



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CUTICULARES MEDIANTE GC-MS Y
SU ROL EN COLONIAS DE *NEOTERMES CHILENSIS* (BLATTODEA:
KALOTERMITIDAE)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Químico Ambiental.

CRISTOPHER GUSTAVO DELGADO LATORRE

Director: Dr. Hermann Niemeyer Marich

Co-Director: Dr. Daniel Aguilera Olivares

Abril 2018

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de título, presentado por el **Sr. CRISTOPHER DELGADO LATORRE**:

“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CUTICULARES MEDIANTE GC-MS Y SU ROL EN COLONIAS DE *NEOTERMES CHILENSIS* (BLATTODEA: KALOTERMITIDAE)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Químico Ambiental.

Dr. Hermann Niemeyer Marich
Director Seminario de Título

Dr. Daniel Aguilera Olivares
Co-Director

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Cecilia Labbé Donoso
Presidente de la Comisión

Dr. Claudio Veloso Iriarte
Evaluador

BIOGRAFÍA



Mi historia comienza en la comuna de Rancagua, Sexta Región del Libertador Bernardo O'Higgins, cuando llegué a este mundo junto con mi hermana el 30 de Octubre de 1989.

Luego de algunos años sin preocupaciones, empezó mi etapa escolar básica en el colegio El Cobre D-30, que llegó a su fin cuando en octavo emigre hacia zonas más rurales y comenzaron mis estudios medios como técnico agropecuario en la Escuela Agrícola San Vicente de Paúl (Quimavida). En este lugar conocí mucha gente que aún forma parte de mi círculo más cercano y aprendí muchas cosas, entre las cuales se encontraba una nueva preocupación e interés por el medio ambiente.

Luego de finalizar mi etapa escolar media, trabajé un tiempo en Hacienda Chada S.A., un fundo donde aprendí muchas cosas y terminé de convencerme que debía emprender mi camino hacia la educación superior. Debido a que continuaba presente la inquietud por el poco cuidado que se tenía con el medio ambiente, es que en 2011 ingresé a estudiar Química Ambiental en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Posteriormente buscando aplicaciones enfocadas hacia el área “ecológica” de la carrera, llegué al Laboratorio de Química Ecológica (LQE) a trabajar con Daniel Aguilera, entonces estudiante de doctorado y con el profesor Hermann Niemeyer, embarcándonos en el camino de la influencia que presentan los hidrocarburos cuticulares en la comunicación en insectos sociales, específicamente termitas.

“A mi madre, por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas, por ser un ejemplo a seguir y por su amor constante, que me permitieron culminar una muy importante etapa de mi vida”.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y mi padre, por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas de vida, por sus palabras de aliento y amor constante, que me permitieron llegar a este momento.

A mi hermana, que siempre ha estado a mi lado, brindándome su apoyo, preocupación y cariño incondicional.

A mi familia, por su preocupación constante y su apoyo en todo momento.

A todos mis amigos, en especial a SCR's, Team bella, Team TPSKN y últimamente pero no menos importantemente al equipo de futbolito, por su apoyo absoluto, por sus palabras de aliento, por las invitaciones a carretear y por sus ¿y cómo va la tesis? o ¿y cuándo vas a salir? y otras palabras de ánimo similares.

Al Laboratorio de Química Ecológica y al Termiteam donde he conocido a grandes personas: gracias por el buen ambiente, por los buenos momentos, por siempre tener disposición y ganas de ayudar y por la logística y gestiones realizadas en estos años.

A Daniel Aguilera por la paciencia infinita, por las correcciones realizadas, por siempre tener buena disposición y una palabra de aliento, por enseñarme a ser estricto y claro en lo que se escribe, por su guía y apoyo incondicional y por su preocupación constante.

Y finalmente al profesor Hermann Niemeyer por recibirme en el Laboratorio de Química Ecológica y financiar mi investigación, por creer en mis capacidades, por su guía y apoyo en el transcurso de esta tesis y por las gestiones realizadas como tutor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
<i>DEDICATORIA</i>	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	lix
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes Generales.....	1
1.1.1.Sociabilidad en insectos.....	1
1.1.2.Reconocimiento entre individuos.....	2
1.1.3.Reconocimiento entre compañeros de nido.....	5
1.1.4.Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	6
1.2.Antecedentes Específicos.....	10
1.2.1.Termitas como modelo de estudio.....	10
1.2.1.1.Hábitos de nidificación y forrajeo.....	12
1.2.1.2.Rol ecológico de las termitas.....	14
1.2.2.Hidrocarburos cuticulares aislados desde termitas y su rol en el reconocimiento entre individuos.....	16
1.2.3.Las termitas en Chile.....	18
1.2.4.El problema de estudio.....	19
1.3.Hipótesis.....	21
1.4.Objetivos.....	21
1.4.1.Objetivo General.....	21

1.4.2.Objetivos Específicos.....	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1.Recolección de nidos y sitios de muestreo	22
2.2.Análisis químico.....	24
2.2.1.Recolección de individuos.....	24
2.2.3.Extracto maestro e inyección en GC-MS.....	25
2.2.4.Análisis cromatográfico e identificación de compuestos cuticulares..	26
2.3.Análisis estadístico	28
2.3.1.Análisis cualitativo	29
2.3.2.Análisis cuantitativo.....	30
III. RESULTADOS	32
3.1.Identificación de compuestos cuticulares de <i>N. chilensis</i>	32
3.2.Análisis estadístico	36
3.2.1.Análisis cualitativo	36
3.2.2.Análisis cuantitativo.....	40
IV. DISCUSIÓN	44
V. CONCLUSIÓN	48
VI. REFERENCIAS.....	49
VII. ANEXO	55
7.1.Cromatografía de gases	55
7.2.Espectrometría de masas	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Hidrocarburos cuticulares presentes en <i>N. chilensis</i>	32
Tabla 2: Porcentaje promedio de abundancia relativa y desviación estándar para cada compuesto en cada casta y sitio	35
Tabla 3: Resultados de la prueba exacta de Fisher en el análisis cualitativo para castas de <i>N. chilensis</i>	39
Tabla 4: Resultados del ANOVA de una vía en el análisis cuantitativo para castas de <i>N. chilensis</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida general de una colonia de termitas	12
Figura 2: Ubicación de los sitios de extracción: Las Chilcas y La Dormida	22
Figura 3: Criterios de selección de escapos y medio de transporte de nidos al laboratorio en Santiago.....	24
Figura 4: Reacción de derivatización con dimetildisulfuro (DMDS)	28
Figura 5: Cromatograma maestro y compuestos cuticulares identificados	33
Figura 6: Escalamiento multidimensional en 2 dimensiones. Para los sitios de recolección y para las castas de <i>N. chilensis</i>	36
Figura 7: Resultados del análisis químico cualitativo para castas y sitios para la dimensión 1 y la dimensión 2 del análisis de escalamiento multidimensional	37
Figura 8: Análisis de componentes principales (PCA), para 2 Factores. Para los sitios de recolección y para las castas de <i>N. chilensis</i>	41
Figura 9: Resultados del análisis químico cuantitativo para sitios y castas para el Factor 1 y el Factor 2 del análisis de componentes principales (PCA)	42
Figura A-1: a) Esquema de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID); b) columnas empaquetadas o de relleno; c) columnas tubulares abiertas o capilares.....	55
Figura A-2: Esquema de un espectrómetro de masas, con analizador de sector magnético.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

A .	alados
ANOVA .	análisis de la varianza
CI .	ionización química
DMDS .	dimetildisulfuro
ECD .	detector de captura de electrones
EI .	impacto electrónico
FI .	ionización de campo
FID .	detector de ionización de llama
FPD .	detector fotométrico de llama
GC .	cromatógrafo de gases
GC-MS .	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HC .	hidrocarburos
HCC .	hidrocarburos cuticulares
IK .	índice de Kovats
<i>m/z</i> .	masa/carga
MS .	espectrómetro de masas
NS .	no hay diferencias significativas
<i>p. a.</i> .	pro analysis
PCA .	análisis de componentes principales
PLOT .	columna tubular abierta de capa porosa
PO .	pseudo-obreras
RP .	reproductores primarios
S .	soldados
SCOT .	columna tubular abierta recubierta de soporte
TCD .	detector de conductividad térmica
TIC .	total ion current
TOF .	analizador de tiempo de vuelo
WCOT .	columna tubular abierta de pared

RESUMEN

En insectos eusociales, el reconocimiento y la comunicación entre compañeros de nido soportan la estructura social de la colonia. Estas conclusiones se basan más en estudios en himenópteros que en termitas (Blattodea). En las termitas se distinguen tres castas principales: reproductores primarios (reproducción); soldados (defensa); y obreras o pseudo-obreras (alimentación y cuidado de otras castas y jóvenes, mantenimiento y expansión del nido).

La comunicación entre compañeros de nido se produce generalmente por señales químicas. Dentro de estas son especialmente relevantes los compuestos cuticulares, particularmente los hidrocarburos. Estos recubren por completo la cutícula de los insectos y cumplen dos funciones: evitar la pérdida de agua y actuar como compuestos semioquímicos para el reconocimiento entre individuos. En este seminario, se estudió las diferencias cualitativas (escalamiento multidimensional) y cuantitativas (análisis de componentes principales- PCA) en los perfiles de hidrocarburos cuticulares entre castas y entre dos sitios de recolección, usando la termita endémica nidificadora de una pieza, *Neotermes chilensis*, a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, técnica que permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla.

Se identificaron 27 hidrocarburos en la cutícula de *N. chilensis*, 19 metil-alcanos (70,4%), 7 *n*-alcanos (25,9%) y un *n*-alqueno (3,70%). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en la composición cualitativa y cuantitativa entre el sitio de recolección y entre las castas. Los principales resultados mostraron que pseudo-obreras y soldados eran distintos entre sí y de otras castas. Además se determinó los principales hidrocarburos responsables de las diferencias entre castas.

En conclusión, en este seminario se demostró las diferencias cualitativas y cuantitativas complementarias de los perfiles de hidrocarburos cuticulares entre distintas castas y entre dos sitios de recolección diferentes de *N. chilensis*. Los resultados contribuyen con una interpretación química al fenómeno de reconocimiento intraespecífico en una termita nidificadora de una pieza.

Palabras clave: Reconocimiento, comunicación, hidrocarburos, termitas, GC-MS.

ABSTRACT

In eusocial insects, recognition and communication between nestmates support the social structure of the colony. These conclusions are based mostly in studies concerning hymenopterans rather than termites (Blattodea). In termites, three main castes may be distinguished: primary reproducers (reproduction); soldiers (defense); and workers or pseudo-workers (feeding and taking care of young and of other castes, maintenance and expansion of the nest). During the swarming season, alates of both sex emerge from the parental colony, lose their wings, and eventually mate and found a new colony.

Communication among nestmates is usually based on chemical signals. Cuticular compounds, particularly hydrocarbons, have special relevance. They cover the cuticle of the insects and avoid water loss and function as semiochemicals for recognition among individuals. In this seminar, I studied qualitative (multidimensional scaling) and quantitative (principal component analysis- PCA) differences in cuticular hydrocarbon profiles between castes and between two collection sites, using the endemic one piece nesting termite, *Neotermes chilensis*; I used gas chromatography coupled to mass spectrometry, a technique, which allows the separation, identification and quantitation of the components of a mixture.

I identified 27 hydrocarbons in the cuticle of *N. chilensis*: 19 methyl-alkanes (70.4%), 7 *n*-alkanes (25.9%) and one *n*-alkene (3.70%). The statistical analyses showed significant differences in qualitative and quantitative compositions between collection site and between castes. The main results showed differences between pseudo-workers and soldiers, and also differences between them and the other castes.

Furthermore, I determined the main hydrocarbons responsible for the differences between castes. In conclusion, in this seminary I demonstrated the complementary nature of qualitative and quantitative differences of the cuticular hydrocarbons profile between different castes and between two different collecting sites of *N. chilensis*. This result contributes with a chemical interpretation of the phenomenon of intraspecific recognition in a one-piece nesting termite.

Key words: Recognition, communication, hydrocarbons, termites, GC-MS.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Generales

1.1.1 Sociabilidad en insectos

En insectos se ha observado un amplio rango de grados de sociabilidad, dentro del cual se han definido:

- 1) **Insectos solitarios.** Estos no poseen comportamiento social e interactúan solamente para reproducirse, por lo que no llegan a conocer a su descendencia (Flores-Prado, 2012). Esta categoría recopila un gran número de insectos, pudiéndose destacar órdenes primitivos como Diplura, Thysanura, Ephemeroptera (efímeras) y otros más derivados como Mantidae (mantis religiosa) y Orthoptera (grillos);
- 2) **insectos pre-sociales.** Estos poseen algún grado de comportamiento social más allá del apareamiento, principalmente cuidados parentales. Esta categoría incluye órdenes como Hymenoptera, Dermaptera, Coleoptera, Thysanoptera, Blattodea y Diptera (Wilson, 1965). Dentro de esta categoría pueden reconocerse una serie de niveles sociales inferiores como:
 - a. insectos sub-sociales, en los que los individuos adultos cuidan de su descendencia durante algún periodo de tiempo;
 - b. insectos comunales, cuyos miembros de la misma generación usan el mismo nido, sin cooperación en el cuidado de la descendencia;

- c. insectos cuasi-sociales, cuyos miembros de la misma generación usan el mismo nido y la descendencia es atendida de forma cooperativa, pero cada hembra aún posee la capacidad de generar descendencia; y
 - d. insectos semi-sociales, donde las especies se desarrollan en un nido comunal que contiene miembros de la misma generación que colaboran en el cuidado de las crías aunque existe división de las tareas reproductoras (número limitado de individuos fértiles) (Hölldobler y Wilson, 1990; Flores-Prado, 2012); y
- 3) **insectos eusociales**. Estos se caracterizan por la división de la labor reproductiva, la superposición de generaciones y la cooperación en el cuidado de las crías (llevada a cabo por los miembros que no se reproducen) (Toth y Robinson, 2007). Este grupo comprende a algunas especies de abejas (Hymenoptera), así como todas las hormigas (Hymenoptera) (Hölldobler y Wilson, 1990; Fernández, 1999); las especies altamente eusociales se caracterizan por poseer diferenciación morfológica de castas como las termitas (Blattodea), que se organizan en colonias.

1.1.2 Reconocimiento entre individuos

El reconocimiento es un componente integral de los sistemas biológicos sociales, ya que permite la discriminación de un individuo con respecto a otro y la identificación de diferentes clases de individuos (Sherman y col., 1997). Existen diversas formas de comunicación y/o reconocimiento en insectos, entre ellos:

1) visual. Esta ocurre por medio de:

- a. coloración producida por la interacción (dispersión, difracción, etc.) del esclerito (placa de cutícula endurecida) con la luz, o por presencia de

pigmentos en los escleritos, ya sea sintetizados por el insecto u obtenidos desde la dieta; generalmente ambos tipos de coloración ocurren simultáneamente (Zaballos y Moreno, 2009); y

- b. la emisión de luz (bioluminiscencia) que produce la enzima luciferasa cuando oxida a la luciferina (pigmento emisor de luz), en presencia de ATP. Como resultado se produce oxiluciferina, dióxido de carbono y luz, como ocurre en las luciérnagas (Coleoptera; Lampyridae). Cada especie posee patrones visuales distintivos, hecho que puede ser útil para el reconocimiento entre individuos, pero también para atraer a una pareja o para alertar a otros organismos de su peligrosidad (Lobato, 2015);

2) sonora. Los insectos emiten sonidos muy variados con diferentes frecuencias, amplitudes y/o periodicidad característicos de cada especie; la comunicación sonora es utilizada principalmente como señales de cortejo. El sonido puede producirse mediante diversos mecanismos, entre los que se encuentran:

- a. la estridulación, producida frotando dos partes del cuerpo, como ocurre en los grillos (Orthoptera, Gryllidae);
- b. la vibración de timbales, como en las cigarras (Hemiptera; Cymidae), que poseen un par de timbales laterales que emiten sonido por efecto de la contracción muscular y
- c. el movimiento de las alas, como en los zancudos (Diptera; Culicidae) (Lanza, 2011; Lobato, 2015);

3) táctil. En cuyo caso la información es transmitida mediante algún tipo de contacto físico entre el emisor y el receptor, ya sea de forma directa o indirecta (vibraciones); este tipo de comunicación es especialmente importante en algunos insectos sociales (abejas y hormigas: (Hymenoptera) (Lobato, 2015); y

4) química. Probablemente la forma de comunicación más importante en los insectos, debido al largo alcance que pueden tener los mensajes transmitidos y la especificidad de los mismos. En este tipo de comunicación, el emisor libera sustancias químicas, denominadas compuestos semioquímicos, las que son detectadas por otros individuos. Los compuestos semioquímicos generados varían en su estructura y objetivo, pudiendo ser clasificados en dos categorías:

- a. las feromonas, estas presentan funciones intra-específicas, por lo que provocan una respuesta fisiológica o de comportamiento en otro individuo de la misma especie. Poseen un amplio rango de funciones incluyendo feromonas de alarma, territoriales y de agregación o congregación; y
- b. alelomonas, estas poseen funciones inter-específicas, entre ellas: señales de alarma, sistemas defensivos, repelentes, etc. Las alelomonas se dividen en tres grupos en función de quién se ve beneficiado por ellas:
 - las kairomonas, compuestos químicos cuyo efecto beneficia al receptor;

- las alomonas, compuestos químicos cuyo efecto beneficia al emisor; y
- las sinomonas, compuestos químicos cuyo efecto beneficia tanto al receptor como al emisor (Lanza, 2011; Montés, 2013).

1.1.3 Reconocimiento entre compañeros de nido

El reconocimiento en insectos sociales puede actuar en distintos niveles y contextos: individual, sexual, parentesco, compañeros de nido, o grupo social, tanto intra como interespecífico (Buczowski y Silverman, 2005).

El reconocimiento entre compañeros de nido juega un papel crítico en especies sociales (Bee, 2006). Este se produce generalmente mediante señales químicas que pueden tener distintos orígenes (Smith y Breed, 1995), como son:

- 1) **señales químicas endógenas**, producidas por los individuos miembros de un nido y corresponden a compuestos químicos glandulares o compuestos secretados por la cutícula (Hölldobler y Michener, 1980); y
- 2) **señales químicas exógenas**, que corresponden a sustancias externas absorbidas por la cutícula de los insectos, que contribuyen a determinar el olor específico de la colonia (Flores-Prado, 2012).

El reconocimiento entre compañeros de nido está mediado, como se ha observado en algunas especies de insectos, por sus perfiles de compuestos cuticulares, particularmente hidrocarburos (Haverty y col., 1999; Padilla y Flores, 2012).

La capacidad de reconocimiento y discriminación de compañeros de nido ha sido ampliamente estudiada en Hymenoptera (abejas, hormigas, etc.) (Kaib y col., 2004), habiéndose determinado que los hidrocarburos presentes en la cutícula del

insecto juegan un papel importante en el reconocimiento de compañeros de nido (Howard y Blomquist, 2005; Ozaki y col., 2005).

Los **hidrocarburos cuticulares** recubren por completo la superficie externa de los insectos y su función primaria es evitar la pérdida de agua o reducir la desecación, la abrasión y las infecciones (Lockey, 1988). Sin embargo, tienen una importante función secundaria, ya que actúan como compuestos semioquímicos para el reconocimiento entre individuos (Howard y Blomquist, 2005; Van Zweden y D'Ettoire, 2010) al nivel de especie, género, casta, estado reproductivo, parientes o compañeros de nido (Howard y Blomquist, 2005; Lucas y col., 2005).

1.1.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica ampliamente utilizada en el análisis químico de mezclas complejas de diferentes sustancias, en contextos agrícolas, ecológicos, ambientales, etc. (Gutiérrez y Droguet, 2002; Morales, 2014). El cromatógrafo de gases (GC) permite separar los componentes de la mezcla a medida que viajan a través de una columna, y el espectrómetro de masas (MS) permite identificarlos posteriormente a medida que emergen de dicha columna (Montoya y Páez, 2012). Ambos métodos son compatibles ya que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra (Gutiérrez y Droguet, 2002).

En la columna cromatográfica, los componentes de la mezcla inyectada son separados en función de la afinidad que presenta cada componente hacia la fase estacionaria, película activa que puede ser un sólido o un líquido que recubre las

paredes interiores de la columna. La fase estacionaria se puede clasificar en función de su polaridad, encontrándose:

- **fases no polares**, que se utilizan para separar sustancias poco polares o no polares. El polisiloxano es la estructura básica más utilizada;
- **fases semi-polares**, que se utilizan generalmente para mezclas mixtas. El polisiloxano es la fase más utilizada, aunque se consigue que éste presente distintas polaridades dependiendo del porcentaje de ramificaciones que contenga (generalmente grupos metilo); y
- **fases polares**, que se utilizan para separar mezclas polares. La estructura básica utilizada en este tipo de fase estacionaria suele tener grupos de tipo -CN, -CO y -NH (Harris, 2007). La polaridad de la fase estacionaria debe relacionarse con la de los componentes de la muestra, cumpliéndose que “lo semejante disuelve a lo semejante”.

La movilidad de los compuestos por la columna depende de un equilibrio en la distribución de cada componente con la fase estacionaria y la fase móvil (gas portador), el cual a su vez depende de la naturaleza química de ambas fases, así como de las propiedades químicas de los componentes de la mezcla (Gutiérrez y Droguet, 2002; Stashenko y Martínez, 2014). De este modo, los compuestos fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos por la fase estacionaria se moverán rápidamente (Gutiérrez y Droguet, 2002). La fase estacionaria debe ser selectiva frente a los compuestos a separar ya que estos se adhieren a ella en virtud de distintos tipos de fuerzas intermoleculares que forman enlaces químicos no covalentes (Stashenko y Martínez, 2014; Olguín y Rodríguez, 2004). En relación a lo anterior, se tiene que las

fuerzas de dispersión o de London, son las únicas fuerzas de interacción para los compuestos no polares con la fase estacionaria. Mientras que para compuestos polares, las interacciones más importantes son las fuerzas de inducción (debye) y orientación (keesom) respectivamente.

La afinidad de los componentes por la fase estacionaria, también es afectada por la presión de vapor de los compuestos (aumenta cuando se incrementa la temperatura) y la temperatura de la columna, debido a que las moléculas de los componentes en fase gaseosa interactúan con la fase estacionaria, manteniéndose en un equilibrio dinámico, mientras más alta sea la temperatura el equilibrio se desplazara hacia la fase móvil y viceversa (Olguín y Rodríguez, 2004; Gutiérrez y Droguet, 2002). Como resultado de estas diferencias de movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden ser analizadas de forma cualitativa y/o cuantitativa. (Gutiérrez y Droguet, 2002).

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica muy completa, dentro de sus características principales se encuentran:

- alta capacidad de identificación de los compuestos, ya que entrega un espectro particular para cada componente;
- gran sensibilidad, debido a que detecta concentraciones muy bajas (ppm o ppb);
- facilita información estructural sobre los componentes de la muestra; y
- proporciona información isotópica de la mezcla (Gutiérrez y Droguet, 2002).

En el espectrómetro de masas la muestra a analizar es ionizada mediante distintos métodos, provocando la fragmentación de la molécula, lo que permite obtener

diferentes iones y radicales de los compuestos analizados (Harris, 2007). La proporción y el tipo de los fragmentos producidos son exclusivos de cada molécula y de las características del proceso de ionización. Luego los fragmentos ionizados son conducidos hacia un colector mediante campos eléctricos o magnéticos, para finalmente impactar en un detector de iones donde son expuestos en función de su relación masa/carga (m/z).

Al utilizar las técnicas descritas anteriormente en conjunto (GC-MS) es posible separar los diferentes componentes de una mezcla, los cuales eluyen a través de la columna del GC en función de su afinidad por la fase estacionaria. Posteriormente los compuestos individuales pasan directamente al espectrómetro de masas, donde son ionizados por medio de diferentes métodos, lo que permite obtener la información estructural de los compuestos (Stashenko y Martínez, 2014; Gutiérrez y Droguet, 2002). Estos se registran en forma de picos en el cromatograma o "TIC" (total ion current), el cual es generado a partir del registro de la corriente iónica total en la fuente de ionización y posteriormente son identificados mediante su espectro de masas. (Montoya y Páez, 2012; Plascencia, 2003; Gutiérrez y Droguet, 2002).

Las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas se describen en mayor detalle en el Anexo, a continuación de las Referencias.

1.2. Antecedentes Específicos.

1.2.1. Termitas como modelo de estudio

Las termitas son consideradas cucarachas eusociales (Blattodea: superfamilia Termitoidea, de acuerdo a Eggleton *y col.*, 2007; Klass *y col.*, 2008); comprenden unas 3000 especies distribuidas en siete familias (Mastotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Serritermitidae, Rhinotermitidae y Termitidae: Eggleton, 2011), y presentan metamorfosis incompleta (son hemimetábolos).

Las termitas se desarrollan en colonias constituidas por cientos o millones de individuos (Thorne, 1997), altamente organizadas y estructuradas en castas morfológicamente diferenciadas que desempeñan un rol muy definido en su estructura social, lo que permite el éxito biológico y ecológico de la colonia. En cada casta existen individuos de ambos sexos (aunque no presentan dimorfismo sexual) (Eggleton, 2011). La casta de cada individuo es determinada por los requerimientos de la sociedad, por medio de hormonas y feromonas, secretadas principalmente por los individuos reproductores hacia las ninfas (presión social) (Camousseight, 1999).

Las colonias están compuestas generalmente por tres castas: reproductores, obreras (o pseudo-obreras) y soldados (Eggleton, 2011).

- 1) Los **reproductores primarios** (RP), conformados por el rey y la reina, tienen como función realizar los cuidados parentales de los primeros individuos y dar origen a los individuos de la colonia.
- 2) Las **obreras** constituyen la casta más numerosa dentro de una colonia y cumplen funciones como: construcción y mantención de nidos, cuidado y

alimentación de juveniles y de las otras castas y también protección de la colonia (Ripa y col., 2004).

Algunas familias de termitas no poseen obreras sino pseudobreras (PO), individuos totipotenciales que realizan la misma función de las obreras, con la diferencia de poder diferenciarse en cualquiera de las otras castas o permanecer como tales experimentando “mudas progresivas” que conducirán a un aumento de su tamaño corporal, “mudas estacionarias” que mantendrán su tamaño corporal pero renovarán sus piezas bucales, y “mudas regresivas” que disminuirán su tamaño corporal (Roisin y Korb, 2011).

- 3) **Los soldados** (S) no suelen superar el 10% de los individuos en una colonia y están especializados morfológica y conductualmente en la protección y defensa de la colonia, ya sea bloqueando la entrada del nido, atacando a invasores con sus mandíbulas (defensas mecánicas), a través de la secreción de sustancias químicas nocivas (defensas químicas) o ambas (defensas mixtas) (Haverty y Thorne, 1989; Ripa y col., 2004).

Cuando las colonias han adquirido un cierto tamaño se generan individuos alados, de acuerdo a cada especie y a las condiciones nutricionales y ambientales (Camousseight, 1999). Los alados son producidos en forma sincronizada y salen del nido durante el proceso llamado enjambrazón (Martius y col., 1996). Este proceso ocurre durante varios días, generalmente concentrándose en días de mayor calor y humedad (diciembre-abril) (Ripa y col., 2004). Los alados que abandonan su colonia de origen, aterrizan sobre un sustrato, donde pierden sus alas (autotomía - en este momento se les conoce como de-alados) y luego buscan una pareja. Cuando dos de-

alados de distinto sexo se encuentran, el macho camina detrás de la hembra palpando con sus antenas el abdomen de la hembra, en un comportamiento que se conoce como “tándem”.

La pareja formada busca un lugar adecuado para nidificar, y construyen una cámara nupcial donde copularán y se fundará una nueva colonia (Camousseight, 1999). Los alados son los únicos con la capacidad temporal de ver, que van perdiendo gradualmente hasta quedar ciegos luego de fundar una nueva colonia.

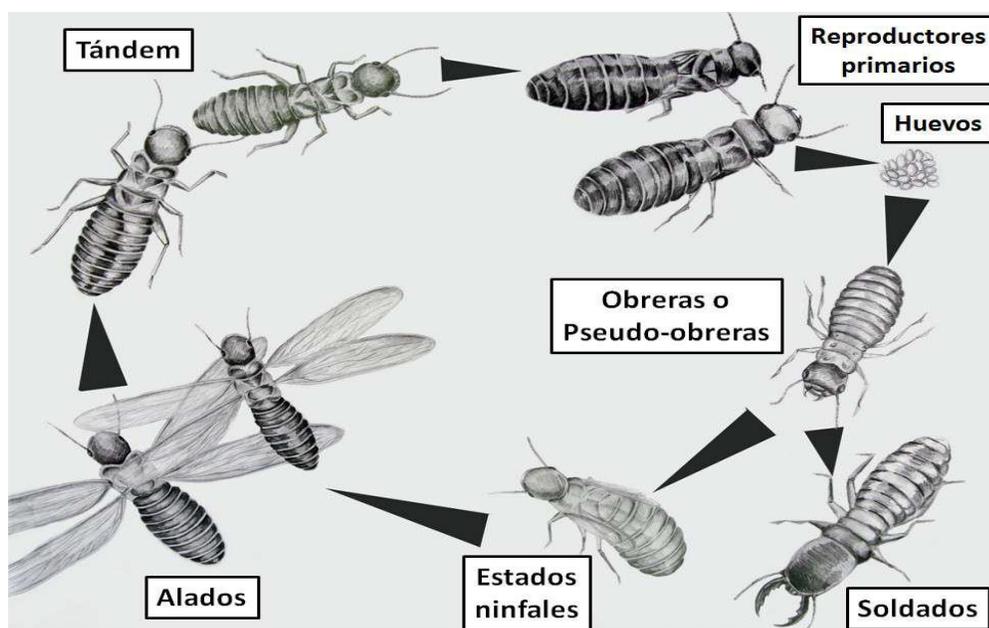


Figura 1: Ciclo de vida general de una colonia de termitas.

1.2.1.1. Hábitos de nidificación y forrajeo

Las termitas son insectos xilófagos (que se alimentan de madera), gracias a que hospedan en su tubo digestivo a microorganismos simbiotes (protozoos)- en el caso de las “lower termites” (todas las familias exceptuando a Termitidae)- o bacterias hospedadas en el tubo digestivo o a través del cultivo de hongos en el caso de las “higher termites” (familia Termitidae), productores de enzimas que degradan la celulosa (Ni y Tokuda, 2013).

Son estos simbioses quienes se encargan de digerir la madera, produciendo finalmente el llamado **alimento proctodeal** que es eliminado por el ano del insecto al igual que las deposiciones; sin embargo, no deben ser confundidas entre sí (Ramírez y Lanfranco, 2001). El alimento proctodeal, además de constituir comida para toda la colonia, entrega los simbioses necesarios para las generaciones más jóvenes, las que nacen sin ellos. Las termitas además suelen practicar el canibalismo (consumo de individuos heridos o enfermos), la necrofagia (consumo de individuos muertos) y la ovofagia (consumo de huevos). Aparte de servir como una fuente extra de alimento, estas modalidades de alimentación permiten mantener el nido limpio y sano (Camousseight, 1999).

Considerando aspectos ecológicos, se han reconocido tres categorías de termitas según sus hábitos de nidificación y forrajeo (Abe, 1987):

- 1) **nidificadoras de una pieza**, que incluye a las familias Termopsidae, Kalotermitidae y al género *Prorhinotermes* de la familia Rhinotermitidae (Evans, 2011), se caracterizan por usar un único trozo de madera como sustrato de nidificación y forrajeo. Por esta razón, los miembros de la colonia jamás abandonan el nido, excepto en los períodos de enjambrazón. En las especies clasificadas en esta categoría, la vida de la colonia está limitada por la disponibilidad del sustrato de nidificación, y el desarrollo individual es altamente flexible o totipotencial;
- 2) **nidificadoras de piezas separadas**, que incluye a las familias Hodotermitidae, Serritermitidae y algunas especies de las familias Rhinotermitidae y Termitidae (Evans, 2011), se caracterizan por construir su sitio de nidificación en un lugar y forrajear en otros lugares fuera de la colonia;

los obreros deben salir del nido, en algunos casos acompañadas de soldados (Traniello, 1981), en búsqueda de alimento, de modo que la vida de la colonia no está limitada por el sustrato donde está alojada. Estas poseen una baja flexibilidad de desarrollo, ya que todas sus castas son terminales; y

- 3) **nidificadoras de piezas intermedias**, que incluye a las termitas de las familias Mastotermitidae y algunas especies de las familias Rhinotermitidae y Termitidae, se caracterizan por anidar y alimentarse del mismo sustrato, pero una vez que el sustrato se agota se pueden mover a otro sustrato (Eggleton y Tayasu, 2001); estas termitas se caracterizan por poseer obreros verdaderos (Evans, 2011).

1.2.1.2. Rol ecológico de las termitas

Las termitas son consideradas económicamente perjudiciales para la actividad humana, debido al daño que pueden causar en viviendas, muebles, árboles y embalajes de exportaciones (Ramírez y Lanfranco, 2001). Sin embargo, existe un desconocimiento generalizado acerca de su función ecológica en los flujos de materia y energía del suelo (Cabrera y Parra, 1998), que comprenden los cambios cuantitativos en el proceso de descomposición y degradación de la madera, compuestos celulósicos y reciclaje de nutrientes (Eggleton, 2000).

Las termitas exhiben varias características que subrayan su potencial como **taxón bioindicador**, entre las cuales se encuentran:

- distribución;
- abundancia;
- posibilidad de utilización de protocolos de muestreo estándares; y

- tiempo de respuesta corto a trastornos antrópicos (Brown Jr, 1997; Vasconcellos y col., 2010).

La relevancia de las termitas en los ecosistemas está relacionada principalmente con su abundancia (Lee y Wood, 1971), ya que la gran cantidad de individuos que componen las colonias permiten que las termitas tengan un impacto considerable en distintos aspectos ecológicos. Por ejemplo:

- 1) son una fuerza importante de alimento para una gran variedad de depredadores, invertebrados (arañas, escorpiones, ácaros, ciempiés, chinches, escarabajos, hormigas, avispas) y vertebrados (ranas, salamandras, lagartos, aves, mamíferos) (Deligne y col, 1981);
- 2) son unos de los agentes de degradación de materia orgánica más importantes, acelerando su incorporación a los ciclos del carbono y del nitrógeno. En zonas tropicales las termitas son los principales agentes incorporadores de materia orgánica al suelo, en reemplazo de las lombrices, llegando a superar los mil individuos por metro cuadrado (Eggleton y col., 1996);
- 3) modifican el suelo de distintas formas, tales como: la alteración física de los perfiles del suelo, cambios en la textura, cambios en su naturaleza y distribución de la materia orgánica, cambios en la distribución de las plantas, cambios en sus niveles de aireación debido a la construcción de galerías subterráneas;
- 4) su saliva contiene hormonas que juegan un papel importante en cuanto a la selección y estimulación de la actividad microbiana (Lavelle y col., 2006); y

5) son una importante fente natural de metano junto con otros animales consumidores de celulosa (Rumiantes), pantanos y procesos de descomposición anaeróbicos (Watson y col., 1992). El metano es un gas de efecto invernadero de gran importancia, puesto que su potencial calorífico es 23 veces mayor que el del dióxido de carbono (Spokas y col., 2006). Este es muy abundante y representa un 18% de los gases de efecto invernadero del planeta; se ha estimado que las termitas emiten entre 3 y 19% del metano mundial (Bignell y col. 1997).

Las termitas poseen una función principalmente descomponedora, debido a su actividad detritívora (consumidoras de tejido muerto) (Cabrera y Parra, 1998). Considerando lo anterior, Myles (2000) comenta la existencia de diversas líneas de investigación orientadas a utilizar en forma comercial la función descomponedora de desechos orgánicos de las termitas. Los mismos autores acuñan el término termiticultura, definido como la forma de utilizar la gran biomasa de termitas, especialmente importante en los trópicos, para actividades tales como acuicultura y avicultura, como una fuente alternativa de alimentos (Ramírez y Lanfranco, 2001).

1.2.2. Hidrocarburos cuticulares aislados desde termitas y su rol en el reconocimiento entre individuos

Los hidrocarburos cuticulares en termitas suelen ser compuestos alifáticos saturados, metil-ramificados e insaturados, con una longitud de cadena entre 21 y 37 átomos de carbono (Lockey, 1988). Se ha propuesto que las variaciones en el número de carbonos de los hidrocarburos cuticulares estarían inversamente correlacionadas con la humedad presente en los ambientes donde viven (Lockey, 1988). De hecho, el

largo de cadena puede llegar a 42 átomos de carbono en termitas de zonas desérticas (Akino, 2006).

El fenómeno de reconocimiento basado en la composición de los hidrocarburos cuticulares puede ser modulado por el entorno. Van Zweden y d'Ettorre (2010) han informado que las termitas nidificadoras de múltiples piezas, con amplias posibilidades de interactuar con individuos provenientes de otras colonias, desarrollan señales menos dependientes del entorno que les permiten identificar eficientemente a sus compañeros de nido.

Clément & Bagnères (1998) han sostenido que los hidrocarburos presentes en la cutícula de las termitas (Blattodea), al igual que en Hymenoptera, juegan un rol importante en el reconocimiento entre compañeros de nido. Por otra parte, Howard y Blomquist (2005) y Van Zweden y D'Ettorre (2010) muestran que los hidrocarburos cuticulares también pueden servir como señales de reconocimiento entre distintas castas.

Aguilera y col. (2016) entrega una primera aproximación de la influencia de los compuestos cuticulares en la identificación y reconocimiento de distintos individuos de *N. chilensis*, ya que en esa oportunidad no se encontraron diferencias cualitativas en los compuestos cuticulares de *N. chilensis*. Esta conclusión se determinó a partir de bioensayos químicos en función de la conducta que presentaba el soldado hacia otras castas o individuos.

En relación a lo anterior, Thorne (1982), Traniello y Beshers (1985) y Schuurman y Dangerfield (1995), sugieren que los obreros son probablemente los primeros en combatir en conflictos intra-específicos, mientras que los soldados están más involucrados en encuentros inter-específicos en termitas. Coherente con esta

propuesta, las obreras de *Macrotermes falciger* muestran la habilidad de discriminar no solo entre compañeros y no compañeros de nido, sino también entre diferentes tipos de no compañeros de nido (Kaib y col., 2002).

Howard y col. (1982) encontraron variaciones cuantitativas en los hidrocarburos cuticulares para las diferentes castas de *R. virginicus*, pero no observaron diferencias cualitativas en los hidrocarburos presentes en la cutícula de dichas termitas. Resultados similares fueron reportados por Blomquist y col. (1979) para *Zootermopsis angusticollis* y por Howard y col. (1978) para *Reticulitermes flavipes*.

1.2.3. Las termitas en Chile

En Chile, se han descrito cinco especies de termitas, cuatro nativas y una introducida (Rippa y Luppichini, 2004). La especie introducida *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae), es la única representante de esta familia en nuestro país, con un rango de distribución entre las Regiones de Valparaíso y del Libertador Bernardo O'Higgins, y fue introducida a fines de los años 70 (Rippa y Luppichini, 2004).

Las especies nativas son: *Cryptotermes brevis* (Kalotermitidae), denominada la "termita de los muebles", que habita desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región de Valparaíso (Rippa y Luppichini, 2004); *Kalotermes gracilignathus* (Kalotermitidae), distribuida en el Archipiélago de Juan Fernández e Isla de Pascua (Rippa y Luppichini, 2004); *Porotermes quadricollis* (Termopsidae), descrita entre la Región de Valparaíso y la Región de Aysén; y *Neotermes chilensis* (Kalotermitidae), descrita entre las Regiones de Atacama y del Libertador Bernardo O'Higgins (Artigas, 1994; Rippa y Luppichini, 2004).

La especie endémica *N. chilensis* es una termita nidificadora de una pieza cuyas colonias no superan algunos cientos de individuos (Camousseight, 1999). Constituye un importante problema en construcciones de maderas exóticas en su área de distribución (Artigas, 1994; Ripa y Luppichini, 2004).

Su ciclo de vida incluye la presencia de pseudo-obreras (Camousseight, 1999). Su hábitat natural son ramas secas de espino (*Acacia cavens*), molle (*Schinus latifolius*), tallos florales secos de chagual (*Puya chilensis*), etc. (Ripa y Luppichini, 2004). El período de enjambrazón de esta especie ocurre desde mediados de diciembre hasta febrero (primavera-verano) especialmente durante las horas crepusculares y nocturnas; sin embargo, se ha observado en la Región de Valparaíso que la enjambrazón ocurre principalmente en marzo y en menor medida durante abril (Ripa y col., 2004).

1.2.4. El problema de estudio

El problema general de estudio está relacionado con la comunicación química y el reconocimiento entre compañeros de nido en *N. chilensis*. Considerando los antecedentes expuestos previamente, la capacidad de comunicación en insectos eusociales es fundamental para la sobrevivencia de la colonia; sin embargo, esta ha sido muy poco estudiada en termitas. Una primera aproximación de los componentes que se pueden encontrar en la cutícula de *N. chilensis* y la importancia de estos (principalmente hidrocarburos) en la comunicación entre individuos fue abordada por Aguilera y col. (2016). Sin embargo, estos no encontraron diferencias significativas entre castas. Es por ello que en este seminario de título se explora en mayor profundidad la función de los hidrocarburos cuticulares como mediadores de la comunicación y reconocimiento en *N. chilensis*.

Se estudiarán los perfiles cuticulares de *N. chilensis* mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la implementación de técnicas estadísticas multivariantes. Se utilizarán individuos pertenecientes a cuatro castas (pseudo-obreras, soldados, alados y reproductores primarios) provenientes de dos sitios de recolección (cuestas Las Chilcas y La Dormida).

A partir de los datos se determinará si existen diferencias cualitativas en los perfiles de hidrocarburos cuticulares utilizando Escalamiento Multidimensional y/o diferencias cuantitativas mediante análisis de componentes principales (PCA) y también cómo estas eventuales diferencias se relacionan con comunicación y reconocimiento entre compañeros de nido.

1.3. Hipótesis

- *N. chilensis* presentará diferencias cualitativas y/o cuantitativas respecto a los compuestos presentes en la cutícula entre individuos de distintas castas.
- *N. chilensis* presentará diferencias cualitativas y/o cuantitativas respecto a los compuestos presentes en la cutícula entre individuos de distinto sitio de recolección.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Determinar si en *N. chilensis* existen diferencias cualitativas y/o cuantitativas en el contenido de compuestos químicos cuticulares entre diferentes castas y sitios de recolección, mediante la utilización de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

1.4.2. Objetivos Específicos

- Extraer compuestos cuticulares de diferentes individuos de *N. chilensis*.
- Identificar los compuestos cuticulares mediante GC-MS.
- Estudiar las diferencias cualitativas y cuantitativas entre perfiles químicos a nivel de castas en *N. chilensis*.
- Estudiar las diferencias cualitativas y cuantitativas entre perfiles químicos de *N. chilensis* en relación a su localidad de colecta.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de nidos y sitios de muestreo

Se utilizaron colonias de *N. chilensis* en tallos florales (escapos) secos de chagual, *Puya chilensis* (Bromeliaceae), que se encontraron en laderas rocosas de cerros de exposición norte (Gajardo, 1994).

Las colonias fueron muestreadas en dos sitios de la Región de Valparaíso: Cuesta Las Chilcas ($32^{\circ} 52'S$; $70^{\circ} 52'W$; $N= 5$) y Cuesta La Dormida ($33^{\circ} 04'S$; $71^{\circ} 01'W$; $N= 2$), separadas por 30 km aproximadamente (Fig.2). Los sitios de recolección presentan una vegetación de tipo bosque esclerófilo y matorral, típico de la zona central de Chile, cuyas especies características son el espino (*Acacia caven*), el algarrobo (*Prosopis chilensis*), el chagual (*Puya chilensis*) y el palhuén (*Adesmia arborea*) (Gajardo, 1994).



Figura 2: Ubicación de los sitios de extracción: Cuesta Las Chilcas y Cuesta La Dormida, Región de Valparaíso, Chile.

Los escapos secos de chagual fueron recolectados en Febrero, durante el período de enjambrazón de *N. chilensis* (Diciembre-Abril) (Ripa y col., 2004). La selección de escapos que potencialmente contenían colonias de *N. chilensis* fue realizada por simple observación, basándose en los siguientes criterios:

- la inflorescencia debe estar seca (Fig. 3a);
- el escapo debe ser de color café oscuro-gris (Fig. 3b); y
- la corteza muestra agujeros irregulares y alargados (Fig. 3b).

Debido a que las colonias de *N. chilensis* se encuentran preferentemente en la base de los escapos de *P. chilensis*, estos fueron extraídos completamente de la planta con la ayuda de formón, hacha y motosierra. Una vez extraídos, los escapos fueron almacenados individualmente dentro de una bolsa de tul, tamaño del poro 0,3 mm para evitar la pérdida de individuos (Fig. 3c), y llevados al laboratorio en Santiago. En el laboratorio, los nidos fueron almacenados en una sala de crianza, en oscuridad a una temperatura de $17\pm 1^{\circ}\text{C}$ para evitar la salida de alados, donde se mantuvieron por un periodo que no excedió los dos meses, desde la extracción de los escapos hasta la recolección de los individuos.



Figura 3: Criterios de selección de escapos y medio de transporte de nidos al laboratorio en Santiago: a) Escapos florales secos de *Puya chilensis*; b) agujeros realizados por *N. chilensis* en escapos; c) Ejemplo de escapo en bolsa de tul.

2.2. Análisis químico

2.2.1. Recolección de individuos

Los escapos recolectados (N=26), fueron disecados utilizando punzón y cuchillo y los individuos encontrados en su interior fueron extraídos utilizando pinzas entomológicas que fueron lavadas con *n*-pentano *p.a.* cada vez que se extraía un nuevo individuo, con el objetivo de evitar el intercambio o contaminación cruzada de compuestos cuticulares; en el total de escapos analizados (N=26) solo se encontraron 7 colonias que cumplían con las condiciones necesarias para el análisis, en términos de presencia de individuos para cada casta. De cada colonia (N=7) se extrajeron: 2

reproductores primarios (RP): estos son solo dos en cada colonia y poseen una coloración café oscura característica; 5 pseudo-obreras (PO): son los individuos más abundantes en las colonias y poseen coloración café clara; 4 alados (A): son los únicos dentro de la colonia que poseen alas; y 3-4 soldados (S): son la minoría en la colonia y se caracterizan por tener mandíbula y cabeza prominentes. Se obtuvo así un total de 101 individuos, 73 de ellos de la Cuesta Las Chilcas y 28 de la Cuesta La Dormida. Estos individuos fueron separados por casta y colonia en placas Petri para posteriormente extraer sus compuestos cuticulares. Cabe hacer notar que, cuando fue posible (es decir para todas las castas menos para reproductores primarios) las muestras incluyeron réplicas biológicas, es decir, individuos de una casta determinada, genéticamente emparentados y provenientes de una misma colonia.

2.2.2. Extracción de compuestos cuticulares

Los compuestos cuticulares fueron extraídos sumergiendo individualmente cada termita en un frasco de vidrio de fondo cónico y tapa rosca con 250 μL de *n*-pentano *p.a.* durante 10 min. El extracto fue trasvasiado mediante una micro jeringa de 250 μL a ampollas selladas y almacenadas en el congelador (-16°C). El análisis de compuestos cuticulares fue llevado a cabo utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

2.2.3. Extracto maestro e inyección en GC-MS

Con el propósito de aumentar la intensidad de los picos cromatográficos y de obtener en un solo cromatograma la totalidad de los posibles compuestos presentes en la cutícula de los individuos, se diseñó un **extracto maestro**. Este se preparó mezclando 5 μL de cada extracto individual en un frasco de vidrio de fondo cónico y

tapa rosca, evaporando a sequedad utilizando N_2 y posteriormente reconstituyendo en 100 μ L de *n*-pentano *p.a.*. Esto permitió concentrar la muestra, facilitando así la selección e identificación de los compuestos cuticulares.

Posteriormente se inyectaron por separado 5 μ L del extracto maestro, 5 μ L de cada uno de los extractos individuales (101) y 5 μ L de una mezcla patrón de hidrocarburos alifáticos (C_{17} - C_{33}), en un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-2010 Plus) acoplado a un espectrómetro de masas (MS-QP2010 Ultra); Gas portador: Helio ultra puro (flujo de 0,78 mL/min); provisto de una columna capilar (Restex: Rtx-5MS de 30 m de longitud x 0,25 mm diámetro x 0,25 μ m de poro fase estacionaria (5% difenil - 95% dimetil polisiloxano-apolar).

El GC-MS fue operado en el modo de inyección “*splitless*”. El programa de temperatura utilizado fue: temperatura inicial del horno 146°C, que se mantuvo durante 8 minutos; posteriormente, se realizó un ascenso de la temperatura a razón de 3°C/min hasta llegar a 280°C, temperatura en la que se mantuvo durante 5 min. El programa de temperatura tiene una duración corrida de 57,67 min y las temperaturas del puerto de inyección y la interfase fueron 250°C y 280°C, respectivamente. El espectrómetro de masas fue usado en el modo de ionización por impacto de electrones (70 eV) con una corriente de emisión de 250 mA y operado en modo “SCAN”.

2.2.4. Análisis cromatográfico e identificación de compuestos cuticulares

Una vez obtenido el cromatograma maestro, se definieron 27 picos (Fig. 5) tomando en cuenta el porcentaje de área total que cada uno representaba (>0,12%) y su representatividad en la totalidad de los cromatogramas analizados (mayor a 15%).

Estos fueron analizados utilizando el programa GC-MS solution (www.shimadzu.com) y fueron identificados de acuerdo a los siguientes criterios:

- La mezcla patrón de hidrocarburos (HC) alifáticos estándar (C₁₇-C₃₃), fue utilizada para comparar los espectros de masas y los tiempos de retención de estos compuestos con el espectro de masa de los picos seleccionados.
- La mezcla patrón de HC, se utilizó para calcular el Índice de Kovats para cada pico cromatográfico; estos fueron comparados con valores informados en la base de datos Pherobase (www.pherobase.com), NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>) y con valores informados en literatura.
- Se compararon los espectros de masas correspondientes a cada pico cromatográfico con aquellos presentes en la librería NIST2014 en el programa GC-MS solution.
- Se realizó un análisis del patrón de fragmentación de cada compuesto para determinar si existían ramificaciones o insaturaciones características en la molécula que permitan identificarla.
- Ante la posible presencia de dobles enlaces, se realizó un procedimiento de derivatización con dimetildisulfuro (DMDS) según el método descrito por Francis y Veland (1981) con 100µL del extracto maestro, con el objetivo de determinar la existencia y localización de la(s) posible(s) insaturación(es) en la cadena hidrocarbonada.

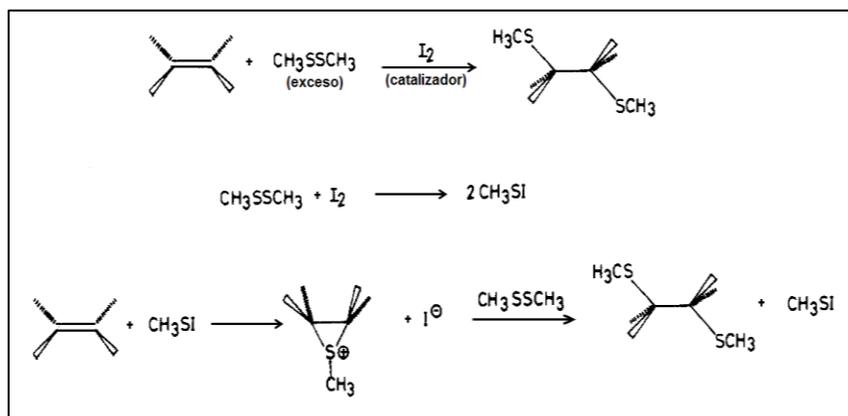


Figura 4: Reacción de derivatización con dimetildisulfuro (DMDS).

A partir de los picos seleccionados, se estableció la presencia o ausencia y la abundancia relativa de dichos compuestos en los cromatogramas individuales, a través del tiempo de retención, espectro de masas, y su forma y posición relativa en el cromatograma individual.

2.3. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos, se realizaron dos tipos de análisis: un análisis cualitativo que tomó en cuenta la presencia o ausencia de cada compuesto en cada extracto, y uno cuantitativo que tomó en cuenta la proporción de cada compuesto en cada extracto.

Cabe señalar que el estadístico F, mide la relación entre las varianzas observadas y se utiliza para determinar si la prueba es estadísticamente significativa. F varía en función de los grados de libertad, si el valor es mayor al valor crítico (Para $F_{(1, 100)} = 3,94$ y $F_{(3, 100)} = 2,70$) indica que los valores obtenidos son estadísticamente significativos. Mientras el estadístico p mide la significación estadística del análisis,

indicando que tan confiable son los resultados obtenidos, si $p \leq 0,05$ refleja diferencias estadísticas significativas (no azarosas). Ambos (F y p) son complementarios y deberían apuntar al mismo resultado.

2.3.1. Análisis cualitativo

Se realizó un análisis multivariado denominado escalamiento multidimensional. Para esto se utilizaron los datos binarios de presencia o ausencia (1 y 0 respectivamente), de los compuestos encontrados en cada cromatograma. Con estos datos y mediante el programa estadístico PAST (folk.uio.no/ohammer/past), se calculó una matriz utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard.

A partir de la matriz de similitud calculada anteriormente, se realizó un escalamiento multidimensional que asigna a cada individuo posiciones específicas en un espacio conceptual (plano cartesiano). Así, la posición en este plano estará dada por un par de coordenadas denominadas “dimensiones”, de modo que las distancias entre los individuos (puntos) concuerden al máximo con las similitudes y/o disimilitudes cualitativas entre ellos (Álvarez, 1999). Regularmente se utilizan 2 o 3 dimensiones que dependen de los factores que afecten la posición del objeto. La orientación real de los ejes es arbitraria ya que las distancias entre los individuos seguirán siendo las mismas. La magnitud y el signo de las coordenadas de cada individuo en el plano no tiene más sentido que el señalar la distancia entre ellos, y por lo tanto su grado de similitud o diferencia. Para realizar este análisis se utilizó el programa STATISTICA®10 (www.statsoft.com) utilizando los datos cualitativos (presencia o ausencia) de los cromatogramas individuales.

Las coordenadas generadas del escalamiento multidimensional (dimensión 1 y dimensión 2), que reflejan la posición relativa de los individuos, fueron analizadas estadísticamente con un ANOVA de dos vías [Factor 1: Casta (PO; A; S; RP); Factor 2: Sitio (Las Chilcas (LC) y La Dormida (LD))], a través del programa estadístico SigmaPlot 12 (www.systat.com). Luego, se realizó una prueba Exacta de Fisher, considerando un nivel de significancia $p \leq 0,05$, con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas en presencia/ausencia de cada uno de los compuestos cuticulares entre las castas de *N. chilensis* utilizando el programa estadístico R (www.r-project.com).

2.3.2. Análisis cuantitativo

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), utilizando las abundancias relativas de los compuestos y en cada individuo. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa STATISTICA10® (www.statsoft.com).

El PCA es una técnica multivariada que retiene aquellas características del conjunto de datos que contribuyen más a su varianza, buscando sintetizar la mayor parte de la información original a través de la generación de componentes principales (Factores). La varianza de mayor tamaño es capturada en el primer eje (Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande corresponde al segundo eje y así sucesivamente (Rodríguez, 2010). En este caso, se definieron dos Factores que representan una agrupación de compuestos cuticulares.

El PCA construye una transformación lineal que genera un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos (individuos), de modo que las distancias entre los individuos concuerden al máximo con las semejanzas y/o diferencias

cuantitativas entre ellos (Rodríguez, 2010). Luego, estas coordenadas fueron analizadas con un ANOVA de dos vías [Factor 1: Casta (PO; A; S; RP); Factor 2: Sitio (Las Chilcas (LC) y La Dormida (LD))], utilizando el programa SigmaPlot 12 (www.systat.com); de esta manera se evaluaron diferencias cuantitativas entre las castas y/o sitios de colecta, en función a la abundancia relativa de los compuestos cuticulares.

Por último, se realizó un ANOVA de 1 vía [Factor: Casta (PO; A; S; RP)] para determinar si existen diferencias en la composición de cada uno de los compuestos cuticulares entre las castas de *N. chilensis*. Los análisis se realizaron en SigmaPlot 12 (www.systat.com).

III. RESULTADOS

3.1. Identificación de compuestos cuticulares de *N. chilensis*

En la cutícula de *N. chilensis* fueron detectados e identificados 27 compuestos (Tabla 1; Fig. 5), todos hidrocarburos (desde C₁₈ hasta C₃₀), entre los cuales se encuentran 19 metilalcanos, siete *n*-alcanos y un *n*-alqueno.

Tabla 1: Hidrocarburos cuticulares presentes en el extracto maestro de *N. chilensis*.

# Pico	IK	Compuesto	Método de identificación ^a	Abundancia relativa (% área)
1	1780	3-metilheptadecano	IK; B	0,19
2	1783	metilheptadecano	IK; B; M	0,18
3	1838	9-metiloctadecano	IK; B	0,48
4	2267	2-metildocosano	IK	0,15
5	2276	3-metildocosano	IK	0,46
6	2302	tricosano	IK; B; M; Es	1,65
7	2342	7-metiltricosano	IK	0,17
8	2366	2-metiltricosano	IK; B; M	1,21
9	2375	3-metiltricosano	IK	1,37
10	2401	tetracosano	IK; B; M; Es	1,33
11	2438	metiltetracosano	IK	0,74
12	2465	2-metiltetracosano	IK; B; M	7,31
13	2502	pentacosano	IK; M; Es	19,08
14	2538	11-metilpentacosano	M; IK	15,98
15	2550	5-metilpentacosano	IK	0,67
16	2565	2-metilpentacosano	IK	1,20
17	2575	3-metilpentacosano	IK	5,93
18	2601	hexacosano	IK; B; M; Es	3,76
19	2635	metilhexacosano	IK	2,84
20	2653	5-metilhexacosano	IK	0,30
21	2663	2-metilhexacosano	IK	1,26
22	2701	heptacosano	IK; M; Es	11,68
23	2734	metilheptacosano	IK	13,23
24	2801	octacosano	IK; B; Es	1,43
25	2829	metiloctacosano	IK	0,68
26	2901	nonacosano	IK; B; M; Es	6,51
27	2998	1-triaconteno	IK	0,21

^a Es . Compuesto Estándar; IK . Índice de Kovats; B . Biblioteca de GC-MS; M . Espectro de masas.

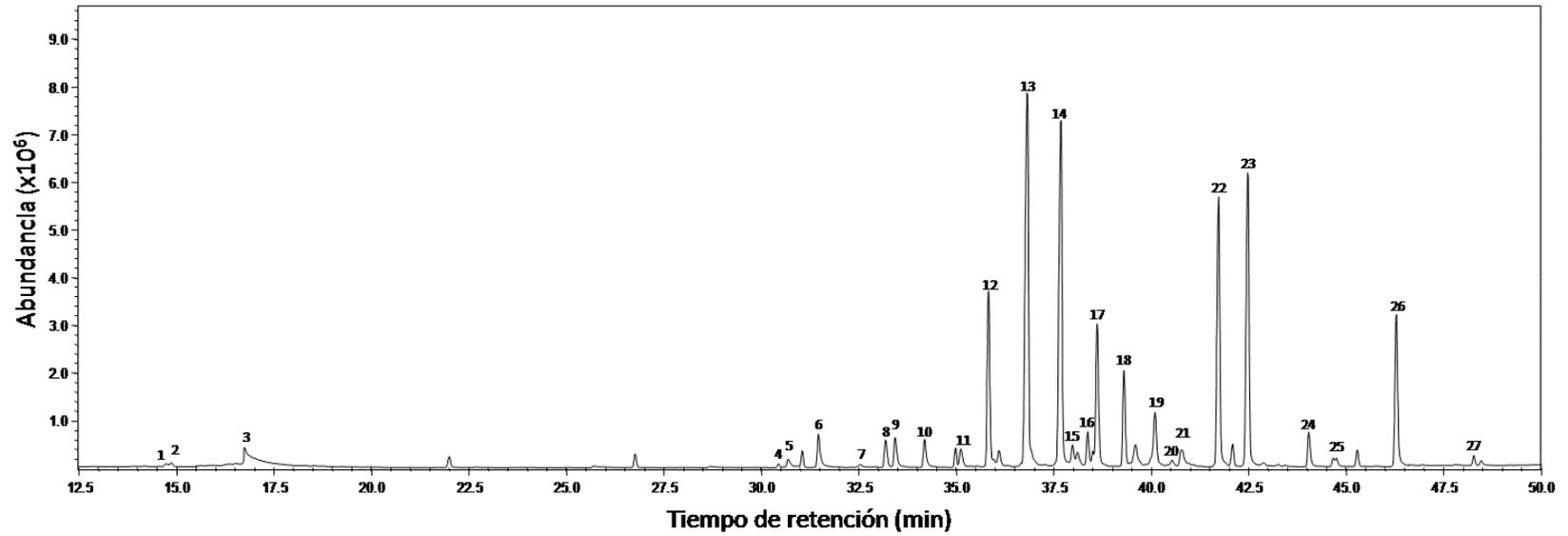


Figura 5: Cromatograma maestro y compuestos cuticulares identificados. Los números sobre cada pico corresponden a los de la tabla 1.

La tabla 2 arroja una primera aproximación de las diferencias cuantitativas entre castas ya que se observan diferencias entre los promedios de abundancias relativas entre estas. Sin embargo, los altos valores de desviación estándar presentados afectan la representatividad del promedio, ya que este deja de ser característico de la muestra debido a la gran dispersión de los datos (presencia de valores de abundancias extremas dentro del grupo), lo que quita validez a la primera inferencia realizada. La desviación estándar permite conocer el comportamiento en términos de abundancia relativa de los individuos dentro de una misma casta. Se considera que una desviación estándar es alta si su valor es mayor o igual a la mitad del promedio lo que se cumple en la gran mayoría de los datos entregados por la tabla 2; esto indica una alta heterogeneidad de los datos. También es posible observar que la desviación estándar en los compuestos más abundantes son generalmente pequeñas en comparación con la de los compuestos menos abundantes, que son considerablemente mayores, a partir de esto sería posible inferir que los compuestos más abundantes en el maestro generalmente se encuentran en cantidades similares dentro de cada casta (intracasta), mientras que los picos menos abundantes en este, presentan una mayor variación en las cantidades de compuestos que posean los individuos.

Tabla 2: Porcentaje promedio de abundancia relativa en hidrocarburos cuticulares presentes en los extractos de *N. chilensis*.

Localidad	Las Chilcas								La Dormida							
	^a PO (25)		^a A (20)		^a S (18)		^a RP (10)		^a PO (10)		^a A (8)		^a S (6)		^a RP (4)	
Compuesto	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.	^b %	^c ±Ds.
1	0,16	0,29	0,05	0,11	0,00	0,02	0,05	0,14	0,13	0,11	0,06	0,05	0,05	0,07	0,25	0,35
2	1,44	3,74	0,25	0,27	0,12	0,06	0,30	0,20	1,00	0,73	0,32	0,18	0,22	0,08	0,28	0,24
3	0,30	0,72	0,66	0,56	0,42	0,20	1,21	0,74	0,03	0,09	0,55	0,64	0,35	0,27	1,01	1,04
4	0,00	0,00	0,04	0,07	0,11	0,10	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,00	0,00
5	0,03	0,12	0,15	0,21	0,38	0,38	0,14	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,13	0,10	0,12
6	0,99	0,56	0,56	0,43	1,72	0,39	0,57	0,58	0,84	0,90	0,39	0,33	1,61	0,42	0,55	0,20
7	0,00	0,02	0,11	0,13	0,13	0,09	0,03	0,07	0,05	0,08	0,15	0,16	0,18	0,17	0,22	0,25
8	0,62	0,36	0,81	0,42	1,10	0,30	1,16	0,42	0,19	0,21	0,60	0,16	0,95	0,41	0,76	0,39
9	0,67	0,43	0,99	0,59	1,32	0,45	1,65	0,73	0,25	0,27	0,71	0,08	1,05	0,36	1,12	0,61
10	0,76	0,22	0,72	0,31	1,22	0,21	0,64	0,29	0,59	0,54	0,74	0,16	1,04	0,26	0,57	0,08
11	0,20	0,22	0,65	0,32	0,76	0,59	0,75	0,14	0,35	0,22	1,00	0,20	0,52	0,27	0,28	0,37
12	6,15	1,60	7,57	1,12	7,46	0,94	7,79	1,36	5,36	1,18	6,59	0,41	8,71	2,16	6,87	2,21
13	28,38	4,05	15,65	3,37	22,13	4,23	13,74	4,35	37,34	7,52	19,82	2,55	28,85	3,31	17,39	3,61
14	20,69	3,76	27,80	5,57	17,25	3,78	30,85	8,72	23,32	5,90	28,19	2,94	19,22	2,62	28,68	8,43
15	0,19	0,25	0,68	1,01	0,32	0,22	0,60	0,70	0,03	0,09	0,13	0,14	0,13	0,06	0,21	0,21
16	1,16	0,28	0,86	0,34	1,16	0,30	0,85	0,38	0,85	0,33	0,87	0,20	0,99	0,20	0,90	0,22
17	4,75	1,24	7,38	0,88	5,91	0,94	8,95	1,54	3,72	1,66	6,07	1,80	5,68	0,92	6,53	2,21
18	3,77	0,63	1,99	0,42	3,54	0,77	1,95	0,83	3,56	0,93	2,38	0,29	3,06	0,59	2,21	0,94
19	2,01	0,67	2,62	1,25	1,89	0,77	2,83	1,40	1,13	0,49	2,65	0,45	1,47	0,25	2,41	0,57
20	0,15	0,16	0,51	1,02	0,15	0,08	0,22	0,24	0,09	0,12	0,16	0,15	0,22	0,02	0,23	0,17
21	0,53	0,37	0,48	0,42	0,76	0,43	0,87	0,92	0,16	0,23	0,53	0,42	0,40	0,24	0,53	0,49
22	11,40	2,97	5,16	1,65	12,17	2,69	4,93	2,44	9,67	4,04	7,26	2,29	11,43	2,11	8,56	6,64
23	11,77	3,39	21,83	2,86	11,63	3,08	16,96	2,68	9,75	4,12	18,76	2,66	9,13	2,42	15,00	3,11
24	0,72	0,35	0,43	0,28	1,18	0,50	0,42	0,41	0,27	0,37	0,38	0,25	0,59	0,14	0,77	0,78
25	0,08	0,20	0,46	0,36	0,27	0,13	0,47	0,79	0,03	0,09	0,20	0,22	0,09	0,14	0,40	0,55
26	3,07	1,69	1,43	0,93	6,78	2,79	1,57	1,90	1,29	1,75	1,50	0,58	3,73	0,88	4,18	5,87
27	0,00	0,00	0,16	0,37	0,13	0,09	0,47	0,61	0,00	0,00	0,01	0,02	0,13	0,31	0,00	0,00

^a PO: pseudo-obrera; A: alado; S: soldado; RP: reproductor primario.

^b %: Porcentaje promedio de abundancia relativa.

^c ±Ds.: Desviación estándar porcentaje promedio abundancia relativa.

3.2. Análisis estadístico

3.2.1. Análisis cualitativo

La Figura 6 muestra la disposición relativa de los individuos en dos dimensiones luego de realizado el escalamiento multidimensional para sitios de estudio (Fig. 6A) y para castas (Fig. 6B), la ubicación de los puntos en el plano cartesiano se relaciona directamente con la similitud o disimilitud entre los individuos (puntos).

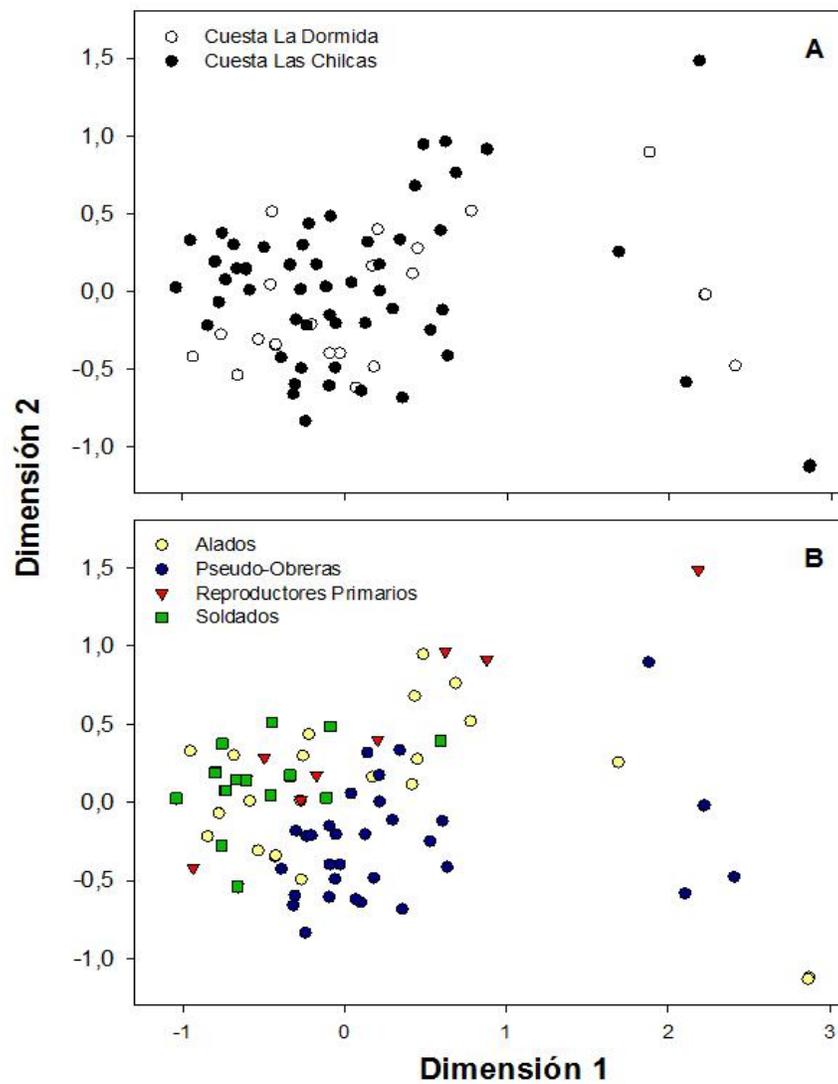


Figura 6: Escalamiento multidimensional en 2 dimensiones, para los sitios de recolección (A) y para las castas de *N. chilensis* (B).

El análisis de ANOVA de dos vías para la dimensión 1 del escalamiento multidimensional mostró que no existen diferencias significativas en el sitio de recolección ($F_{1, 100}$. 0,50; $p= 0,482$); sin embargo, existen diferencias significativas al nivel de castas ($F_{3, 100}$. 8,44; $p< 0,001$) y en la interacción entre ellas ($F_{3, 100}$. 2,98; $p= 0,035$; Fig. 7A).

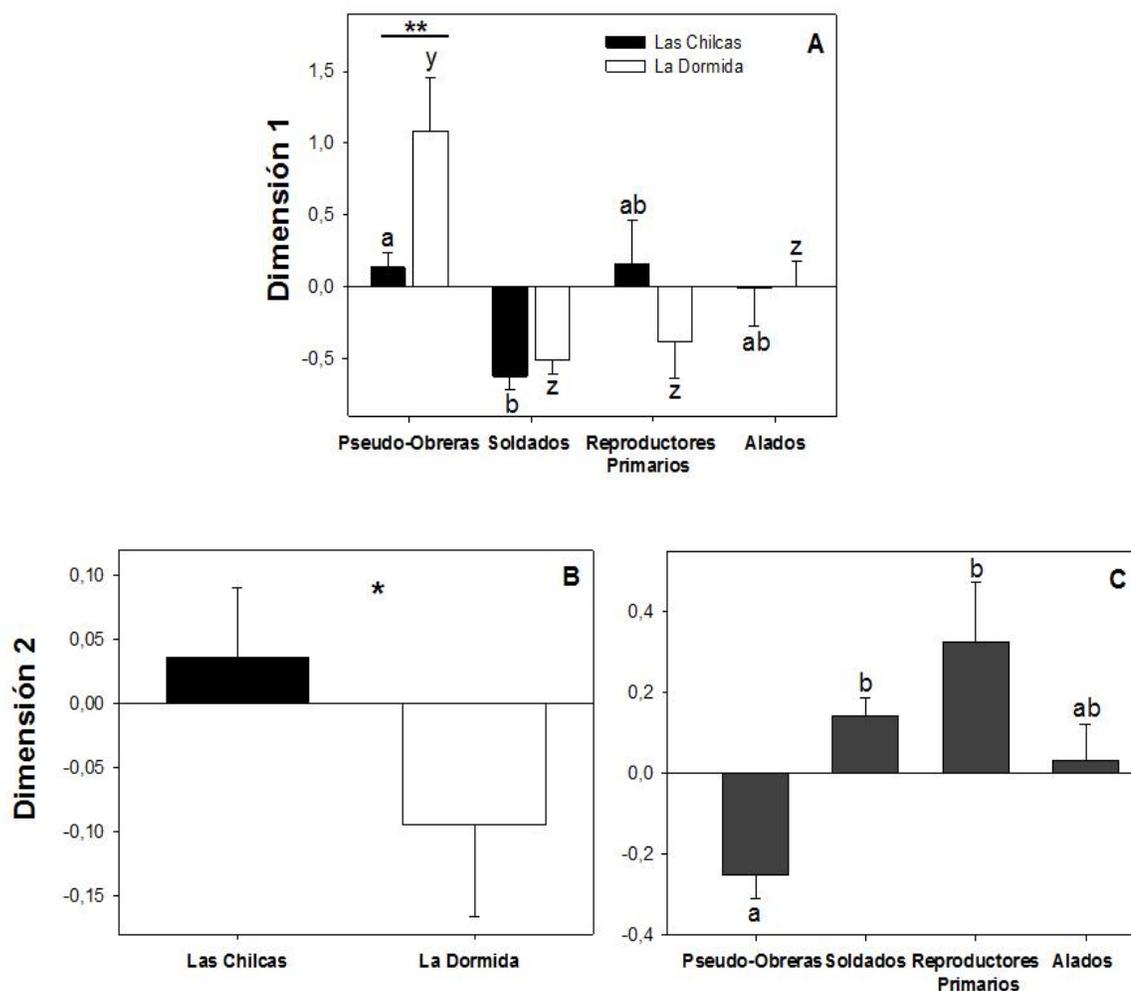


Figura 7: Resultados del análisis químico cualitativo para castas (pseudo-obreras, alados, soldados y reproductores primarios); y sitios (Las Chilcas y La Dormida) para la dimensión 1 (A) y la dimensión 2 (B,C) del escalamiento multidimensional. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p< 0,05$); en A, letras a,b,c denotan diferencias significativas dentro de Las Chilcas; mientras que las letras y,z dentro de La Dormida. *: $p< 0,05$; **: $p< 0,01$.

El análisis *a posteriori* (Holm-Sidak) mostró que las pseudo-obreras son distintas a las demás castas en La Dormida ($p < 0,05$), mientras que en Las Chilcas las pseudo-obreras se diferencian de los soldados ($p = 0,016$); además existieron diferencias significativas entre los sitios de colecta en las pseudo-obreras ($p = 0,002$).

El análisis de ANOVA de dos vías para la dimensión 2 mostró que existen diferencias significativas en el sitio de recolección ($F_{1, 100} = 5,12$; $p = 0,026$; Fig. 7B) y al nivel de castas ($F_{3, 100} = 4,29$; $p = 0,007$), existiendo diferencias significativas entre pseudo-obreras y reproductores primarios ($p = 0,018$) y entre pseudo-obreras y soldados ($p = 0,040$) (Fig. 7C). No se encontró diferencias significativas en la interacción entre castas y sitio de recolección ($F_{3, 100} = 2,57$; $p = 0,059$).

Dado que se encontraron diferencias significativas al nivel de castas en el escalamiento multidimensional para ambas dimensiones, se realizó una prueba exacta de Fisher para cada compuesto en particular entre individuos pertenecientes a cada una de las cuatro castas de *N. chilensis*. Éste arrojó que de los 27 compuestos encontrados en la cutícula de los individuos, los compuestos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 20, 25 y 27, son responsables de generar las diferencias cualitativas encontradas entre castas, ya que la presencia de o ausencia de éstos depende directamente de la casta de los individuos analizados ($p < 0, 05$). El análisis de Fisher también entrega un panorama interno de cada compuesto, es decir, permite asociar cual o cuales castas son responsables de generar estas diferencias, corroborando lo entregado por el escalamiento multidimensional. En la tabla 3 se muestran los resultados de esta prueba.

Tabla 3: Resultados de la prueba exacta de Fisher en el análisis cualitativo para distintas castas de *N. chilensis*.

# Pico	PO ^a			S ^a			RP ^a			A ^a			Valor p ^b	Representatividad
	P ^c	A ^d	N=35	P ^c	A ^d	n=26	P ^c	A ^d	n=28	P ^c	A ^d	n=14		
1	17	18	a	3	21	b	4	10	ab	11	17	ab	0,031	Baja presencia del compuesto en S (12,5% de los individuos)
2	34	1	a	23	1	a	12	2	a	24	4	a	NS	-
3	7	28	b	22	2	a	12	2	a	20	8	a	<0,001	Baja presencia del compuesto en PO (20% de los individuos)
4	0	35	a	16	8	c	3	11	b	7	21	b	<0,05	Compuesto ausente en todas las PO
5	2	33	a	19	5	c	4	10	b	10	18	b	<0,01	Baja presencia del compuesto en PO (5,71% de los individuos)
6	28	7	a	24	0	b	10	4	a	19	9	a	<0,05	Alta presencia del compuesto en S (100%)
7	4	31	a	18	6	b	5	9	ac	16	12	cb	<0,001	Baja presencia del compuesto en PO (11,4% de los individuos)
8	29	6	a	24	0	a	14	0	a	25	3	a	NS	-
9	29	6	a	24	0	a	14	0	a	25	3	a	NS	-
10	30	5	a	24	0	a	13	1	a	26	2	a	NS	-
11	23	12	a	23	1	a	12	2	a	25	3	a	NS	-
12	35	0	a	24	0	a	14	0	a	28	0	a	NS	-
13	35	0	a	24	0	a	14	0	a	28	0	a	NS	-
14	35	0	a	24	0	a	14	0	a	28	0	a	NS	-
15	16	19	a	21	3	b	10	4	ab	20	8	ab	0,007	Alta presencia del compuesto en S (87,5% de los individuos)
16	35	0	a	24	0	a	13	1	a	26	2	a	NS	-
17	35	0	a	24	0	a	14	0	a	28	0	a	NS	-
18	35	0	a	24	0	a	13	1	a	28	0	a	NS	-
19	34	1	a	23	1	a	13	1	a	26	2	a	NS	-
20	18	17	a	22	2	b	9	5	ab	17	11	b	<0,05	Alta presencia del compuesto en S (91,7% de los individuos)
21	25	10	a	23	1	a	9	5	a	20	8	a	NS	-
22	35	0	a	24	0	a	14	0	a	28	0	a	NS	-
23	35	0	a	24	0	a	14	0	a	28	0	a	NS	-
24	27	8	a	23	1	a	10	4	a	21	7	a	NS	-
25	6	29	a	18	6	b	6	8	ab	18	10	b	<0,001	Baja presencia del compuesto en PO (17,1% de los individuos)
26	28	7	a	24	0	a	10	4	a	24	4	a	NS	-
27	0	35	a	14	10	c	7	7	bc	7	21	b	<0,001	Compuesto ausente en todas las PO

^a PO: pseudo-obrera; A: alado; S: soldado; RP: reproductor primario. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$). Las letras "a", "b" y "c" fueron utilizadas para denotar diferencias significativas (letras distintas; $p < 0,05$) entre castas; ^b NS: No hay diferencias significativas entre castas de *N. chilensis*; ^c P: Número de individuos que poseen el compuesto; ^d A: Número de individuos que no poseen el compuesto.

3.2.2. Análisis cuantitativo

A partir del análisis de componentes principales (PCA), se determinó que los dos primeros factores explicaron en conjunto el 47,2% de la varianza. El primer factor representó el 24,43% de la varianza, la cual fue generada por un grupo de metilalcanos principalmente ramificados en diversos carbonos de la cadena principal, mientras que el segundo factor representó un 22,75% de la varianza, en este caso las diferencias entre castas, fueron generadas por un grupo de metilalcanos ramificados solo en los carbonos 2 o 3. En la Figura 8 se muestra la dispersión de individuos según sus coordenadas (en términos de factores 1 y 2) en un plano cartesiano según su sitio de colecta (Fig. 8A) y casta (8B).

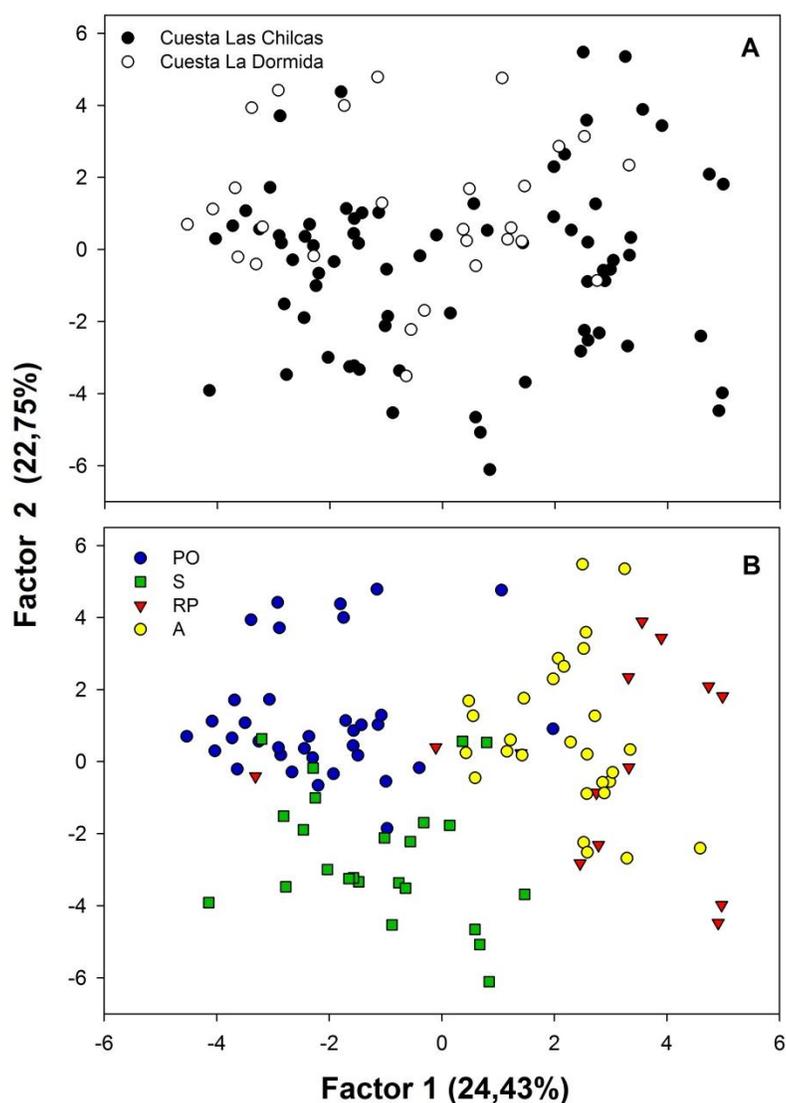


Figura 8: Análisis de componentes principales (PCA), para los sitios de recolección (A) y para las castas de *N. chilensis* (B); castas: pseudo-obreras (PO), alados (A), soldados (S) y reproductores primarios (RP).

El análisis de ANOVA de dos vías para el primer Factor arrojó diferencias significativas entre los sitios de recolección ($F_{1, 100} = 11,23$; $p = 0,001$; Fig. 9A) y entre castas ($F_{3, 100} = 53,66$; $p < 0,001$), donde las pseudo-obreras (PO) y soldados (S) se diferenciaron significativamente entre sí y de las demás castas ($p < 0,05$) (Fig. 9B). No se encontraron diferencias significativas en la interacción entre casta y sitio de

recolección ($F_{3, 100} = 2,31$; $p = 0,081$). El análisis de ANOVA de dos vías para el segundo Factor mostró diferencias significativas en el sitio de recolección ($F_{1, 100} = 8,79$; $p = 0,004$; Fig. 9C) y entre castas ($F_{3, 100} = 14,74$; $p < 0,001$), en donde los soldados se diferenciaron significativamente de las demás castas ($p < 0,05$) (Fig. 9D). No se encontraron diferencias significativas en la interacción entre casta y sitio de recolección ($F_{3, 100} = 0,80$; $p = 0,495$).

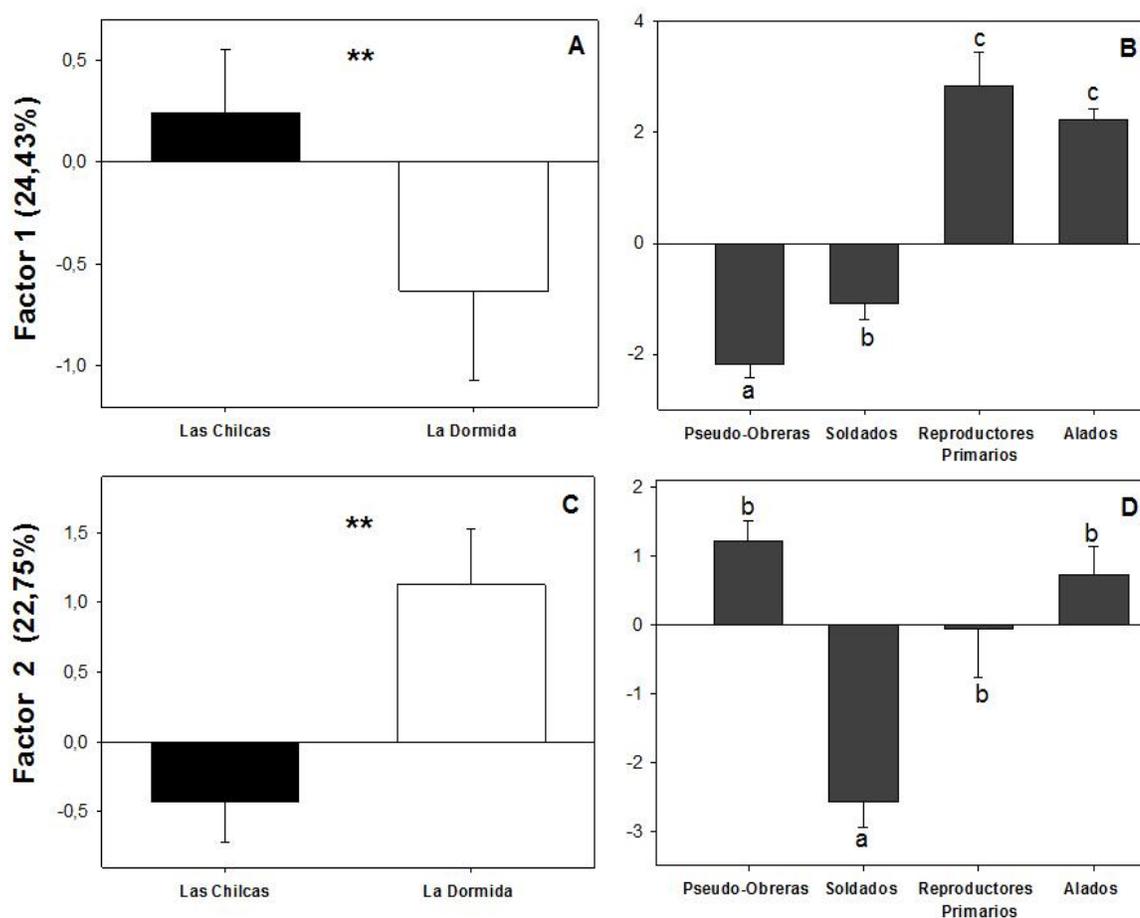


Figura 9: Resultados del análisis químico cuantitativo para los sitios Las Chilcas y La Dormida (A,C) y las castas pseudo-obreras, alados, soldados y reproductores primarios (B,D); para el Factor 1 (A,B) y el Factor 2 (C,D) del análisis de componentes principales (PCA). Las letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$). **: $p < 0,01$.

Dado que se encontraron diferencias significativas al nivel de castas (Figs. 9B,9D), se realizó un ANOVA de 1 vía para cada compuesto en particular entre individuos pertenecientes a cada una de las cuatro castas de *N. chilensis* (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados del ANOVA de una vía en el análisis cuantitativo para distintas castas de *N. chilensis*.

# Peak	PO ^a	S ^a	RP ^a	A ^a	Valor p	Abundancia relativa
1	a	b	ab	ab	0,019	
2	b	a	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en PO
3	b	a	a	a	<0,001	Menor abundancia del compuesto en PO
4	a	b	ab	ab	<0,001	
5	a	b	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en S
6	a	b	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en S
7	a	b	ab	b	<0,001	
8	a	c	c	b	<0,001	
9	b	a	a	a	<0,001	Menor abundancia del compuesto en PO
10	a	b	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en S
11	b	a	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en PO
12	b	a	a	a	<0,001	Menor abundancia del compuesto en PO
13	a	b	c	c	<0,001	
14	a	a	b	b	<0,001	
15	a	ab	ab	b	0,013	
16	ab	b	ab	a	0,007	
17	a	c	d	b	<0,001	
18	a	a	b	b	<0,001	
19	a	a	b	b	<0,001	
20	a	a	a	a	0,59	
21	a	a	a	a	0,24	
22	a	a	b	b	<0,001	
23	b	b	c	a	<0,001	
24	a	b	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en S
25	a	b	ab	b	<0,001	
26	a	b	a	a	<0,001	Mayor abundancia del compuesto en S
27	a	b	b	ab	<0,001	

^a PO: pseudo-obrera; A: alado; S: soldado; RP: reproductor primario. Las letras "a", "b" y "c" fueron utilizadas para denotar diferencias significativas (letras distintas; $p < 0,05$) entre castas.

IV. DISCUSIÓN

En la cutícula de *N. chilensis* se identificaron 27 hidrocarburos, que corresponden en su mayoría a metilalcanos (70,4%) y *n*-alcanos (25,9%), con una longitud de cadena que varía entre 18 y 30 átomos de carbono. En este contexto, la ausencia de hidrocarburos de cadenas particularmente largas en la cutícula de *N. chilensis* se debería a que esta termita no está expuesta a condiciones que impliquen una particular retención de humedad pues no se distribuye en zonas con condiciones desérticas y escasamente se expone al exterior, ya que es una especie nidificadora de una pieza.

Los compuestos encontrados en la cutícula de *N. chilensis* que fueron identificados en el extracto maestro concuerdan en gran medida con los compuestos descritos en el paper publicado por Aguilera y col. (2016), en aproximadamente un 65%. En ambos casos la mayoría de los compuestos identificados corresponde a hidrocarburos ramificados y *n*-alcanos. Las diferencias entre estos se pueden asociar al diseño experimental empleado por Aguilera y col. (2016), ya que la extracción de los compuestos cuticulares no se realizó inmediatamente extraídos los individuos del escapo, lo que pudo haber causado contaminación al estar en contacto con un entorno diferente al del nido. También se debe considerar que los individuos utilizados para elaborar el maestro, fueron bioensayados pudiendo afectar la presencia/ausencia de algún compuesto, así como las posibles variaciones generadas por el estado de la columna y el equipo utilizado (GC-MS).

Es interesante notar que el análisis cualitativo de la mezcla de hidrocarburos cuticulares en *N. chilensis* mostró diferencias gruesas entre castas. Más aún, la prueba *a posteriori* con cada uno de los hidrocarburos señaló cuáles son los compuestos que mayoritariamente contribuyen a establecer las diferencias globales encontradas entre castas. En efecto, las diferencias significativas entre PO y S y entre PO y RP pueden ser adscritas mayoritariamente al compuesto 3 (9-metiloctadecano), que diferencia PO de todas las otras castas, el compuesto 4 (2-metildocosano) y 5 (3-metildocosano), que diferencian entre PO y S y entre PO y RP, y también los compuestos 7 (7-metiltricosano), 15 (5-metilpentacosano), 20 (5-metilhexacosano) y 25 (metiloctacosano) que diferencian entre PO y S. Son todos compuestos que apoyan las diferencias globales significativas entre castas.

Por su parte, el análisis cuantitativo de la composición de la mezcla de hidrocarburos cuticulares en *N. chilensis* también mostró diferencias entre castas. La mayor riqueza de información en este análisis permitió distinguir diferencias más finas entre castas. En efecto, a nivel global se encontraron diferencias significativas entre PO y S, entre S y las demás castas, y entre (PO y S) y las demás castas. También en este caso pueden adscribirse estas diferencias mayoritariamente a algunos compuestos particulares. En efecto, los compuestos 1 (3-metilheptadecano), 2 (metilheptadecano), 7 (7-metiltricosano), 8 (2-metiltricosano), 13 (pentacosano), 14 (11-metilpentacosano), 17 (3-metilpentacosano), 25 (metiloctacosano) y 27 (1-triaconteno) diferencian entre PO y S, los compuestos 6 (tricosano), 10 (tetracosano), 13 (pentacosano), 17 (3-metilpentacosano), 24 (octacosano) y 26 (nonacosano) que diferencian entre S y las demás castas, y los compuestos 14 (11-metilpentacosano) y 17 (3-metilpentacosano) que diferencian entre (PO y S) y las demás castas.

El hecho de que tanto las pseudo-obreras como los soldados de *N. chilensis* se distinguen de las demás castas sugiere que ambas castas estarían involucradas en la defensa de la colonia.

En las termitas nidificadoras de una pieza, cabría esperar que las señales de reconocimiento fueran más dependientes del entorno. Este es el caso de *N. chilensis*, donde el análisis de componentes principales de la composición de hidrocarburos cuticulares arrojó diferencias cuantitativas significativas entre los sitios de recolección para los Factores 1 y 2, y el escalamiento multidimensional arrojó diferencias cualitativas entre los sitios para la dimensión 2.

Las diferencias encontradas entre los sitios de recolección pueden asociarse a las señales químicas que participan en el reconocimiento entre compañeros de nido. En general, se ha demostrado que estas señales en termitas pueden tener un origen endógeno y/o exógeno (Smith y Breed, 1995). Las endógenas son producidas por los individuos miembros de un nido y corresponden principalmente a compuestos químicos secretados por la cutícula (Hölldobler y Michener, 1980; Breed, 1998; Singer, 1998). Las señales exógenas corresponden a sustancias químicas externas absorbidas por la cutícula de los insectos que contribuyen a determinar el olor específico de la colonia (Hölldobler y Michener, 1980); estos olores pueden provenir del material del nido (Gamboa y col, 1986; Breed y col., 1988; Singer y Spelie, 1992) y/o de los alimentos (Smith y Breed, 1995).

Aunque la importancia de los hidrocarburos cuticulares como señales endógenas (Flores-Prado, 2012; Breed, 1998; Singer, 1998) ha quedado demostrada en este trabajo, no es descartable que, a pesar de ser una especie nidificadora de una pieza que vive en contacto con un único hospedero, el microentorno de los nidos

pueda proveer señales químicas exógenas que sean sitio-dependiente (Florane y col., 2004). Esto es posible de corroborar, elaborando un perfil de los posibles compuestos químicos que podría aportar el material de los distintos escapos sin individuos provenientes de diferentes sitios de recolección; de esta manera será posible determinar qué compuestos podrían ser aportados por el posible nido, ya sea de forma cuantitativa o cualitativa. Una vez obtenido este perfil se podrá determinar si estos compuestos varían en función del sitio de extracción del escapo. Finalmente, con esta información se podrá establecer los posibles aportes exógenos (sitio-dependientes) a la cutícula de *N. chilensis*.

V. CONCLUSIÓN

- Este trabajo ha confirmado la capacidad de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para abordar problemas ecológicos, generando perfiles de hidrocarburos cuticulares para individuos de la termita *N. chilensis* pertenecientes a distintas castas [pseudo-obreras (PO), soldados (S), reproductores primarios (RP) y alados (A)] y recolectados en dos sitios diferentes.
- Los perfiles de hidrocarburos cuticulares variaron en su composición cualitativa y cuantitativa en función de la casta y el sitio de recolección de los individuos y demostraron la complementariedad de los análisis cualitativos y cuantitativos.
- En líneas generales, se encontraron diferencias entre PO y S, entre PO y RP, entre S y las demás castas, y entre (PO y S) y las demás castas. Estas diferencias pueden ser asociadas a una función defensiva de los S y PO, por lo que deberían poseer un sistema de comunicación y reconocimiento particularmente desarrollado en comparación con las otras castas de *N. chilensis*.
- Las diferencias entre las castas pudieron ser adscritas a distintos compuestos.
- Por otra parte, se determinó que el entorno influye en la presencia y abundancia de los hidrocarburos en los perfiles cuticulares, poniendo en relieve la importancia del sustrato de nidificación.

VI. REFERENCIAS

- Abe, T. 1987. Evolution of the life types in termites. En: Evolution, coadaptation, and biotic communities (S. Kawano, J. H. Connell and T. Hidaka, Eds.). University of Tokyo Press, Tokyo, pp: 128-148.
- Aguilera, O. D., Burgos, L. C., Meléndez, W., Flores, P. L y Niemeyer, M. H. 2016. Chemical basis of nestmate recognition in a defense context in a one piece nesting termites. *Chemoecology*. 26, pp:163-172.
- Akino, T. 2006. Cuticular hydrocarbons of *Formica truncorum* (Hymenoptera: Formicidae): Description of new very long chained hydrocarbon components. *Applied Entomology and Zoology* 41, pp: 667-677.
- Álvarez, G.F. 1999. Algunas aportaciones al Análisis de Datos, utilizando técnicas de representación Multivariante. Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Matemáticas. Universidad de Cádiz, pp: 60-67.
- Artigas, J.N. 1994. Entomología Económica. Insectos de interés Agrícola, Forestal, Médico y Veterinaria, Vol. I. Ediciones Universidad de Concepción, Chile. 1126 p.
- Bee, M.A. 2006. Individual recognition in animal species. In: *The Encyclopedia of Language and Linguistics: Volume 2*. M Naguib (ed.). Elsevier Science, London, UK, pp: 617-626.
- Bignell, D.E., Eggleton, P., Nunes, L y Thomas, K.L. 1997. Termites as mediators of carbon fluxes in tropical forest: budgets for carbon dioxide and methane emissions. *Forests and insects*, 109134.
- Blomquist, G.J., Howard, R.W. y McDaniel, C.A. 1979. Structures of the cuticular hydrocarbons of the termites *Zootermopsis angusticollis* (Hagen). *Insect Biochem.*9, pp: 365-370.
- Breed, M.D., Fewell, J.H y Williams, K.R. 1988. Comb wax mediates the acquisition of nestmate recognition cues in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85, pp: 8766- 8769.
- Breed, M.D. 1998. Recognition pheromones of the honey bee. *Bioscience*. 48, pp: 463-470.
- Brown Jr, K.S. 1997. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. *J Insect Conserv* 1, pp: 25-42.
- Brown, T.L., Lemay Jr, H. E. y Bursten, B.E. 2004. *Química: la ciencia central* (9a ed.). Prentice Hall Hispanoamericana. México, pp: 406-414.
- Buczkowski, G y Silverman, J. 2005. Context-dependent nestmate discrimination and the effect of action thresholds on exogenous cue recognition in the Argentine ant. *Animal Behaviour*. 69, pp: 741-749.

- Cabrera, P y Parra, P. 1998. Defendamos nuestra madera. Santiago, Chile. INFOR (Instituto Forestal). Folleto de difusión. (<http://www.infor.cl/webinfor/revista/noviembre98/termita3.pdf>).
- Camousseight, A. 1999. Las termitas y su presencia en Chile. Santiago CONAF (Corporación Nacional Forestal), Chile. Nota Técnica (37), 8 pp.
- Clément, J.L y Bagnères, A.G. 1998. Nestmate recognition in termites. In: Pheromone Communication in Social Insects. Vander Meer, R. K., Breed, M. D., Espelie, K. E. and Winston, M. L. (eds.). Westview Press, Boulder, Colorado, USA, pp: 126-155.
- Deligne, J., Quennedey, A y Blum, M.S. 1981. The enemies and defense mechanisms of termites. *Social Insects* vol.2
- Eggleton, P. 2000. Global patterns of termites diversity. En: Abe, T., Bignell, E.D., Higashi, M. (eds.) *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 25-51.
- Eggleton, P. 2011. An introduction to termites: biology, taxonomy and functional morphology. En: Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N, (eds.). *Biology of Termites: A Modern Synthesis*, New York: Springer, pp. 1-26.
- Eggleton, P., Beccaloni, G e Inward, D. 2007. Response to Lo y col. *Biol. Lett.* 3, pp: 564–565.
- Eggleton, P., Bignell, D.E., Sands, W.A., Mawdsley, N.A., Lawton, J.H., Wood, T.G. y Bignell, N.C. 1996. The diversity, abundance, and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, southern Cameroon. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 351, pp: 51–68.
- Eggleton, P y Tayasu, I. 2001. Feeding groups, life types and the global ecology of termites. *Ecol. Res.* 16, pp: 941–960.
- Evans, T.A. 2011. Invasive termites. En: Bignell D.E., Roisin Y., Lo N. (Eds.). *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer Science Business Media, pp: 519-562.
- Fernández, E. I. 1999. Evolución de la Eusociabilidad en los Insectos. Sección V: Ecología Evolutiva. Universidad de Uppsala. *Bol. S.E.A.*, N°26, pp: 713-726.
- Florane, C. B., Bland, J. M., Husseneder, C y Raina, A. K. 2004. Diet-mediated inter-colonial aggression in the formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *J. Chem. Ecol.* 30, pp: 2559-2574.
- Flores, P.L. 2012. Evolución de la sociabilidad en Hymenoptera: Rasgos conductuales vinculados a niveles sociales y precursores de sociabilidad en especies solitarias. *Revista Chilena de Historia Natural* 85, pp: 245-266.
- Francis, G.W y Veland, K. 1981. Alkylthiolation for the determination of double-bond positions in linear alkenes. *J. Chromatogr. A.* 219, pp: 379-384.
- Gajardo, R. 1994. La vegetación natural de Chile. Clasificación y distribución geográfica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 165 p.

- Gamboa, G.J., Reeve, H.K., Ferguson, I.D y Wacker, T.L. 1986. Nestmate recognition in social wasps: The origin and acquisition of recognition odours. *Animal Behaviour* 34, pp: 685-695.
- Gomis, Y.V. 2008. Tema 5. Espectrometría de masas. Doctorado en Ingeniería Química. Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química. Recuperado el 17 de septiembre de 2017. <http://hdl.handle.net/10045/8249>, pp: 1-43.
- Gutiérrez, M.C y Droguet, M. 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (u.p.c.)* Nº 122, pp: 35-41.
- Harris, D.C. 2007. *Análisis Químico Cuantitativo (3ª edición)*, Editorial Reverte, SA, pp: 517-601.
- Haverty, M.I., Copren, K. A., Getty, G. M y Lewis, V. R. 1999. Agonistic behavior and cuticular hydrocarbon phenotypes of colonies of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) from Northern California. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, pp: 269-277.
- Haverty, M.I y Thorne, B.L. 1989. Agonistic behavior correlated with hydrocarbon phenotypes in dampwood termites, *Zootermopsis* (Isoptera: Termopsidae). *Journal of Insect Behavior*. 2, pp: 523-543.
- Hölldobler, B y Michener, C.D. 1980. Mechanisms of identification and discrimination in social Hymenoptera. In: *Evolution of social behavior: Hypotheses and empirical tests*. Weinheim, Verlag Chemie, pp: 35-58.
- Hölldobler, B y Wilson, E.O. 1990. *The Ants*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Howard, R.W y Blomquist, G.J. 2005. Ecological behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. 50, pp: 371-393.
- Howard, R.W., McDaniel, C.A. y Blomquist, G.J. 1978. Cuticular hydrocarbons of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Chem. Ecol.* 4, pp: 233-245.
- Howard, R.W., McDaniel, C.A., Blomquist, G.J., Gelbaum, L.T. y Zalkow, L.H. 1982. Cuticular hydrocarbons of *Reticulitermes virginicus* (banks) and their role as potential species- and caste- recognition cues. *J. Chem. Ecol.* 8, pp: 1227-1239.
- Hübschmann, H.J. 2008. Capítulo 2: Fundamentals. In *Handbook of GC/MS*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp:7-277.
- Kaib, M., Franke, S., Francke, W y Brandl, R. 2002. Cuticular hydrocarbons in a termite: phenotypes and a neighbour-stranger effect. *Physiol. Entomol.* 27, pp: 189-198.
- Kaib, M., Jmhasly, P., Wilfert, L., Durka, W., Franke, S., Francke, W., Leuthold, R.H y Brandl, R. 2004. Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*. *Journal of Chemical Ecology*. 30, pp: 365-385.

- Klass, K.D., Nalepa, C. A y Lo, N. 2008. Wood-feeding cockroaches as models for termite evolution (Insecta: Dictyoptera): *Cryptocercus* vs. *Parasphaeria boleiriana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, pp: 809–817.
- Lanza, M.J. 2011. Sistema de Comunicación Química de la Plaga del Tomate: *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidóptera: Crambidae). Trabajo de grado para optar a Magister en Química. Universidad Simón Bolívar.
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P y Rossi, J.P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, v.42, pp: 3-15.
- Lee, K. E y Wood, T.G. 1971. *Termites and Soils*. Academic Press, London. 252pp.
- Lobato, V.I. 2015. ¿Cómo se comunican los insectos?. Recuperado el 14 de mayo de 2017, de All you need is Biology: <https://allyouneedisbiology.wordpress.com/2015/11/22/comunicacion-insectos/>
- Lockey, K.H. 1988. Lipids of the insect cuticle: Origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B, pp: 595-645.
- Lucas, C., Pho, D.B., Jallon, J. M y Fresneau, D. 2005: Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondyla villosa* species complex. *Insect Physiol.* 51, pp: 1148 - 1157.
- Martius. C., Bandeira, A.G y da Silva Medeiros. L.G. 1996. Variation in termite alate swarming in rain forests of central Amazonia. *Ecotropica* 2, pp:1–11.
- Montés, F.J. 2013. El universo de los insectos. Mundi-Prensa Libros, España., pp. 140-146.
- Montoya, P.S y Páez, V.C. 2012. Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales. Trabajo de grado para optar al título de tecnólogo químico. Universidad tecnológica de Pereira, pp: 38-54.
- Morales, S.A. 2014. Desarrollo de nuevas estrategias para la caracterización e identificación de compuestos bioactivos en fuentes vegetales. Tesis de doctorado. Universidad de Granada, pp: 79-104.
- Myles, T. 2000. Termite harvesting and termiticulture. <http://www.utoronto.ca/forest/termite/termcult.htm>.
- Ni, J y Tokuda, G. 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotech. Adv.* 31: 838–850.
- Olguín, P.P y Rodríguez, M.H. 2004. Métodos en biotecnología: Cromatografía de gases. Universidad Nacional Autónoma de México, instituto de biotecnología México, pp: 2-37.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T y Yamaoka, R. 2005. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*. 309, pp: 311-314.

- Padilla, F y Flores, J. 2012. La comunicación química en las abejas: el lenguaje de las feromonas. Universidad de Córdoba, Departamento de zoología. N°108.
- Plascencia, V.G. 2003. Espectrometría de masas. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?altern0:0,clase:doc,tit:Temas_Metodos,tipo:doc,edi:d,dir:met.temas.html.
- Ramírez, J.C y Lanfranco, D. 2001. Description of the biology, damage and control of termites species in Chile. Instituto de Silvicultura, Universidad Austral de Chile. Bosque 22(2), pp: 77-84. <http://mingaonline.uach.cl/pdf/bosque/v22n2/art08.pdf>.
- Ripa, R., Luppichini, P., Krecek, J., Lenz, M y Creffield, J. 2004. Termitas y otros insectos xilófagos en Chile: Especies, Biología y Manejo. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. 145 pp.
- Ripa, R y Luppichini, P. 2004. Especies de termites de importancia económica en presentes en Chile. En *Termitas y otros insectos xilófagos en Chile: Especies, Biología y Manejo* (ed. R.Rippa & P. Luppichini). Colección libros INIA. Santiago, Chile. pp: 73-105.
- Rodríguez, G.S. 2010. Análisis del Preprocesado de Imágenes en el Reconocimiento de caras basado en PCA. proyecto seminario de título. Universidad Miguel Hernández de elche, pp:15-19.
- Roisin, Y y Korb, J. 2011. Social Organization and the Status of Workers in Termites. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Bignell, D.E., Roisin, Y y Lo, N. (eds.). Springer, Dordrecht , Netherlands, pp: 133- 164.
- Schuurman, G y Dangerfield, J.M. 1995. Assessment of intraspecific aggression in *Macrotermes michaelseni* (Isoptera: Macrotermitinae). *Sociobiology* 26, pp: 33-38.
- Sherman, P. W., Reeve, H. K y Pfennig, D. W. 1997. Recognition systems. In: *Behavioural ecology: an evolutionary approach*, 4th ed. Krebs, J. and Davies, N. (eds.) Oxford: Blackwell Science, UK, pp: 155-178.
- Singer, T. 1998. Roles of Hydrocarbons in the Recognition Systems of Insects. *Amer. Zool*, 38, pp: 394-405.
- Singer, T.L y Espelie, K.E. 1992. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Animal Behaviour* 44, pp: 63-68.
- Smith, B. H y Breed, M. D. 1995. The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination in social insect. In *Chemical ecology of insects 2* (ed. R. T. Cardé & W. J. Bell). New York, NY: Chapman & Hall., pp: 287-317.
- Spokas, K., Bogner, J., Chanton, J., Morcet, M., Aran, C., Graff, C., Golvan, Y y Hebe, I. 2006. Methane mass balance at three landfill sites: What is the efficiency of capture by gas collection systems? *Waste Management*, 26(5).

- Stashenko, E y Martínez, J. 2014. GC y GC-MS: Configuración del Equipo Versus Aplicaciones. Universidad Industrial de Santander. Colombia. Scientia Chromatographica Vol.2, N°3, pp: 33-59.
- Thorne, B.L. 1982. Termite-termite interactions: workers as an agonistic caste. *Psyche* 89, pp: 133-150.
- Thorne, B.L. 1997. Evolution of eusociality in termites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, pp: 27-54.
- Toth, A. L y Robinson, G.E. 2007. Evo-devo and the evolution of social behavior. *Trends in Genetics.* 23, pp: 334-341.
- Traniello, J.F.A. 1981. Enemy deterrence in the recruitment strategy of a termite: Soldier organized foraging in *Nasutitermes costalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, pp: 1976-1979.
- Traniello, J.F.A. y Beshers, S.N. 1985. Species-specific alarm/recruitment response in a neotropical termite. *Naturwissenschaften* 72, pp: 491-492.
- Van Zweden, J.S y D'Etorre, P. 2010. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons, in *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology.* eds G.J. Blomquist y A.-G. Bagnères. Cambridge UK, Cambridge University Press, pp: 222-243.
- Vasconcellos, A., Bandeira, A.G., Moura, F.M.S, Araújo, V.F.P y Constantino, R. 2010. Termite assemblages in three habitats under different disturbance regimes in the semi-arid Caatinga of NE Brazil. *J Arid Environ* 74, pp: 298-302.
- Watson, R.T., Meira Filho, L.G., Sanhueza, E., y Janetos, A. 1992. Greenhouse gases: sources and sinks. *Climate change*, 92, 2546.
- Wilson, E.O. 1965. Chemical communication in the social insects. *Science.* 149, pp:1064-1071.
- Zaballos, P.J y Moreno, G.A. 2009. Modelos adaptativos en zoología (manual de prácticas) 4. Color. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Biología).Serie Zoología. 2(2), pp: 44-53.

VII. ANEXO

7.1. Cromatografía de gases

El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica ampliamente utilizada en el análisis químico de mezclas complejas de diferentes sustancias, en contextos agrícolas, ecológicos, ambientales, etc. (Gutiérrez y Droguet, 2002; Morales, 2014).

El cromatógrafo de gases (Figura A-1) permite separar los componentes de la mezcla a medida que viajan a través de una columna, y el espectrómetro de masas (MS) permite identificarlos posteriormente a medida que emergen de la columna cromatográfica (Montoya y Páez, 2012). Ambos métodos son compatibles ya que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra (Gutiérrez y Droguet, 2002).

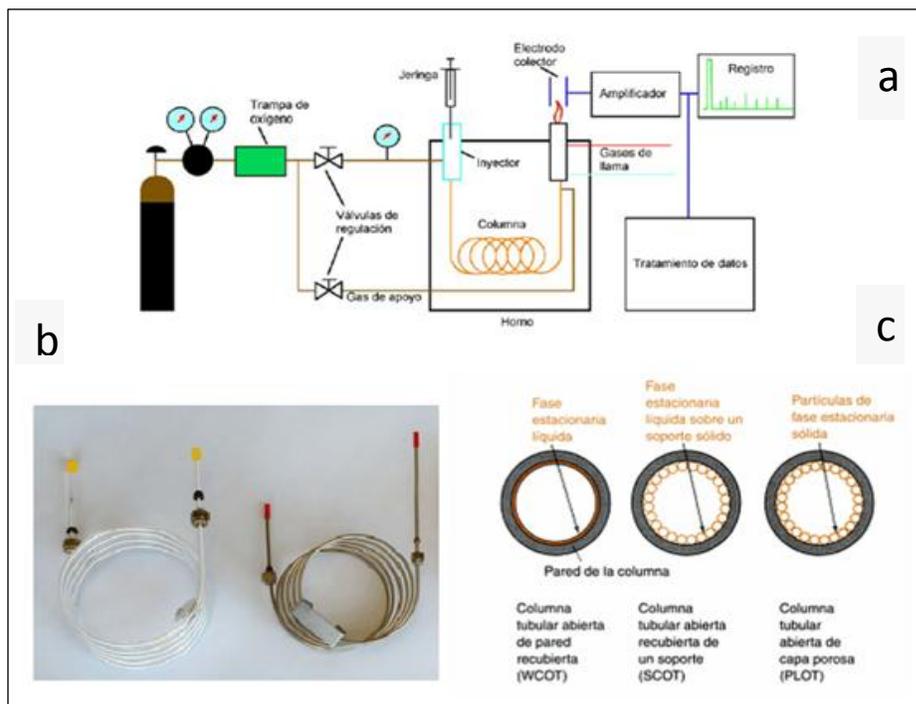


Figura A-1: a) esquema de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) (fuente: <https://goo.gl/6eyKGk>); b) columnas empacadas o de relleno. (fuente: <https://goo.gl/hqvsr7>); c) columnas tubulares abiertas o capilares. (fuente: Harris, D.C. (2007) Análisis Químico Cuantitativo (3ª edición).

El cromatógrafo de gases (Fig. A-1a) está conformado por diferentes componentes:

- 1) **el gas portador**, un gas inerte encargado de transportar la muestra por la columna (fase móvil) y establecer una matriz apropiada para el detector. El gas no debe interactuar químicamente con la muestra ni con la columna, para lo cual se utilizan generalmente gases inertes como helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono. El gas portador utilizado depende del tipo de detector que se emplee (Stashenko y Martínez, 2014; Harris, 2007);
- 2) **el sistema de inyección**, este busca vaporizar la muestra a analizar, para luego incorporarla rápidamente al gas portador, el cual se dirige hacia la columna. Existen diversos métodos para introducir la muestra al sistema en función de la columna a utilizar. Para columnas empaquetadas la muestra generalmente es inyectada de forma manual utilizando una microjeringa de precisión, debido a que estas aceptan cantidades elevadas de muestra (Gutiérrez y Droguet, 2002). Mientras que, los métodos de inyección para columnas capilares deben trabajar con volúmenes considerablemente más bajos, dentro de estos se encuentran:
 - a. inyección de tipo *Split*, que se realiza utilizando un inyector que divide el flujo de la muestra, enviando una pequeña parte a la columna y eliminando el resto fuera del sistema mediante una válvula;
 - b. inyección tipo *Splitless*, que utiliza un sistema que envía la totalidad de la muestra a la columna, siendo más adecuado para el análisis de trazas o de compuestos muy volátiles; y
 - c. inyección *on-column* (en la columna), que se lleva a cabo en frío, introduciendo la muestra directamente en el interior de la columna, eliminando así la etapa de vaporización que podría causar la descomposición de los compuestos termolábiles. El método de inyección a utilizar es un punto crítico, ya que afecta directamente la capacidad de separación de la columna y también el resultado de los análisis (Stashenko y Martínez, 2014; Harris, 2007; Gutiérrez y Droguet, 2002);

- 3) **la columna cromatográfica**, elemento fundamental del GC donde se produce la separación de los componentes de la muestra, está constituida por un tubo construido de diversos materiales inertes como, acero inoxidable, vidrio, sílice fundida y teflón, dentro del cual se encuentra la fase estacionaria, encargada de separar los componentes de la muestra (Harris, 2007).

La **fase estacionaria** puede ser un sólido o un líquido situados sobre un soporte sólido; la función básica del soporte es retener y ubicar la fase estacionaria para que presente una mayor superficie de contacto con la fase móvil. Esta frecuentemente constituida por tierra de diatomeas (esqueletos de plantas unicelulares - diatomita) (Harris, 2007; Olguín y Rodríguez, 2004).

La fase estacionaria se puede clasificar en función de su polaridad, encontrándose:

- fases no polares, que se utilizan para separar sustancias poco polares o no polares. El polisiloxano es la estructura básica más utilizada en este tipo de fases estacionarias (ej. series OV- 1, OV-101; SE-30);
- fases semi-polares, que se utilizan generalmente para mezclas mixtas. Al igual que en el caso anterior el polisiloxano es la fase más utilizada, aunque se consigue que éste presente distintas polaridades dependiendo del porcentaje de ramificaciones (generalmente grupos metilo) que contenga (ej. serie OV-17; DB-17); y
- fases polares, que se utilizan para separar mezclas polares (alcoholes, ácidos, aminas, etc.). La estructura básica utilizada en este tipo de fase estacionaria suele tener grupos de tipo -CN, -CO y -NH (Harris, 2007). La polaridad de la fase estacionaria debe relacionarse con la de los componentes de la muestra, cumpliéndose que “lo semejante disuelve a lo semejante”.

Retomando la columna cromatográfica, estas pueden ser de dos tipos:

- a) empaquetadas o de relleno (Fig. A-1b), construidas normalmente de vidrio o acero inoxidable, poseen un diámetro interno que varía de 2 a 5 mm y una longitud que oscila entre 1 a 15 m. Estas columnas se empaquetan con un relleno sólido de soporte granular que puede actuar

como fase estacionaria o puede estar recubierta con una delgada capa de fase estacionaria líquida (Harris, 2007; Olgún y Rodríguez, 2004); y

- b) las tubulares abiertas o capilares (Fig. A-1c), formadas por un tubo normalmente de sílice o vidrio con un diámetro interno entre 0,1 y 0,5 mm y una longitud de 15 a 100 m. En estas columnas la fase estacionaria (0,1 a 0,5 μm de grosor) va depositada en la pared interior de la columna que actúa como soporte. Estas columnas se pueden dividir en:
- i. columna tubular abierta de pared (WCOT), en las que la fase estacionaria líquida se encuentra depositada directamente sobre las paredes del tubo;
 - ii. columna tubular abierta de capa porosa (PLOT), en las que la pared interna del tubo está recubierta por una capa de un soporte adsorbente; y
 - iii. columna tubular abierta recubierta de soporte (SCOT), en las que la pared interna del tubo está revestida por una capa de un soporte adsorbente, el cual a su vez está impregnado con una fase estacionaria líquida.

Existen dos diferencias fundamentales que deben ser consideradas para la elección de la columna: la cantidad de muestra que admiten (capacidad de carga) y los flujos del gas portador que soportan (Harris, 2007; Olgún y Rodríguez, 2004; Gutiérrez y Droguet, 2002);

- 4) **el horno termostático**, que contiene en su interior a la columna y controla la temperatura del proceso de separación. La temperatura es una variable fundamental para lograr la adecuada separación de los componentes volátiles y semi-volátiles de la muestra, ya que esta afecta al equilibrio de distribución de los componentes entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. Generalmente, la resolución óptima se relaciona con una menor temperatura, aunque esto conlleva un

aumento en el tiempo de elución y análisis (Montoya y Páez, 2012; Olgún y Rodríguez, 2004; Gutiérrez y Droguet, 2002); finalmente

- 5) **los detectores**, que son dispositivos que indican y miden los componentes de una mezcla una vez que estos han sido separados por la columna cromatográfica. Los detectores producen una señal generada por una comparación entre el gas portador puro y el mismo gas llevando los componentes de la mezcla previamente separados, lo cual es traducido en una señal eléctrica que es amplificada y registrada.

Dentro de los parámetros de un buen detector, se encuentran que: deben ser altamente sensibles (en general se encuentran en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-15} g de analito/s), deben presentar una respuesta lineal sobre un amplio rango de concentraciones y su respuesta debe ser relativamente independiente de variaciones de flujo y temperatura (hasta al menos 400°C) (Montoya y Páez, 2012; Harris, 2007; Olgún y Rodríguez, 2004).

Algunos de los detectores más característicos son:

- a) detector de conductividad térmica (TCD), que consiste en dos celdas metálicas que contienen un filamento de tungsteno o de tungsteno con lámina de oro calentado por una corriente eléctrica. Su modo de detección se basa en las variaciones en la conductividad térmica del gas portador, ocasionados por la presencia de moléculas en el filamento. Este detector responde a cualquier compuesto cuya conductividad sea diferente a la del gas portador (Montoya y Páez, 2012; Olgún y Rodríguez, 2004);
- b) detector de ionización de flama (FID), este es uno de los detectores más utilizados, ya que presenta selectividad hacia compuestos que presentan enlaces C-H. Su modo de detección se basa en la combustión de los compuestos orgánicos en una llama aire/hidrógeno que producen iones y electrones que generan una corriente que puede ser medida mediante dos electrodos situados a los lados de la llama (Montoya y Páez, 2012; Olgún y Rodríguez, 2004);

- c) detector fotométrico de flama (FPD), que presenta una respuesta selectiva hacia compuestos con azufre o fósforo. Su modo de detección se debe a una llama reductora que genera especies quimio-luminiscentes que emiten a longitudes de onda particulares, entregando como resultando una corriente que puede ser traducida a una señal (Stashenko y Martínez, 2014; Olgúin y Rodríguez, 2004); y
- d) detector de captura de electrones (ECD), selectivo para moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos. Su modo de detección de basa en que el gas portador pasa a través de un emisor β (como níquel-63 o tritio), generando una corriente de iones positivos, radicales libres y electrones térmicos, que es medida mediante electrodos; dicha corriente disminuye en presencia de moléculas orgánicas las cuales tienden a capturar los electrones producidos (Stashenko y Martínez, 2014; Olgúin y Rodríguez, 2004); (Olgúin y Rodríguez, 2004). En el caso del GC-MS, el detector utilizado por el cromatógrafo de gases es reemplazado por un espectrómetro de masas que cumple la función de detector.

Como se mencionó anteriormente, el cromatógrafo de gases permite la separación de los componentes de una mezcla, los cuales son separados en función de la afinidad que presenta cada componente hacia la fase estacionaria. La movilidad de estos depende de un equilibrio en la distribución de cada componente con la fase estacionaria y la fase móvil, el cual a su vez depende de la naturaleza química de ambas fases, así como de las propiedades químicas de los componentes de la mezcla (Stashenko y Martínez, 2014; Gutiérrez y Droguet, 2002).

De este modo, los compuestos fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos por la fase estacionaria se moverán rápidamente (Gutiérrez y Droguet, 2002); el tiempo que esta última fase retarda la salida de un determinado componente de la mezcla, se denomina **tiempo de retención**.

La fase estacionaria debe ser selectiva frente a los compuestos a separar ya que estos se adhieren a ella en virtud de distintos tipos de fuerzas intermoleculares que forman enlaces químicos no covalentes (Stashenko y Martínez, 2014; Olgúin y Rodríguez, 2004). Dentro de estas se encuentran:

- 1) **fuerzas de dispersión** (fuerzas de London), debidas a los campos eléctricos producidos por dipolos instantáneos, los que se generan debido al movimiento de los electrones en torno al núcleo. Las moléculas apolares no poseen carga eléctrica neta, pero debido al movimiento azaroso de los electrones, se puede provocar una mayor densidad de estos en una región específica de la molécula, pudiendo crear un dipolo instantáneo. Cuando dos de estas moléculas se encuentran favorablemente, pueden ocurrir uniones intermoleculares. Las fuerzas de dispersión son muy débiles y aumentan proporcionalmente con el tamaño de las moléculas (Brown y col., 2004);
- 2) **fuerzas de inducción** (fuerzas de Debye), son debidas a la interacción electrostática que se produce entre una molécula con un dipolo permanente y otra con un dipolo instantáneo, generándose una atracción entre ambas. Este tipo de fuerza se genera en moléculas no polares aunque polarizables (Brown y col., 2004);
- 3) **fuerzas de orientación** (fuerzas de Keesom), debidas a la interacción entre moléculas con dipolos permanentes, ya sea de la fase estacionaria como de los compuestos de la muestra. Esta fuerza genera una interacción no covalente entre las moléculas interactuantes y funciona de manera similar a las interacciones iónicas, pero son considerablemente más débiles (Brown y col., 2004); y
- 4) **fuerza donador-aceptor**, debidas a interacciones químicas de carácter débil relacionadas a una transferencia incompleta de electrones por parte del donador hacia el aceptor. Un ejemplo de esto se encuentra en los puentes de hidrogeno, que ocurren cuando un átomo de hidrógeno se enlaza a un átomo fuertemente electronegativo (ej. nitrógeno, oxígeno, flúor, etc.). Cuanto mayor sea la diferencia de electronegatividad más fuerte será el enlace (Brown y col., 2004).

Las fuerzas de dispersión o de London, son las únicas fuerzas de interacción para los compuestos no polares con la fase estacionaria. Cuando estas fuerzas predominan por lo general los compuestos surgen de la columna en orden correspondiente a sus puntos de ebullición. Mientras que para compuestos polares, las interacciones más importantes son las fuerzas de inducción (debye) y orientación (keesom) respectivamente.

La suma de todas las interacciones entre un compuesto y la fase estacionaria indica la polaridad de esta respecto al compuesto, mientras que la magnitud de cada interacción particular arroja la selectividad de la fase estacionaria (Montoya y Páez, 2012; Harris, 2007).

La afinidad de los componentes por la fase estacionaria, también es afectada por la temperatura de la columna, debido a que las moléculas de los componentes en fase gaseosa interactúan con la fase estacionaria, manteniéndose en un equilibrio dinámico entre ser adsorbido por la columna y ser arrastrado por la fase móvil; este equilibrio es controlado por la temperatura, mientras más alta sea la temperatura el equilibrio se desplazara hacia la fase móvil y viceversa (Olguín y Rodríguez, 2004; Gutiérrez y Droquet, 2002).

Otro factor clave a considerar en la afinidad de los componentes hacia la fase estacionaria es la presión de vapor de los compuestos, que corresponde a la presión en que los componentes de la mezcla se encuentran en equilibrio dinámico entre su estado líquido y gaseoso, para una determinada temperatura. La presión de vapor aumenta cuando se incrementa la temperatura y viceversa (Gutiérrez y Droquet, 2002).

Como resultado de estas diferencias de movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden ser analizadas de forma cualitativa y/o cuantitativa. (Gutiérrez y Droquet, 2002).

Las características de las interacciones entre los diferentes compuestos de la muestra y las dos fases, permiten clasificar los sistemas cromatográficos en función de su mecanismo de separación.

Cuando la fase estacionaria es un líquido, la interacción con la fase móvil recibe el nombre de reparto, y separa los componentes de la mezcla basándose en la diferente solubilidad de los compuestos en la fase estacionaria, este mecanismo se utiliza para la separación de mezclas de polaridad media y alta (Harris, 2007; Olguín y Rodríguez, 2004).

Mientras que, cuando la fase estacionaria es un sólido, se puede catalogar en:

- 1) **adsorción**, donde la separación de los componentes de la mezcla se basa en la diferente afinidad de adsorción de estos, sobre la superficie de la fase estacionaria, debido a las distintas interacciones en términos de polaridad de los compuestos. Una característica importante del adsorbente es el tamaño de partícula, ya que la retención es proporcional al área superficial. Este mecanismo se utiliza para la separación de mezclas de polaridad baja o media (Montoya y Páez, 2012; Harris, 2007; Olguín y Rodríguez, 2004);
- 2) **intercambio iónico**, la separación de los componentes de la mezcla se basa en la afinidad de estos para el intercambio de iones, siendo retenidos en la columna los componentes que poseen una carga complementaria a la fase estacionaria (los compuestos negativos serán atraídos por una fase estacionaria positiva y viceversa), eluyendo los componentes restantes. Este tipo de mecanismo se utiliza principalmente para la separación de iones metálicos o para la separación de compuestos iónicos (Montoya y Páez, 2012; Harris, 2007); y
- 3) **de exclusión**, la separación de los componentes de la mezcla se basa en las diferencias de tamaño molecular o de forma. En esta, la fase estacionaria consiste en una matriz inerte por la cual pueden ingresar los componentes de un tamaño o forma específicos. Este tipo de mecanismo se utiliza para la separación de compuestos orgánicos de peso molecular elevado de otros de menor peso, siendo retenidas las moléculas de menor peso (Hübschmann, 2008; Harris, 2007).

7.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica muy completa, dentro de sus características principales se encuentran:

- I. alta capacidad de identificación de los compuestos, ya que entrega un espectro particular para cada componente;
- II. gran sensibilidad, debido a que detecta concentraciones muy bajas (ppm o ppb);
- III. facilita información estructural sobre los componentes de la muestra; y
- IV. proporciona información isotópica de la mezcla (Gutiérrez y Droguet, 2002).

En el espectrómetro de masas (Figura A-2) la muestra a analizar es ionizada mediante distintos métodos, provocando la fragmentación de la molécula, lo que permite obtener diferentes iones y radicales de los compuestos analizados (Harris, 2007). La proporción y el tipo de los fragmentos producidos son exclusivos de cada molécula y de las características del proceso de ionización.

Luego los fragmentos ionizados son conducidos hacia un colector mediante campos eléctricos o magnéticos, para finalmente impactar en un detector de iones donde son expuestos en función de su relación masa/carga (m/z). Cada compuesto a analizar se ioniza dando fragmentos característicos y de esta manera se pueden identificar mediante su espectro de masas (Gomis, 2008; Harris, 2007; Gutiérrez y Droguet, 2002).

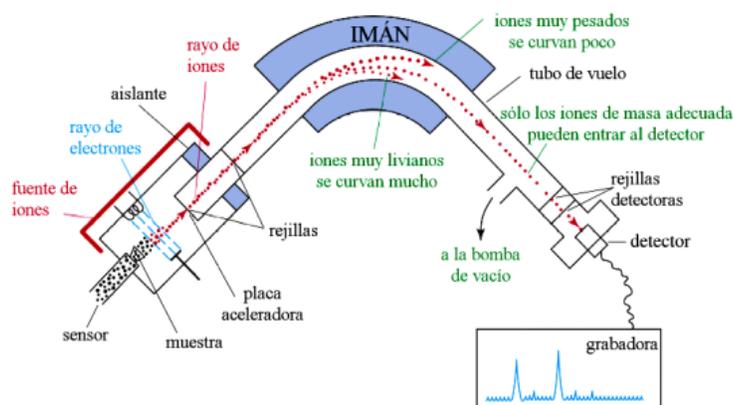


Figura A-2: Esquema de un espectrómetro de masas (MS), con analizador de sector magnético. (fuente: <https://goo.gl/tAYnex>).

Los principales componentes de un espectrómetro de masas, son:

- 1) **el sistema de entrada de muestra**, cuya finalidad es ingresar la muestra hacia la fuente de iones con la menor pérdida de vacío. Los espectrómetros de masas están equipados con diferentes entradas, que incluyen:
 - a) Entrada por sonda directa, las muestras líquidas y sólidas no volátiles, son introducidas directamente en la fuente de ionización mediante una sonda, en la cual, la muestra es depositada en la superficie de un vidrio o tubo capilar de aluminio y que se ubica a unos pocos milímetros de la fuente; y
 - b) Entrada para sistemas cromatográficos, constituidas por conexiones específicas que introducen la muestra directamente hasta la fuente de ionización a medida que emerge de la columna cromatográfica (Gomis, 2008; Plascencia, 2003);

- 2) **la fuente de iones**, que transforma los componentes de la muestra en iones por medio de diferentes métodos. Entre las principales fuentes se encuentran:
 - a) Impacto Electrónico (EI), donde la muestra es ionizada mediante electrones producidos por la emisión térmica de un filamento, elaborado de tungsteno o renio. Los electrones generados son acelerados mediante un potencial, provocando que la alta energía cinética de estos fragmenten las moléculas con las que chocan. Los compuestos deben ser de polaridad media o baja y presentar cierta estabilidad térmica (Gomis, 2008; Harris, 2007; Plascencia, 2003);
 - b) Ionización Química (CI), donde los componentes de la muestra son ionizados por colisión con iones, los cuales son generados mediante un bombardeo con electrones de un gas reactivo en exceso. Entre los compuestos gaseosos implementados se encuentran el metano, el isobutano y el amoníaco, que forman iones CH_5^+ , C_4H_9^+ , y NH_4^+ respectivamente. La ionización química produce generalmente un bajo nivel de fragmentación (Hübschmann, 2008; Harris, 2007; Plascencia, 2003); y

c) Ionización de Campo (FI), donde los componentes de la muestra se ionizan y fragmentan debido a la aplicación de un campo eléctrico elevado (<100 V/cm). El cual es generado aplicando altos voltajes (10 a 20 kV) a emisores elaborados por un alambre de tungsteno, los que son activados mediante un procedimiento de pirólisis con benzonitrilo. En este caso los compuestos presentan en general poca fragmentación. (Gomis, 2008; Hübschmann, 2008);

3) **los analizadores de masas**, se encargan de separar los fragmentos generados en la fuente de iones, de acuerdo a su relación masa/carga (m/z), registrando la información estructural obtenida a partir de estos (Plascencia, 2003). Los analizadores de masas incluyen:

- a. Analizador de cuadrupolo, que funciona por exclusión selectiva de iones. Está compuesto por cuatro barras paralelas, a las que se aplica una combinación específica de voltajes de radiofrecuencia y corriente directa. Esto permite controlar la trayectoria de los iones, por lo que solo fragmentos de un valor masa/carga característico alcanzarán al detector, mientras que los otros serán eliminados como moléculas sin carga. Los analizadores de cuadrupolo son actualmente los más utilizados (Gomis, 2008; Harris, 2007; Plascencia, 2003);
- b. Analizador de Tiempo de Vuelo (Time-of-flight: TOF), que funciona midiendo el tiempo necesario por un fragmento para moverse desde la fuente de iones hasta el detector. Para esto los iones generados pasan a un tubo analizador sobre el que no actúa ningún campo, por lo que sus velocidades varían dependiendo directamente de los valores de masa/carga (a menor m/z , mayor velocidad). (Stashenko y Martínez, 2014; Gomis, 2008; Plascencia, 2003);
- c. Analizador de trampa de iones (Ion-Trap), que utiliza campos eléctricos para atrapar fragmentos en forma controlada; estos son retenidos en un espacio tridimensional conformado por tres electrodos, uno circular y dos electrodos hiperbólicos en los extremos. La diversidad de potenciales que pueden aplicarse a los electrodos hiperbólicos permite

obtener fragmentos de un rango m/z específico. (Gomis, 2008; Harris, 2007; Plascencia, 2003); y

- d. Analizador de sector magnético, donde los fragmentos que llegan de la fuente de iones son acelerados a través de un sector magnético (que aplica un campo magnético), separándolos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). El analizador de masas de sector magnético posee alta reproducibilidad, alta resolución (debido al sector eléctrico) y sensibilidad (Gomis, 2008; Plascencia, 2003); y

4) **detectores de iones**, que convierten el haz de iones generado en una señal eléctrica que puede ser procesada y medida. Entre estos se encuentran:

- a) Copa Faraday, que consiste en un electrodo en forma de copa o caja, que recibe el impacto de los iones generados, donde son neutralizados por una resistencia. La caída de voltaje en esta, es la medición de la corriente del ion, la cual es directamente proporcional al número de iones y al número de cargas de estos (Hübschmann, 2008; Harris, 2007; Plascencia, 2003);
- b) Multiplicador de Electrones, que enfoca los iones provenientes del analizador de masas sobre un dínodo (superficies de Cu/Be) que emite electrones de forma proporcional al número de iones recibido. Luego los electrones secundarios son acelerados hacia un segundo dínodo, el cual emite electrones que son atraídos a un gradiente eléctrico (cátodo). Este tipo de detector, posee la importante limitación de no poseer amplificador de la señal (Gomis, 2008; Harris, 2007);
- c) Detector "Channeltron", que está formado por un tubo de vidrio, terminado en forma de espiral, cuyo interior está cubierto por un semiconductor (óxido de plomo). Si se desean detectar iones positivos, es necesario aplicar un potencial negativo en el detector y viceversa, lo que provoca la emisión de un cierto número de electrones. El detector Channeltron permite la detección selectiva de iones positivos o negativos (Gomis, 2008; Plascencia, 2003); y
- d) Detector Daly, que desvía la trayectoria de los fragmentos procedentes del analizador de masas utilizando un potencial eléctrico, provocando

que estas choquen sobre un dínodo, lo que genera múltiples electrones que son atraídos sobre una pantalla fosforescente, la cual emite un gran número de fotones hacia un fotomultiplicador. El voltaje aplicado es contrario a la carga de los fragmentos que se desea identificar. (Gomis, 2008; Hübschmann, 2008; Plascencia, 2003).

Al utilizar las técnicas descritas anteriormente (GC-MS) en conjunto es posible separar los diferentes componentes de una mezcla, los cuales eluyen a través de la columna del GC en función de su afinidad por la fase estacionaria.

Posteriormente los compuestos individuales pasan directamente a la cámara de ionización del espectrómetro de masas, donde son ionizados, lo que permite obtener la información estructural de los compuestos (Stashenko y Martínez, 2014; Gutiérrez y Droguet, 2002).