurre a él para mostrar lo que es la química, se notan nociones vagas o incorrectas; además de encontrarse con recurrencia que se relaciona con el trabajo de experimentación. Las categorías “Cuerpo humano”, “Iconos/Iconemas” y “Naturaleza” actúan como complementos a la definición de la química desde las expresiones gráficas de los estudiantes. Del mismo modo, la categoría “Iconos/Iconemas” permite observar desde artefactos con implicaciones muy concretas en la definición del estudiante cuando desea expresar lo que cree que es la disciplina, hasta artefactos con im-

plicaciones muy abstractas, que permiten relacionar que este recurre a las sensaciones y sentimientos que esta le genera. Adicionalmente, se observa que puede haber ciertas tendencias en la escogencia de las carreras asociadas al sexo y a roles sociales.

Referencias

- Galagovsky, L.; Adúriz-Bravo, A. Problemas con el lenguaje científico en la escuela. Un análisis desde la observación de clases de ciencias naturales. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **1998**, *16*(2), 315-321.
- Meinardi, E.; Adúriz-Bravo, A.; Morales, L., & Bonán, L. El modelo de ciencia escolar. Una propuesta de la didáctica de las ciencias naturales para articular la normativa educacional y la realidad del aula. *Rev. enseñ. fis.* **2002**, *15*(1), 13-21.
- Olivera, A.; Mazzitelli, C.; Guirad, A. El conocimiento construido por los alumnos en las clases de Química. *Rev. electrón. enseñ. cienc.* **2015**, *14*(1), 77-94.
- Galagovsky, L.; Adúriz-Bravo, A. Modelos y analogías en la enseñanza de las ciencias naturales—El concepto de modelo didáctico analógico. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **2001**, *19*(2), 231-242.
- Galagovsky, L.; Di Giacomo, M.; Castelo, V. Modelos vs. dibujos: el caso de la enseñanza de las fuerzas intermoleculares. *Rev. electrón. enseñ. cienc.* **2009**, *8*(1), 1-21.
- Chambers, D. Stereotypic images of the scientist: The draw-a-scientist test. *Sci. Educ.* **1983**, *67*(2), 255-265. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/sce.3730670213>.
- Rodríguez Sala de Gomezgil, M. Mexican adolescents' image of the scientist. *Soc. Stud. Sci.* **1975**, *5*(3), 355-361.
- Fariás, D.; Castelló, J.; Molina, M. Análisis del enfoque de historia y filosofía de la ciencia en libros de texto de química: el caso de la estructura atómica. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **2013**, *31*(1), 115-133.
- Perales- Palacios, F.; Vilchez-González, J. Iniciación a la investigación educativa con estudiantes de secundaria: el papel de las ilustraciones en los libros de texto de ciencias. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **2015**, *33*(1), 243-262.
- Islas, S.; Guridi, V. M. El quehacer científico versus el saber aúlico. *Investigación didáctica.* **1999**, *17*(2), 281-290.
- Dimopoulos, K.; Koulaidis, V.; Sklaveniti, S. Towards an analysis of visual images in school science textbooks and press articles about science and technology. *Res Sci Educ.* **2003**, *33*(2), 189-216.

12. Vetleseter, M.; Schreiner, C.; Henriksen, K. Review on theoretical perspectives for understanding young people's educational choices. Oslo: University of Oslo, 2010.
13. Lacolla, L.; Meneses V. J.; Valeiras, N. Reacciones químicas y representaciones sociales de los estudiantes. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **2014**, 32(2), 89-109.
14. Warfa, A.; Roehrig, G.; Scheneider, J.; Nyachwaya, J. Role of teacher-initiated discourses in student's development of representational fluency in chemistry: A case study. *J. Chem. Educ.* **2014**, 91(6), 784-792.
15. Oliviera, A. del C.; Mazzitelli, C.A.; Guirado, A.M. El conocimiento construido por los alumnos en las clases de química. *Rev. electrón. enseñ. cienc.* **2015**, 14(1), 77-94.
16. Compiani, M. Ideas previas y construcción de conocimiento en aula. *Enseñ. cienc. tierra.* **1998**, 6(2), 145-153.
17. Talanquer, V. El papel de las ideas previas en el aprendizaje de la química. *Alambique.* **2011**, 17(69), 35-41.
18. Pintó, R.; Aliberas i Maymí, J.; Gómez- Carrillo, R. Tres enfoques de la investigación sobre concepciones alternativas. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **1996**, 14, 221-232.
19. Campanario, J. M.; Otero, J. C. Más allá de las ideas previas como dificultades de aprendizaje. *Enseñ. Cienc. Rev. Invest. Exp. Didact.* **2000**, 18, 155-169.
20. Española, R. A. (2014). *Diccionario de la Lengua Española*. 23^a edición. Barcelona: España Libros. Disponible en: <http://lema.rae.es/drae/?val=naturaleza>. [Consultado el 21 de enero de 2015].
21. Caamaño, A.; Irazoque, G. La enseñanza y el aprendizaje de la terminología química: magnitudes y símbolos. *Educ. Quím.* **2009**, 3, 46-55.
22. Polino, C.; Chiappe, D. *Percepción de los jóvenes sobre la ciencia y la profesión científica*. Centro de Altos Estudios Universitarios-Organización de Estados Americanos-Observatorio de la Ciencia, La Tecnología y la Innovación: Buenos Aires, 2009.
23. Harding, S. *Ciencia y Feminismo*. Ediciones Morata, S.L.: Madrid, 1996.

Article citation:

Ruíz, D.; Palomeque, L. Una metodología para el estudio de las ideas previas sobre química a través del análisis de expresiones gráficas. *Rev. Colomb. Quím.* **2015**, 44(1), 36-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54044>

Descripción

La Revista Colombiana de Química (Rev. Colomb. Quim., versión online ISSN 2357-3791, versión impresa ISSN 0120-2804) es una publicación científica arbitrada, del Departamento de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Desde su lanzamiento en 1971, y hasta 1980, la Revista Colombiana de Química publicó un volumen por año y su periodicidad cambió a uno o dos volúmenes por año desde 1981 hasta 2006. A partir de 2007 y hasta la fecha publica tres volúmenes por año. Todos sus volúmenes se encuentran disponibles online en el sitio web <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>.

La Revista Colombiana de Química se encuentra indexada en las bases de datos SCOPUS, PUBLINDEX, DOAJ, SCIELO, LATINDEX Y REDALYC. Esta publicación cuenta con un Comité Científico y Editorial compuesto por investigadores de reconocida trayectoria en sus áreas de especialidad y acepta contribuciones relevantes en las diversas áreas de la química tales como química analítica, bioquímica, orgánica, fisicoquímica, alimentos, inorgánica, ciencias de materiales, organometálica, enseñanza de la química, entre otras. El público objetivo son profesionales relacionados con cualquier área de la química.

Tipos de artículos

Artículos de investigación

Son artículos que presentan resultados de investigación que no han sido publicados previamente. Los autores deben resaltar la contribución de su trabajo al conocimiento. Se sugiere un máximo de 40 referencias.

Artículos de revisión

Serán solicitados por invitación del Comité Editorial, teniendo en cuenta la experiencia de los autores en un determinado tema. Son artículos que presentan el estado actual del conocimiento sobre un tema. En este tipo de artículos, el autor además de efectuar la revisión, debe establecer su aporte y criterio propios. Debe presentar más de 50 referencias, preferiblemente de los últimos 5 años.

Ética

En la Revista Colombiana de Química se toma como código de conducta ética el propuesto por el Comité de Ética de Publicaciones (COPE): <http://publicationethics.org/> para editores de revistas científicas. En este se sancionan el plagio y la autoría fantasma, la duplicación de resultados o cualquier otro tipo de modificación fraudulenta. De igual modo se promueve y aplica un sistema de evaluación por pares donde se garantiza el anonimato de autores y evaluadores.

Conflicto de intereses

La revista define un conflicto de interés como cualquier asunto que interfiera en: la presentación completa y objetiva, la revisión por pares, la toma de decisiones editoriales, o la publicación de artículos de investigación presentados a la revista. El conflicto de intereses puede ser de naturaleza financiera y no financiera, profesional o personal, y puede surgir en relación a una organización u otra persona.

Envío y esquema de revisión general

Los manuscritos enviados a la Revista Colombiana de Química para su posible publicación deben ser inéditos (**no sometidos al mismo tiempo a ninguna otra revista impresa o digital**). Los autores son responsables por las opiniones e ideas declaradas en el manuscrito. La precisión de la información en los manuscritos, incluyendo figuras y tablas, es responsabilidad completa del autor o de los autores.

Los manuscritos serán recibidos para su evaluación vía correo electrónico (rcolquim_fcbog@unal.edu.co) o a través de la plataforma en línea de la Revista (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>).

Requisitos generales de envío

1. Para los envíos a través del portal en línea, el autor debe estar registrado en el portal, de no ser el caso debe registrarse siguiendo los pasos necesarios. Antes de comenzar, es importante que compruebe que su envío cumple escrupulosamente todos los requisitos solicitados por la revista (Ver sección Preparación para el envío online).
2. La versión del documento en línea no debe incluir resumen ni datos de autores, estos se incluyen en los metadatos, es decir, en el formulario de envío. Por el contrario, si el artículo es enviado por correo electrónico debe contener todos los datos que se especifican en la sección Formato.
3. Para las dos formas de envío deben adjuntarse una carta de presentación del artículo, donde se incluyan los aspectos más relevantes del artículo, una lista de tres posibles evaluadores con sus respectivos datos de contacto y firma de todos los autores.
4. Las fotos, diagramas, mapas y gráficas se enumeran como figuras. Las fotos y mapas deben adjuntarse en un archivo aparte, en formato tiff o jpg al tamaño en que van a salir, con 300 dpi de resolución, y en escala de grises o en blanco y negro. En caso de que tengan 4 o más items, se debe cambiar la escala de grises por diferentes tramas. No se deben insertar en Word ya que pierden la resolución, y en el programa de diseño van a salir pixeladas. Si las gráficas corresponden a archivos trabajados en Excel o Word se deben enviar en dichos programas, pero abiertas, no como imagen para que se puedan editar.

Esquema de Revisión

- Después de recibir el artículo y verificar que cumpla con el formato establecido en esta guía, se envía a revisión por pares según el tema tratado.
- Después de recibir las evaluaciones, se envía la decisión del Comité Editorial al autor de correspondencia:
- **Aceptado con cambios mínimos:** Los autores deben enviar una nueva versión a la revista. Una vez el editor verifica que los cambios fueron realizados (los autores deben enviar una lista detallada con los cambios realizados o el porqué de los cambios no realizados), el artículo es aceptado.
 - **Cambios mayores:** Los autores deben enviar una nueva versión a la revista, la cual será sometida a evaluación corta (los autores deben enviar una lista detallada con los cambios realizados o el porqué de los cambios no realizados).
 - **Rechazado:** Los autores deciden si someten una nueva versión a la revista, la cual será tratada como un artículo nuevo.
- Si el artículo es aceptado aparecerá inicialmente en formato preimpresión en la página Web de la revista (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>). Posteriormente se reemplazará por la versión diagramada. Finalmente, la versión impresa será distribuida.

Formato

El documento se debe presentar en archivo Word .doc o .docx, tamaño carta, interlineado 1,5, con márgenes superior e inferior de 2,5 cm y 3,0 cm en los lados, con letra Times New Roman 12, páginas numeradas de inicio a fin, y numerando cada una de las líneas en consecutivo. Se deben usar los títulos: RESUMEN, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN, CONCLUSIONES, AGRADECIMIENTOS y REFERENCIAS. Los autores pueden decidir presentar los resultados y la discusión en una sola sección.

Idioma

Los manuscritos se aceptan en español, inglés o portugués, sin embargo, siempre **el título, resumen y palabras claves deben presentarse en los tres idiomas**. Como estrategia para aumentar la difusión y visibilidad de los resultados se sugiere presentar los manuscritos en inglés.

Página inicial

Título

El título debe ir en minúscula, a menos que la mayúscula sea mandatoria. Debe ser conciso pero informativo y no debe exceder 120 caracteres incluyendo los espacios. Debe aparecer siempre en español, inglés y portugués. Por ejemplo:

- Oxidación catalítica de tolueno y 2-propanol sobre óxidos mixtos de Mn y Co obtenidos por coprecipitación.
- Catalytic oxidation of toluene and 2-propanol over Mn and Co mixed oxides obtained by coprecipitation method.
- A oxidação catalítica de tolueno e 2-propanol em óxidos mistos de Mn e de Co, obtidos por coprecipitação.

Autor(es) y filiación

- Nombres y apellidos completos.
- Último título profesional.
- Institución en la cual trabaja.
- País y ciudad de residencia.
- Correo electrónico (de cada autor).

En los datos de filiación se debe conservar el orden categórico: Laboratorio, instituto, universidad, ciudad, estado, país, e-mail. Cada filiación debe ser enlistada con números en superíndice y referenciada a cada autor. El autor de correspondencia debe ir denotado con asterisco. Por ejemplo:

Mauricio Acelas¹, Elizabeth Gil², Markus Doerr³, Martha Daza³, Juan Manuel Urbina^{1*}

¹ Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular–LQOBio, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

² Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82, Bogotá D.C., Colombia.

³ Grupo de Bioquímica Teórica–GBQT, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

* **Autor para correspondencia:** jurbina@uis.edu.co

Cuerpo del artículo

Todo el texto debe venir justificado (alineado a izquierda y derecha), con las páginas y líneas numeradas continuamente. Todos los títulos y subtítulos primarios y secundarios deben ir justificados a la izquierda. Los títulos (**RESUMEN, PALABRAS CLAVE, INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN, AGRADECIMIENTOS, CONCLUSIONES Y REFERENCIAS**) deben ir con mayúscula sostenida y en negrilla. Los **subtítulos primarios** en minúsculas sostenida y en negrilla. Los *subtítulos secundarios* con minúscula sostenida y en cursiva. Siempre se deben definir los términos estadísticos, abreviaturas y los símbolos la primera vez que se usan en el artículo. Para las unidades de medida se debe usar el sistema métrico internacional. Cuando no van seguidos de unidades, los números enteros hasta diez se escriben con la palabra (uno, dos, diez) y mayores de diez con números (11, 12, 102). Cuando se utilicen números, estos deben ir seguidos de sus unidades y se mantendrá un espacio entre uno y otro (100 m, 50 mL). Si se trata de porcentaje

no deje espacio entre el número y la unidad (80%). En manuscritos escritos en español las cifras decimales irán separadas por coma (,) y en inglés por punto (.). Cite cada figura y tabla en el texto de acuerdo al orden de aparición y en el siguiente formato: Figura 1 o Figuras 1 y 2 o Figuras 1A-1F o Tabla 1.

Resumen

Resumen de máximo 200 palabras. Se sugiere poner una frase introductoria. Deben mencionarse los propósitos de la investigación, los resultados relevantes (proporcionando datos específicos y, de ser posible, su significación estadística), y las conclusiones principales sin incluir citas bibliográficas. Se debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio. Debe evitar presentarse un resumen descriptivo (aquel donde no se presentan datos), en cambio, debe presentarse un resumen analítico (aquel en donde se presentan los datos relevantes obtenidos en la investigación). Debe aparecer siempre en español, inglés y portugués.

Palabras clave

Deben listarse de 3 a 6 palabras claves. No se deben emplear las palabras ya usadas en el título del manuscrito. Deben aparecer siempre en español, inglés y portugués.

Introducción

Deben presentarse los fundamentos lógicos para la realización del trabajo. Solo se dan las referencias estrictamente oportunas y no se deben incluir datos o conclusiones del trabajo que se está publicando. Al final de la introducción, debe presentarse el objetivo del trabajo.

Materiales y métodos

En una subsección deben listarse los reactivos utilizados, la marca y el país. Se deben usar subtítulos en los procedimientos utilizados. Los procedimientos deben tener el detalle suficiente para permitir a otros profesionales reproducir la investigación. Se deben incluir los equipos empleados, incluyendo nombre del fabricante y país, además de las referencias de la metodología y métodos estadísticos. Deben describirse los métodos nuevos o los que han sido sustancialmente modificados, sustentando las razones para utilizarlos y evaluando sus limitaciones.

Los autores que envíen artículos de revisión, deberán describir los métodos empleados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar la información. Siempre que se hagan pruebas estadísticas, debe usarse un subtítulo "Análisis estadístico" para su descripción.

Resultados

Deben presentarse en un orden lógico y concordante con el orden de los métodos. Se deben destacar los resultados que contribuyen a la generación de nuevo conocimiento. La información contenida en tablas no debe repetirse en figuras y viceversa.

Discusión

Deben destacarse los aspectos nuevos y relevantes del estudio, y evitar repetir información ya facilitada en las secciones INTRODUCCIÓN o

RESULTADOS. Se recomienda evaluar posibles relaciones entre los resultados obtenidos, juzgar los resultados en relación con los obtenidos por otros autores, y proponer hipótesis que expliquen los datos obtenidos. Entre las secciones de Resultados y Discusión debe haber una extensión mínima de tres páginas a doble espacio.

Conclusiones

Debe aparecer mínimo un párrafo con las conclusiones, vinculado a los objetivos del estudio, evitando enumerarlas o presentarlas como frases sueltas. Se deben realizar afirmaciones plenamente respaldadas por los datos.

Agradecimientos

Deben mencionarse las fuentes de financiación de los proyectos de investigación y/o apoyos recibidos para la realización del estudio (becas, equipos, reactivos, entre otros). Pueden nombrarse a aquellas personas que hayan prestado su ayuda intelectual al trabajo, pero cuyas contribuciones no justifiquen la autoría, describiendo la contribución llevada a cabo, por ejemplo, "apoyo técnico", "revisión crítica del escrito", "recolección de muestras".

Referencias

El formato está basado en la guía de estilos de la American Chemical Society (ACS).

Referencias en texto: Todas las citas que aparecen en el texto deben coincidir con las presentadas en la sección REFERENCIAS, y viceversa.

Debe evitarse citar como bibliografía:

- Los resúmenes presentados en congresos u otras reuniones.
- Comunicaciones personales.
- Datos no publicados. La citación de un artículo "en prensa" supone que el artículo ya fue aceptado para publicación.

Las citas deben realizarse con números itálicos en paréntesis en la línea del texto, y dentro de la puntuación. Por ejemplo:

- Las condiciones de extracción se encuentran reportadas en otros estudios (1).

Las citas se deben escribir con números naturales acorde a su orden de aparición. Si dentro de la redacción del texto se debe mencionar el autor, entonces la citación debe ser:

- Un autor: Duque (2)
- Dos autores: Duque y Palomeque (3)
- Más de dos autores: Duque *et al.* (4)

Formato de referencias: Las referencias deben ser organizadas en el mismo orden numérico en el que fueron presentadas a lo largo del texto.

Revistas

Se debe anotar el apellido y las iniciales del nombre de todos los autores. Apellidos se separan de las iniciales del nombre con coma. Las iniciales de los nombres de autores se acompañan con punto. Los au-

tores se separan con punto y coma. Luego se escribe el título. El nombre abreviado de la revista en cursiva, de acuerdo al Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI, <http://cassi.cas.org/search.jsp>). El año en negrilla, el volumen en itálica y las páginas (separadas por guión). De igual manera, si el artículo cuenta con DOI es necesario incluirlo al final de la referencia.

- Hasta seis autores: se incluyen todos los autores.

Da Silva, R.; Nissim, I.; Brosnan, M.; Brosnan, J. Creatine synthesis: Hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, 296, 256-261. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90547.2008>.

- Más de seis autores: incluir hasta los seis primeros autores y a continuación escribir *et al.*

Libros y otras monografías

- Libros sin editores

Stout, J.; Antonio, J.; Kalman, D. *Essentials of creatine in sports and health*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2008; pp 30-40. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-573-2>.

Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green chemistry: Theory and practice*; Oxford University Press: Oxford, 1998. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-1996-0626>.

- Capítulo en libro editado

McBrien, M. Selecting the Correct pH Value for HPLC. In *HPLC made to measure: A practical handbook for optimization*; Kromidas, S., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; pp 89-103.

Tesis doctoral (o similar)

- Impreso

King, K. J. Development of a pressurized system for oxidation studies of volatile fluids. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, State College, PA, March 1983.

- Electrónico

Abrams, N. M. Efficiency enhancement in dye-sensitized solar cells through light manipulation. Ph.D. Dissertation [Online], The Pennsylvania State University, University Park, PA, December 2005. <http://etda.libraries.psu.edu/theses/approved/WorldWideIndex/ETD-1061/index.html> (consultado el 2 de abril de 2014).

Sitios Web

Penn State Department of Chemistry. <http://www.chem.psu.edu/> (consultado el 7 de junio de 2014).

Mallet Chemistry Library, University of Texas Libraries. ThermoDex home page: An index of selected thermodynamic and physical property resources. <http://www.lib.utexas.edu/thermindex/> (consultado el 19 de marzo de 2014).

En prensa

Kaufhold, S.; Petermann, L.; Staehle, R.; Rau, S. Transition metal complexes with N-heterocyclic carbene ligands: From organometallic hydrogenation reactions towards water splitting. *Coord. Chem. Rev.* En prensa.

Tablas y figuras

Las fotos, diagramas, mapas y gráficas se clasifican como figuras. Deben usarse figuras como alternativa a las tablas; evite redundancia entre tablas, figuras y texto.

Las figuras con sus leyendas deben enviarse individualmente en formato .TIFF, de excelente calidad, con una resolución mínima de 300 dpi y con uno de dos tamaños (9 cm de ancho, que es una columna, o 20 cm que cubre las dos columnas). La impresión a color no genera costos adicionales para los autores, sin embargo, representa un mayor costo para la revista. Teniendo esto en cuenta, se debe utilizar escala de grises o tramas siempre que sea posible. Deben usarse colores cuando sea estrictamente necesario. Figuras que hayan sido creadas en Excel o Word deben ser enviadas en esos programas.

Las tablas deben estar en el cuerpo del artículo al final del documento. Tanto las tablas como las figuras deben ser autocontenidas (poder interpretarse sin necesidad de recurrir al cuerpo del artículo). En la leyenda de la figura, o en el título o pie de la tabla, deben describirse las claves, abreviaturas y demás explicaciones. Se recomienda proporcionar además de los promedios, las desviaciones estándar y demás información estadística relevante a los datos.

La rotulación de cada tabla debe ir a la cabeza de la misma, mientras que en las figuras debe presentarse al pie. Evite figuras pequeñas aisladas: agrupe figuras con información relacionada en figuras compuestas rotuladas con letras (Figura 1a, Figura 3b, etc.). Si un artículo contiene tablas o figuras reproducidas (así sean del mismo autor), es obligación declarar el origen y presentar permiso para utilizarlas. Es responsabilidad de los autores conseguir el correspondiente permiso. Si tiene dudas al respecto, por favor comunicarse con la revista vía correo electrónico (rcoquim_fcbog@unal.edu.co) o por teléfono (+571 3165000 Ext. 14458).

Preparación para el envío online

Antes de realizar el envío de su manuscrito ya sea por el Portal o por correo electrónico, verifique que cumple con las siguientes condiciones:

- Presenta un título en los 3 idiomas solicitados.
- Proporciona nombres y apellidos completos de los autores (e indica quién es el autor de correspondencia), y de cada autor se menciona:
 - Institución en la cual trabaja.
 - País y ciudad de residencia.
 - Correo electrónico.
- Presenta un resumen analítico, de máximo 200 palabras, en los 3 idiomas solicitados.
- Presenta palabras clave, en los 3 idiomas solicitados.
- El cuerpo del artículo se encuentra en el formato solicitado.
- Las referencias citadas en el cuerpo del artículo aparecen en la sección REFERENCIAS, y viceversa.

- El formato de las referencias sigue las indicaciones estipuladas en esta guía.
- En las referencias se menciona el DOI de los artículos, si es el caso.
- Las figuras están en formato .TIFF con resolución mayor a 300 dpi en archivos diferentes al cuerpo del documento. Si las figuras fueron creadas en Word o Excel
- entonces se envían en ese formato. Las tablas van al final del documento.
- Adjunta la carta de presentación del artículo en el formato dispuesto para tal fin. (formato disponible en revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim)

Manuscrito aceptado para publicación

Si el Editor le ha notificado que su manuscrito podría ser aceptado para publicación en caso de tener en cuenta las modificaciones sugeridas por los revisores, envíe la nueva versión del artículo acompañada de una carta donde detalle cada uno de los comentarios de los revisores, y justifique en caso de que no tenga en cuenta alguna de las sugerencias. Trabaje la nueva versión del artículo con control de cambios o resalte los cambios en esta nueva versión, para que el Editor pueda identificarlos con facilidad.

Una vez haya finalizado el proceso de revisión por pares, el Editor enviará un correo electrónico al(os) autor(es) del manuscrito manifes-

tando la decisión del Comité Editorial. Si el manuscrito ha sido aceptado para publicación, se adjuntarán al correo las sugerencias, indicaciones y comentarios que cada evaluador efectuó sobre los aspectos de fondo y de forma del artículo. Para continuar con el proceso de publicación el(los) autor(es) deben enviar los siguientes archivos al correo de la revista (rcolquim_fcbog@unal.edu.co):

- La nueva versión del documento en donde se trabaje con control de cambios o se resalten las modificaciones trabajadas.
- Una carta en la que se detallen cada uno de los comentarios de los revisores, justificando aquellos casos en los que no se siguió una determinada indicación o sugerencia.
- Las imágenes que se hayan modificado en virtud de los comentarios de los revisores y las necesidades de la nueva versión. Las imágenes deben estar en formato .TIFF con una resolución mayor a 300 dpi.

Costo de la publicación

La publicación de un artículo, con una extensión no mayor a 3 páginas impresas de la revista, tendrá un costo de \$30.000 pesos colombianos. Las páginas adicionales tendrán un costo de \$20.000 pesos colombianos cada una.

Description

Revista Colombiana de Química (Rev. Colomb. Quim. Online version ISSN 2357-3791, printed version ISSN 0120-2804) is a peer-reviewed scientific journal from the Department of Chemistry, Faculty of Sciences of Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Since its launch in 1971 and until 1980 Revista Colombiana de Química published a volume per year, and its frequency changed to one or two volumes per year from 1981 to 2006. From 2007 until the present, this journal has published three volumes per year. All of its volumes are available online at the website: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>.

Revista Colombiana de Química is indexed in databases such as Scopus, Pubindex, DOAJ, SciELO, Latindex, and Redalyc. This publication has a Scientific and Editorial Board composed of renowned researchers in each subject, and accepts relevant contributions to the different areas of chemistry such as analytical chemistry, biochemistry, organic and physical chemistry, food chemistry, inorganic chemistry, material sciences, organometallic chemistry, and chemistry teaching, among others. The target audience are professionals of any area of chemistry.

Types of manuscripts

Research articles

They are articles that present results of investigation that have not been published previously. The authors should highlight the contribution of their work to novel knowledge. It is suggested a maximum of 40 references.

Reviews

They will be requested by invitation of the Publishing Board, considering the experience of the authors in a specific subject. They are articles that present the current state of the knowledge on a subject. Additionally, in this type of articles, the authors should clearly establish their contribution and own criterion. It has to present more than 50 references, preferably of the last 5 years.

Ethic

Revista Colombiana de Química follows the ethics policy proposed by COPE: <http://publicationethics.org/> intended for peer-reviewed scientific journals. Please be aware that plagiarism, ghost writing, and duplication of results are considered to go against our ethics policy. This journal uses an evaluation system in which authors and referees are unknown to each other.

Conflicts of interest

The journal defines a conflict of interest as any subject that interfere in: the complete and objective presentation, the review by pairs, the taking of publishing decisions, or the publication of investigation articles presented to the journal. The conflict of interests can be of financial and no financial nature, professional or personal, and can come up in relation to an organization or another person.

Submitting and outline for the general review

Manuscripts submitted to the Revista Colombiana de Química for their possible publication have to be unpublished (no subjected at the same time to any other journal, either printed or digital). The authors are responsible for their opinions and ideas declared in the manuscript. The precision of the information in a manuscript, including figures and tables, is complete responsibility of the author (s).

Manuscripts can be submitted for their evaluation via email (rcolquim_fcbog@unal.edu.co) or through the platform on-line of the journal (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>).

General requirements for submitting

Sending through the portal online are possible if the author is registered. If not, the author should register following the necessary steps. Before beginning, it is important to check that the sending meets all the requirements requested by the journal (See section Preparation for on-line sending).

1. Neither abstract nor authors' data should be included in the on-line version of the document. These information should be included in the metadata, that is to say, in the submission form. On the contrary, if the article is sent by e-mail it has to contain all the data that is specify in the Format section.
2. In both cases, on-line submitting or via e-mail, a letter presenting the article must be submitted. This letter should include the most relevant aspects of the manuscript, a list of three possible reviewers, with their respective contact data. The letter should be sign by all the authors.
3. Photos, diagrams, maps, and figures should be named as figures. Photos and maps should be attached in a separated file, in a tiff. or jpg. format. They should have the size at which they have to be published, with a resolution of 300 dpi, and in a grey scale in black and white. If a grey scale is not good enough then different trams should be used. Photos and maps should not be copied in Word because they lose resolution, and therefore there will be problems during the formatting. If the graphic corresponds to archives developed in Excel or Word, then authors should send it in the original program.

Reviewing flow

- After receiving the manuscript and verifying that it fulfils with the format established in this guide, it is sent to peer-reviewers.
- After receiving the evaluations, the decision of the Editorial Board is sent to the correspondence author:
 - **Accepted with minor changes:** Authors should send a new version to the journal. When the editor verifies that the changes were made (the authors have to send a detailed list with the changes made or the reason why they do not made the changes), the article is accepted.
 - **Major changes:** Authors should send a new version to the journal, which will be subjected to a fast evaluation (the authors have to send a detailed list with the changes made or the reason why they do not made the changes).
 - **Rejected:** The authors decide if they subject a new version to the journal, which will be treated as a new article.
 - If the article is accepted, it will appear initially in a pre-print format in the web page of the journal (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>). Later on it will be replaced by the diagramed version. Finally, the printed version will be distributed.

Preparation

The document has to be presented in a Word .doc or .docx file, size letter (or A4), 1.5 line spacing, with top and bottom margins of 2.5 cm and 3.0 cm in right and left margins, font Times New Roman, pages consecutively numbered, and a consecutive numbering of the lines. The titles: ABSTRACT, RESUMEN, RESUMO, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS, ACKNOWLEDGEMENTS, and REFERENCES should to be used. The authors are free to present the results and the discussion in separated sections.

Language

Manuscripts are accepted in Spanish, English or Portuguese. However, the **title, abstract, and key words should be written in the three languages**. As a strategy to increase the diffusion and visibility of the manuscript, the journal encourage to the authors to present the manuscript in English.

First page

Title

The title has to be in small letter, unless the capital is compulsory. It has to be concise but informative and does not have to exceed 120 characters including spaces. The title has to appear always in Spanish, English, and Portuguese. For example:

- Catalytic oxidation of toluene and 2-propanol over Mn and Co mixed oxides obtained by coprecipitation method.
- Oxidación catalítica de tolueno y 2-propanol sobre óxidos mixtos de Mn y Co obtenidos por coprecipitación.
- A oxidação catalítica de tolueno e 2-propanol em óxidos mistos de Mn e de Co, obtidos por coprecipitação.

Author(s) and their filiations

- Full names.
- Last professional title.
- Working institution.
- Country and city of residence.
- E-mail (for each author).

Filiation data should keep a categorical order as follows: laboratory, institute, university, city, state, country, e-mail. Each filiation should be listed with numbers in superscript and referenced to each author. The author of correspondence has to be denoted with an asterisk. For example:

Mauricio Acelas¹, Elizabeth Gil², Markus Doerr³, Martha Daza³, Juan Manuel Urbina^{*}

¹ Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular–LQOBio, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

² Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82, Bogotá D.C., Colombia.

³ Grupo de Bioquímica Teórica–GBQT, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

^{*} **Author of correspondence:** jurbina@uis.edu.co

Body of the manuscript

The manuscript should be justified (aligned to both left and right), with the pages and lines numbered continuously. All titles and primary and secondary subtitles should be justified to the left. The titles (**ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS, ACKNOWLEDGEMENTS, and REFERENCES**) have to go with capital letter and bold type. The **primary subtitles** have to go with small letter sustained and bold type. The *secondary subtitles* have to go in italic. Always the statistics terms, abbreviations, and symbols have to be defined the first time they are used in the manuscript. For the measurement units, the International Metric System should be used. When not followed by units numbers are written up to ten with the word (one, two, three, etc.) and higher than ten with numbers (11, 12, 102). Numbers with units should be followed by the units keeping

a space between one and another (100 m, 50 mL). If the number represents a percentage then there should not be any space between the number and the unit (80%). In manuscripts written in Spanish decimals are separated by comma (,) and in English by point (.). Each figure and table in the text must be quoted according to the order of apparition and in the following format: Figure 1 or Figures 1 and 2 or Figures 1A-1F or Table 1.

Abstract

Abstract should have a maximum of 200 words. To write an introductory sentence is suggested. The authors have to mention the aim of the investigation, the notable results (providing specific data and, if possible, its statistical significance), and the main conclusions without bibliographic references. Authors should emphasize towards the new and important aspects of the study. A descriptive abstract should be avoided (where no data is shown), instead, an analytical abstract (where notable data obtained in the investigation is shown) should be presented. The abstract has to appear always in Spanish, English, and Portuguese.

Key words

Between three to six words have to be listed. The words used in the title of the manuscript should not be used in this section. Key words have to appear always in Spanish, English, and Portuguese.

Introduction

The logical foundations for the realization of the work have to be presented. Only strictly timely references should be given. Data or conclusions of the manuscript should not be included in this section. At the end of the introduction, the aim of the work have to be shown.

Materials and methods

In a subsection, the reagents used, trade, and the country have to be listed. The methods used should be listed by subtitles. The procedures have to have the sufficient detail to allow other professionals to reproduce the experiments. This section must include the equipment, including name of the manufacturer and country, in addition, the references of the methodology and statistical methods should be provided. Authors should describe the new methods or those that have been substantially modified, supporting the reasons to use them and evaluating their limitations.

Authors submitting reviews should describe the methods employed to locate, select, extract, and synthesize the information. If statistical tests are done, then a subtitle "Statistical analysis" should be included for their description.

Results

Results should be presented in a logical order and in accordance to the order presented in the MATERIALS AND METHODS section. Authors should highlight the results that contribute to the generation of new knowledge. The information contained in tables does must not be repeated in figures, and vice versa.

Discussion

New and outstanding outcomes of the study should be highlighted. Information presented in the sections INTRODUCTION or RESULTS should not be shown again in the DISCUSSION section. It is advised to evaluate possible relations between the obtained results, to judge the results in relation with the ones obtained by other authors, and to propose hypotheses to explain the obtained data. The sections RESULTS and DISCUSSION together should have a minimum extension of three pages written in double space.

Conclusions

Minimum one paragraph should be presented as conclusion (s). Conclusions should be in accordance to the aim of the study, avoiding to enumerate them or to present them as loose sentences. Author should present the conclusions well supported by the data.

Acknowledgements

Funding sources should be mentioned in this section. Support received for the realization of the study (e.g., scholarships, equipment, reagents) should also be included. Authors can appoint those people that contributed to the work, but whose contributions do not justify the authorship, describing the contribution carried out, for example, "technical support", "critical review of the writing", "collecting samples".

References

The format is based in the guide of styles of the American Chemical Society (ACS).

References in text: All the appointments that appear in the text have to coincide with those presented in the section REFERENCES, and vice versa.

Authors must avoid referencing as bibliography:

- The summaries presented in congresses or other meetings.
- Personal communications.
- Unpublished data. The citation of a manuscript as "in press" supposes that it was already accepted for publication.

The references should appear with italic numbers in parentheses in the line of the text, and inside the punctuation. For example:

- The conditions of extraction are reported in other studies (1).

The references should be written with natural numbers in accordance to their order of apparition. If within the text the author(s) are to be mentioned, then the citation has to be as:

- An author: Duque (2)
- Two authors: Duque and Palomeque (3)
- More than two authors: Duque et al. (4)

Format of references: The references have to be organized in the same numerical order in which they were presented along the text.

Journals

The surname and the initials of the name of all the authors have to be included. Surnames should be separated of the initials of the name by comma. The initials of the names of authors should be accompanied with point. Authors should be separated with semicolon. After the authors information the title should be written. The name abbreviated of the journal in italic, according to the Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI, <http://cassi.cas.org/search.jsp>). The year in bold type, the volume with italic type and the pages (separated with hyphen). If available the DOI should be included.

- Up to six authors: all the authors should be included.

Da Silva, R.; Nissim, I.; Brosnan, M.; Brosnan, J. Creatine synthesis: Hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, 296, 256-261. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90547.2008>.

- More than six authors: include until the sixth author and then write *et al.*

Books and other monographs

- Books without editors
Stout, J.; Antonio, J.; Kalman, D. *Essentials of creatine in sports and health*. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2008; pp 30-40. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-573-2>

Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green chemistry: Theory and practice*; Oxford University Press: Oxford, 1998. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-1996-0626>
- Chapter in edited book
McBrien, M. Selecting the correct pH value for HPLC. In *HPLC made to measure: A practical handbook for optimization*; Kromidas, S., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; pp 89-103.

Doctoral Thesis (or similar)

- Printed
King, K. J. Development of a pressurized system for oxidation studies of volatile fluids. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, State College, PA, March 1983.
- Online
Abrams, N. M. Efficiency enhancement in dye-sensitized solar cells through light manipulation. Ph.D. Dissertation [Online], The Pennsylvania State University, University Park, PA, December 2005. <http://etda.libraries.psu.edu/theses/approved/WorldWideIndex/ETD-1061/index.html> (consulted on the 2nd April 2014).

Web sites

Penn State Department of Chemistry. <http://www.chem.psu.edu/> (consultado el 7 de junio de 2014).

Mallet Chemistry Library, University of Texas Libraries. ThermoDex home page: An index of selected thermodynamic and physical property resources. <http://www.lib.utexas.edu/thermodex/> (consultado el 19 de marzo de 2014).

In press

Kaufhold, S.; Petermann, L.; Staehle, R.; Rau, S. Transition metal complexes with N-heterocyclic carbene ligands: From organometallic hydrogenation reactions towards water splitting. *Coord. Chem. Rev.* En prensa.

Tables and figures

Photos, diagrams, maps, and graphics should be mentioned as figures. We encourage authors to present data in figures instead to tables. In any case, redundancy among tables, figures, and text should be avoided.

Figures with legends have to be sent individually in format .TIFF, of excellent quality, with a minimum resolution of 300 dpi and with one of two sizes (9 cm of width, that is a column, or 20 cm that covers the two columns). The color impression does not generate additional costs for the authors, however, it represents a greater cost for the journal. With this in mind, a scale of grey or trams should be used whenever possible. The use of color might be considered when it is strictly necessary. Figures originally created in Microsoft Word or Excel should be sent in that program.

Tables should be included in the body of the manuscript at the end of the document. Both tables and figures have to be self-contained (They should be interpreted without needing information from the body of the manuscript). Keys and abbreviations should be described in the legend of the figure and in the title or foot of the table. It is advised to provide in addition to the average, the standard deviation, and other notable statistical information.

The labels of each table have to be at the top of it, whereas in figures the labels have to be presented at their foot. Small figures should be avoided: group figures with information related in compound figures entitled with letters (Figure 1a, Figure 3b, etc.). If a manuscript contains tables or figures reproduced (even if they are from the author (s) submitting the manuscript) it is compulsory to the authors to declare the origin and to present permission to use them. It is responsibility of the authors to achieve the corresponding permission. In case of any doubt in this regard, please contact the journal via e-mail (rcolquim_fcbog@unal.edu.co) or by telephone (+571 3165000 Ext. 14458).

Preparation for on-line submitting

Before sending your manuscript, by the Portal or by email, verify that it fulfils with the following conditions:

- It has a title in the 3 languages requested.
- It provides full names of the authors, and for each one it is mentioned:
 - Last professional title.
 - Institution in which the author works.
 - Country and city of residence.
 - E-mail.

- It presents an analytical abstract, of maximum 200 words, in the three languages requested.
- It presents keywords, in the 3 languages requested.
- The body of the article follows the format requested.
- The cited references in the body of the article appear in the section REFERENCES and vice versa.
- The format of the references follows the indications stipulated in this guide.
- In the references the DOI of the articles are presented, if it is the case.
- The figures are in format .TIFF with resolution greater than 300 dpi. (in separated files). If a figure was created in Word or Excel then sent it in that format.
- The tables are placed at the end of the document.
- A letter presenting the manuscript in a format as suggested above is included. (available in revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim)

Manuscript accepted for publication

If the Editor has notified the correspondence author that his (her) manuscript could be accepted for publication in case the modifications suggested by the referees are taken into account, the author should send the new version of the manuscript accompanied of a letter detailing

the response to each one of the comments. In the case a comment is not taken into account the author should justify the reason. The new version of the manuscript should be created with the “track changes” option or highlighting in yellow the changes, so that the Editor can identify them easily.

Once the process of reviewing is completed, the Editor will send an email to the correspondence author manifesting the decision of the Editorial Board. If the manuscript is accepted for publication, an e-mail attaching the suggestions, indications, and comments of each reviewer will be sent to the correspondence author. To continue with the process of publication, the author should send the following archives to the e-mail of the journal (rcolquim_fcbog@unal.edu.co):

- The new version of the manuscript in which the author uses the option “track changes” or highlight in yellow the modifications performed.
- A letter detailing the response to each one of the comments. In the case a comment is not taken into account the author should justify the reason.
- In the case that a reviewer suggest that a figure should be modified, then be aware that it should be in format .TIFF with a resolution greater than 300 dpi.

Cost of the publication

The publication of a manuscript with an extension up to three printed pages of the journal will have a cost \$30,000 Colombian pesos. Additional pages will cost of \$20,000 Colombian pesos each one.



Revista
Colombiana
de Química

Volumen 44, nro. 1 de 2015/ ISSN 0120-2804

Contenido

Carta del editor
Editors letter

1-4

Química Orgánica y Bioquímica

PfGBP: una proteína de unión al telómero de *Plasmodium falciparum*
PfGBP: A *Plasmodium falciparum* telomere binding protein
PfGBP: uma proteína de ligação o telômero em *Plasmodium falciparum*
Eliana Calvo T., Moisés Wasserman L.

5-10

Molecular and metabolic insights of creatine supplementation on resistance training
Perspectivas moleculares y metabólicas de la suplementación con creatina en el entrenamiento de fuerza
Perspectivas moleculares e metabólicas da suplementação de creatina no treinamento de força
Diego A. Bonilla, Yurany Moreno

11-18

Química Aplicada y Analítica

Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)
Analysis of cocaine in different samples by gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID)
Análise de cocaína em diferentes amostras por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID)
Angela M. López C., William F. Garzón M., Milton Rosero-Moreano, Gonzalo Taborda O.

19-22

Determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano por microextracción en fase sólida - cromatografía de gases en Pereira, Colombia
Determination of trihalomethanes in drinking water by solid phase microextraction - gas chromatography in Pereira, Colombia
Determinação de trihalometanos na água para consumo humano por microextração em fase sólida - cromatografia em fase gasosa em Pereira, Colômbia
Olga I. Vallejo-Vargas, Leonardo Beltrán, Paola Franco, Carlos H. Montoya-Navarrete, Edwin Jhovany Alzate Rodríguez, Henry Reyes

23-29

Enseñanza de la Química

Relevant chemistry topics for the clinical practice of a physiotherapist
Tópicos de química relevantes para la práctica clínica de un fisioterapeuta
Tópicos químicos relevantes para a prática clínica de um fisioterapeuta
Rodrigo Ramírez-Tagle, Jaime Ocaranza-Ozímica, Nicolás Chávez, Macarena Valladares

30-35

Una metodología para el estudio de las ideas previas sobre química a través del análisis de expresiones gráficas
A methodology to the study of preconceptions about chemistry through the analysis of graphics expressions
Uma metodologia para o estudo das idéias preconcebidas sobre a química através do analise de expressões gráficas
Didier L. Ruiz, Liliam A. Palomeque

36-45

Guía para autores

46-55



La Revista Colombiana de Química (Rev Colomb Quim) se encuentra indexada y referenciada en: Publindex-Índice Bibliográfico Nacional (categoría A2 - dic 2013); Chemical Abstracts; SciELO Colombia; Scopus Q4 (SJR/2013: 0,112); Latindex; Redalyc y Directory of Open Access Journals (DOAJ).

Es publicada cuatrimestralmente por el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Se orienta a la divulgación científica de contribuciones provenientes de la investigación en las diversas áreas de la química.

Open Access Journal: full contents available on-line at:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim>

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=es&nrm=iso