



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

MIRMECOFAUNA DE CHAMELA, JAL. Y
CARACTERIZACION DE DOS ESPECIES DE
Crematogaster CON ESPECTROSCOPIAS
INFRARROJA Y RAMAN POR TRANSFORMADA
DE FOURIER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CASTAÑO MENESES ROSA GABRIELA

000215948



MEXICO, D. F.



1994

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realizó(ó)ron la pasante(s) Castaño Meneses Rosa Gabriela

con número de cuenta 8622416-7 con el Título: _____

MIRMECOFAUNA DE CHAMELA, JAL. Y CARACTERIZACION DE DOS
ESPECIES DE Crematogaster CON ESPECTROSCOPIAS INFRARROJA
Y RAMAN POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Director de Tesis	Dr. José Guadalupe	Palacios Vargas	<i>José Guadalupe Palacios Vargas</i>
	Dr. Víctor Manuel	Castaño Meneses	<i>Víctor Manuel Castaño Meneses</i>
	Dra. Margarita Victoria	García Garduño	<i>Margarita Victoria García Garduño</i>
Suplente	Biól. Blanca Estela Mejía	Recamier	<i>Blanca Estela Mejía Recamier</i>
Suplente	Biól. José Antonio	Gómez Anaya	<i>José Antonio Gómez Anaya</i>

A mis padres, quienes siempre me han dado su amor y ejemplo

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A mis hermanos, por estar siempre conmigo

A Ale, mi mejor amiga

A mis maestros y amigos, por todo lo que me han enseñado, la amistad que me han brindado y permitirme compartir grandes momentos.

Al Dr. Victor Castaño, al Dr. José Palacios y a Q.F.B. Elena Oliva, por la confianza y apoyo que me han dado.

A la Dra. Nora Galindo, Georgina, Cristina, José Luis y Jorge, por todo lo que significan para mí, ser mis guías y brindarme su amistad.

Esta tesis forma parte del proyecto DGAPA (UNAM) IN 2078/91 "Efectos del uso de una Selva Baja Caducifolia sobre la fauna de Artrópodos" cuyo responsable es el Dr. José G. Palacios.

A todas las personas que contribuyeron de diversas formas en la elaboración de mi trabajo de tesis, deseo expresar mi más sincero reconocimiento.

Los Drs. José G. Palacios Vargas y Victor M. Castaño dirigieron y asesoraron la tesis, dándome su confianza y apoyo de manera incondicional.

El Dr. Alfonso Pescador, corresponsable del citado proyecto, proporcionó valiosas sugerencias y colaboró de manera entusiasta en el trabajo de campo.

El trabajo experimental se realizó en el Instituto de Física, UNAM, donde se me brindaron grandes facilidades y obtuve la asesoría de varios investigadores. La Dra. Antonienta Mondragón, colaboró en la obtención de los espectros Raman e Infrarrojos; Jaqueline Cañetas y Pedro Mexía, en la realización de micrografías de microscopía electrónica; Alicia del Real, Amparo Ortega, Luis Flores y Salvador Víquez, me asesoraron para resolver algunos problemas técnicos y metodológicos.

Al Dr. Alejandro Alagón del Instituto de Biotecnología, por su asesoría.

El Dr. Roy Snelling revisó e identificó el material colectado.

El técnico Tomás Cruz, de la Facultad de Medicina, realizó la impresión y presentación de las fotografías de Microscopía.

El M. en C. Jorge Ascencio realizó la edición del presente trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Ecología y Sistemática de Microartrópodos por su gran apoyo.

De manera muy especial, a la Q. F. B. Elena B. Oliva Ramírez, a quien debo la resolución de múltiples obstáculos metodológicos y sin cuya asesoría y entusiasta apoyo en el trabajo experimental, no hubiera logrado la realización de esta tesis.

El Jurado Dictaminador estuvo integrado por Dr. José G. Palacios Vargas, Dr. Victor M. Castaño Meneses, Dra. Margarita V. García Garduño, Biól. Blanca E. Mejía Recamier y Biól. José A. Gómez Anaya.

ÍNDICE

Introducción	1
Antecedentes	4
Objetivos	16
Material y Método		
a) Zona de Estudio	18
b) Colecta	20
c) Procesamiento de material		
c.1) Microscopía	21
c.2) Espectroscopía	24
Resultados		
a) Mirmecofauna de Chamela	26
b) Microscopía	29
c) Espectroscopía	35
Discusión	49
Conclusiones	52
Bibliografía	55
Apéndice I	58
Apéndice II	64

INTRODUCCION.

La necesidad del hombre de conocer y tratar de explicar los fenómenos que se producen a su alrededor es una conducta innata, gracias a la cual la humanidad se ha desarrollado cultural, tecnológica y científicamente. De ahí que la búsqueda de respuestas a las dudas que surgen de la observación de la naturaleza, provoque que el ingenio humano genere instrumentos que le faciliten esta tarea. Es así, que a través del tiempo ha creado desde marros de piedra hasta telescopios y microscópios electrónicos.

En el campo de la Biología, el avance tecnológico ha contribuído al desarrollo de las investigaciones en muchas especialidades. Es por ello que, a partir de la invención del microscópio, se han buscado nuevas forma de tecnología que permitan conocer e interpretar los fenómenos biológicos. La taxonomía, por ejemplo, ha aprovechado estos avances para fundamentar sus argumentos, yendo de las descripciones morfológicas a los estudios genéticos y etológicos, apoyándose en la microscopía electrónica.

En fechas recientes, la espectroscopía Infrarroja y Raman se ha comenzado a utilizar en la caracterización de compuestos animales, principalmente en la identificación de las toxinas presentes en el veneno de alacranes (Arêas *et al.*, 1987), en sustancias antidepredadoras en las plantas (Powell *et al.*, 1991) y los lípidos cuticulares de insectos (Gibbs *et al.*, 1991).

Así mismo, existen tienen compuestos perfectamente identificados, realizándose incluso predicciones sobre su comportamiento, como en el caso del ácido fórmico, del que se han llevado a cabo simulaciones mediante modelos matemáticos que predicen el comportamiento de sus monómeros y dímeros (Yokoyama *et al.*, 1991).

Por lo que respecta a las ventajas que ofrece la espectroscopía, tanto Infrarroja como Raman, es que son sumamente sensibles, teniendo una resolución muy alta con gran precisión en picos de menos de 0.1 cm^{-1} , lo que hace más exacto el análisis que se realiza, pues considera un mayor número de compuestos que con otras técnicas no se podrían observar.

En cuanto a los estudios sobre lípidos cuticulares en insectos, éstos han demostrado que cada especie, e incluso cada estadio del ciclo de vida, presentan una composición propia, tanto en cantidad como en el tipo de lípido que conforman las cutículas (Gibbs *et al.*, 1991). Por lo tanto, si se tuviera una mezcla de cutículas y no se supiera a que tipo de insecto pertenecen, por medio de la espectroscopía se podría identificar a través de los espectrogramas de distintos grupos de insectos.

Así pues, si consideramos que a nivel de lípidos cuticulares en insectos existen diferencias, es válido pensar que las proteínas constitutivas de los organismos también son características para cada grupo e incluso a nivel de especie. No obstante, la espectroscopía ha sido relativamente poco utilizada para la caracterización de proteínas, sólo unas pocas como la hemoglobina, B-lactoglobulina, α -caseína y ribonucleasas, se han analizado utilizando técnicas de espectroscopía I-FT (D'Esposito & Koeng, 1978), ya que se han aplicado otras técnicas como

la cromatografía, la electroforesis y los aminogramas.

En el presente estudio se realizó el análisis de la composición química de dos especies de hormigas del género *Crematogaster*: *C. sumichrasti* y *C. brevispinosa* (colectadas en la Estación de Biología de Chamela, Jal.), derivadas de la interpretación de resultados obtenidos mediante espectroscopías Raman e Infrarroja.

Los resultados obtenidos de tales análisis no sólo pretenden tener una aplicación práctica (en cuanto al potencial nutricional que ofrecen estas especies y su integración a la dieta humana), sino que podrían ayudar en la interpretación de fenómenos ecológicos, como el que una presa sea preferida a otra, pese a ser menos abundante, lo que se explicaría al evaluar la cantidad de proteína que contenga dicha presa, gracias a lo cual se podrían establecer patrones de competencia y otras interacciones entre especies, fenómenos de comportamiento regidos por feromonas, las que con análisis no sólo dan la posibilidad de determinar su naturaleza sino incluso localizar su origen, lo que puede servir, en algunos casos, como herramienta para resolver problemas de taxonomía.

ANTECEDENTES.

La espectroscopía, en todas sus variantes, nos abre un campo tecnológico que en biología no se ha explotado del todo, ya que ofrece grandes posibilidades de aplicación.

La espectroscopía Raman se inició con los estudios teóricos de Smekal, en 1923, siendo observado e interpretado por primera vez en la India (1923) por Raman y Krishnan en líquidos. Paralelamente en Rusia, Landesberg y Mandelstan lo hacían en cuarzo (Bermejo, 1988).

Los fundamentos de la espectroscopía se basan en el comportamiento de un haz de luz, cuya frecuencia se ha determinado previamente, y que se hace incidir sobre un material, produciéndose varios fenómenos, algunos observables a simple vista, como son la absorción y reflexión. El análisis de estos fenómenos constituye el fundamento de las espectroscopías de absorción en el rango del espectro visible, ultravioleta (UV) o infrarrojo (IR).

Las moléculas que constituyen la materia poseen una posición tridimensional en el espacio que determina la forma, posición y orientación de tales partículas. El movimiento de las partículas consiste en la translación, rotación y vibración, y comunmente existen combinaciones de los tres. Del tal modo que se pueden evaluar las consecuencias espectroscópicas de la rotación y/o vibración de las moléculas, ya que la energía potencial de las moléculas se libera al suministrar una fuente de luz, registrando los cambios de energía producidos.

El fenómeno Raman consiste en la evaluación de la dispersión que se produce cuando un haz de luz choca contra un material. Tal dispersión puede ser elástica, es decir, que conserva la frecuencia de la luz incidente (dispersión Rayleigh), o inelástica cuando la frecuencia es diferente (dispersión Raman), proceso que se ilustra gráficamente en la Figura 1.

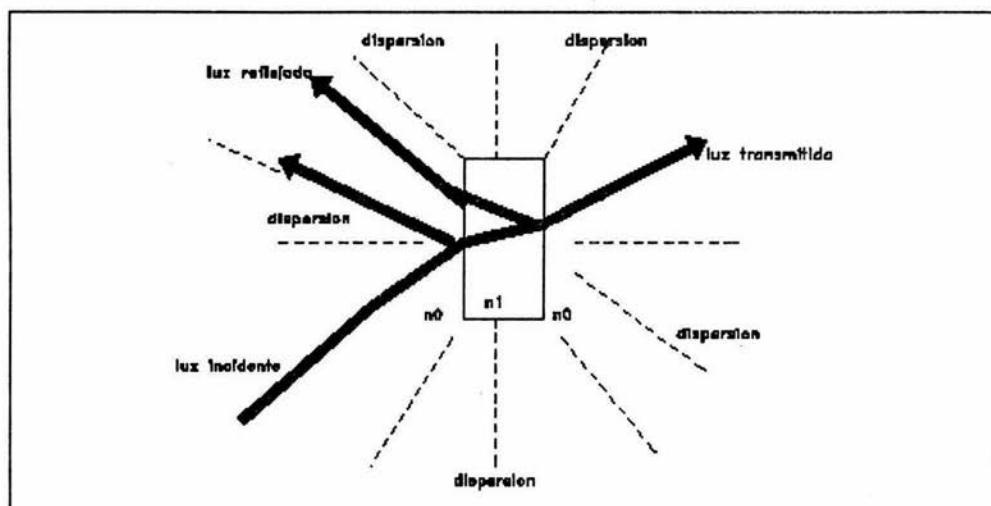


Figura 1.- Cuando una radiación luminosa incide en un medio de índice de refracción n_1 , circundada de un medio de índice de refracción n_0 , una parte de la onda es reflejada en las fronteras, otra absorbida, una tercera transmitida y una más dispersada (dispersión Rayleigh o Raman). (Tomado de Bermejo 1988).

El cambio de frecuencia en la dispersión inelástica puede ocurrir por ceder o tomar energía del medio (dispersión "Stokes" y "antiStokes", respectivamente).

En el proceso de absorción, la energía de la radiación incidente debe coincidir con la diferencia de energías entre dos niveles de la muestra (Fig. 2a). La radiación que emerge de la misma conserva la frecuencia, pero ha disminuido su amplitud (intensidad) debido a que un número de fotones son absorbidos por la muestra, transfiriéndole su energía a ésta.

En las figuras 2b y 2c se aprecian los procesos de dispersión Raman (inelásticos), Stokes y antiStokes, respectivamente. En ambos, la frecuencia de la radiación incidente es típicamente entre 5 y 25 veces mayor que la correspondiente a la transición E_2-E_1 .

En el proceso Stokes, la muestra inicialmente en el estado E_1 pasa al estado E_2 tomando la energía necesaria para ello de una pequeña parte de la radiación incidente, que pasa de la frecuencia w_i a la w , sin que se altere el resto de la radiación incidente.

El proceso antiStokes es análogo, pero con transferencia de energía del medio a la radiación. Por último, en el proceso de dispersión Rayleigh (Fig. 2d), la muestra conserva su estado, pero la trayectoria de parte de la luz varía, aunque sin modificar su frecuencia, es un proceso similar a un choque elástico (Bermejo, 1988).

En la espectroscopía Infrarroja sucede un cambio en el dipolo debido al movimiento de rotación o vibración de la molécula, produciendo una radiación electromagnética que interacciona con dicho dipolo. La interacción es un proceso resonante que da como resultado la absorción de la energía. Igualmente, se pueden producir emisiones cuando la energía de vibración o rotación decae.

Debido a que en muchos casos la magnitud de la vibración molecular es mínima, los espectros obtenidos pueden ser imperceptibles.

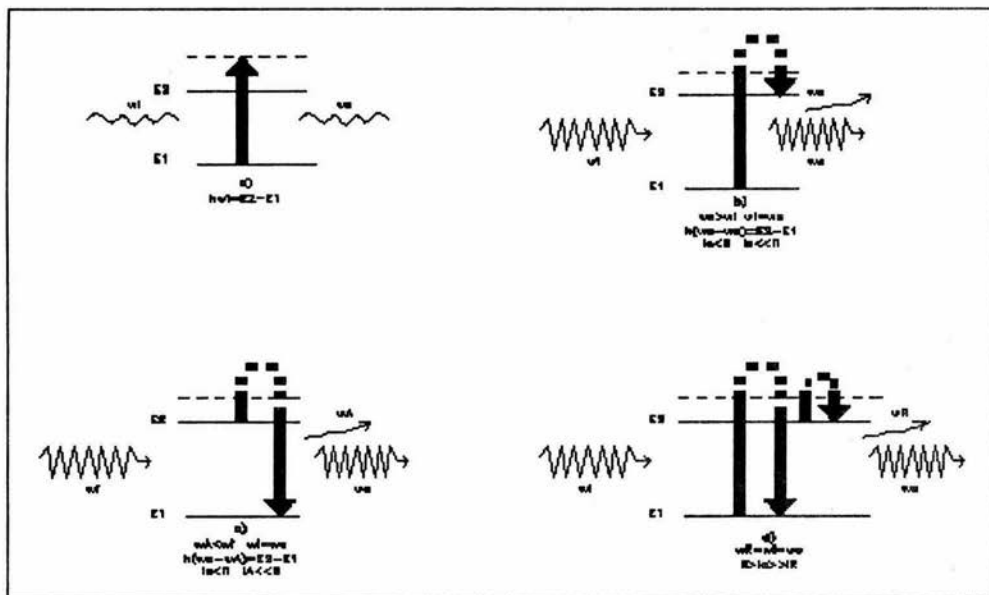


Figura 2.- En la figura (a) se presenta el fenómeno de absorción, donde las E_2 y las E_1 representan los niveles de energía, y la muestra pasa de un estado E_1 al estado E_2 al absorber los fotones cuya frecuencia corresponda a $hw_1 = E_2 - E_1$, donde la i señala los fotones incidentes, además se tiene que $w_i = w_e$. En (b) se observa el fenómeno de dispersión Raman Stokes, en el cual se pasa de un nivel de energía E_1 a otro superior E_2 , tomando la energía de algunos fotones incidentes y emitiendo el excedente energético en forma de un fotón de energía hw_s , donde $w_s > w_i$, $w_i = w_e$, $h(w_s - w_i) = E_2 - E_1$ y las intensidades son $I_s < I_e \leq I_i$. En (c) se ilustra el proceso Raman antiStokes el cual es un fenómeno inverso al caso (b) pues se pasa de un estado superior E_2 a uno inferior E_1 y la energía de transición se emite en forma de un fotón con frecuencia w_A y se verifica que $w_A < w_i$, $h(w_e - w_A) = E_2 - E_1$. Por otra parte en (d) se observa la dispersión Rayleigh, en la cual la excitación de la muestra se revierte mediante la emisión de fotones con energía hw_R donde $w_R = w_i = w_e$ y las intensidades se rigen por $I_R < I_e \leq I_i$.

La interpretación de los interferogramas se ha estudiado desde finales del siglo XIX, una vez sentadas las bases para ampliar la magnitud de los espectros mediante una operación matemática denominada Transformada de Fourier.

El primero en construir un interferómetro y describirlo en una publicación fue el reconocido físico Michelson en 1891. No obstante, fue hasta 1949 en que Peter Fellgett utilizó

por primera vez interferogramas con sus correspondientes espectros infrarrojos.

Con el manejo de la Transformada de Fourier se obtienen grandes ventajas en la instrumentación e interpretación de los interferogramas, siendo la más notoria, la ampliación del rango de las longitudes de onda que se obtienen, que trae como consecuencia, entre otras cosas, mayor rapidez en el barrido de las muestras (Perkins, 1987).

Por otra parte, la introducción de técnicas de transformada de Fourier ha revitalizado el estudio de la conformación de proteínas en solución acuosa. Esto es debido, en parte, al incremento de la sensibilidad espectral y a la viabilidad de compensación con solventes por la sustracción digital de espectros del solvente del espectro de la solución de proteínas (D'Esposito & Koeng, 1978).

Gracias a esto, se obtiene información espectral acerca del material sometido a un haz de luz y con ello la ultraestructura química que lo constituye. La información que tales estudios proporcionan tienen aplicación en distintos campos, tales como nutrición, ecología, etología y taxonomía. Dada la importancia de la nutrición nos enfocaremos a ésta.

En el campo de la nutrición, las espectroscopías Raman e Infrarroja permiten realizar análisis bromatológicos con las ventajas de que, por una parte, se requiere de una muestra muy pequeña (ya que la sensibilidad de los aparatos utilizados ofrece la posibilidad de trabajar con microgramos, lo que es de gran ayuda en casos como los de algunos insectos, donde la

posibilidad de tener muestras que pesen varios gramos puede ser complicada) y, por otra, los resultados se obtienen en un lapso muy corto.

La alimentación y la nutrición, constituyen dos de las necesidades básicas de los seres vivos, las más apremiantes que el hombre debe satisfacer, por lo que continuamente se buscan fuentes más productivas y eficientes de aporte de proteínas. En muchos pueblos, el consumo de insectos fue una solución para cubrir sus requerimientos nutricionales. Por ello, los insectos surgen como fuentes alternativas de proteínas.

Culturas tan disímiles como la asiática, la africana, la anglosajona, la australiana y la norteamericana, comparten la iniciativa de alimentarse con insectos. En México, las principales regiones donde se consumen insectos son Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Debido a esto, surge interés por evaluar el potencial nutritivo de los insectos, encontrándose que las cantidades de proteínas que poseen oscilan entre 30.88% y 72.02% en grs./100 grs. de producto seco y con un porcentaje de digestibilidad de 77.86% a 98.93%, que supera por mucho a otros alimentos como la carne, el huevo y la leche (Ramos Elorduy *et al.*, 1981, 1982).

De acuerdo con una estimación realizada por varios investigadores, existen en el mundo cerca de 433 especies de insectos que se utilizan para el consumo humano (Huyghe, 1992).

Se considera que en México se consumen alrededor de 200 especies de insectos pertenecientes a distintos Ordenes. En la siguiente tabla se muestran algunos de los grupos de insectos que se consumen en el mundo.

Taxa	Nombre común	Número de especies
<i>Coleoptera</i>	Escarabajos	129
<i>Hymenoptera</i>	Hormigas, avispas	91
<i>Orthoptera</i>	Grillos, chapulines	68
<i>Lepidoptera</i>	Mariposas, polillas	48
<i>Hemiptera</i>	Chinches	32
<i>Homoptera</i>	Cigarras	28
<i>Isoptera</i>	Termitas	17
<i>Diptera</i>	Moscas	10
<i>Otros</i>		10
		Total 433

Tomado de Huyghe, 1992.

No obstante, ni el alto valor nutritivo que tienen varias especies de insectos, ni su fácil digestibilidad, tienen el alcance de difusión necesario para ser implementadas en la dieta humana. Aparentemente, por motivos meramente culturales, su consumo se restringe a un sector muy reducido de la población.

Con los coleópteros y los ortópteros, el grupo de las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) es uno de los grupos de insectos más ricos en especies comestibles. En algunas zonas de Oaxaca, la fuente de proteínas con mayor valor proviene de las hormigas, lo mismo sucede en algunas zonas áridas del país (Carvajal & Vergara, 1985).

Así mismo, son de los insectos más abundantes. Se ha calculado que en la región del Amazonas, por cada hectárea de suelo, cerca de un tercio de la biomasa animal está compuesta por hormigas y termitas (equivalentes a ocho millones de hormigas y un millón de termitas). Poblaciones semejantes de estos grupos han sido evaluados en las sabanas de Zaire, Papua (Nueva Guinea), Togo y Ghana (Hölldobler & Wilson 1990).

En el mundo se conocen 11 subfamilias de hormigas, 297 géneros y aproximadamente 8,800 especies. Las características de las principales subfamilias se muestran en la figura 3. La taxonomía del grupo se basa principalmente en características morfológicas. Sin embargo, existen ejemplares complejos que no se pueden diferenciar fácilmente a simple vista, por lo que se recurre a técnicas de electroforesis y estudios de cromosomas para su especificación.

El uso de técnicas de microscopía electrónica de barrido y transmisión resultan de gran utilidad en el estudio de la morfología de los organismos, permitiendo no sólo obtener un panorama más amplio, sino que su caracterización resulte más fina.

La caracterización mediante espectroscopías puede ser una herramienta más, pues es posible obtener espectrogramas de los compuestos que constituyen a los organismos, pudiéndose establecer patrones para las diferentes especies, en este caso particular de las hormigas.

La importancia que reviste el estudio de las hormigas abarca varios puntos de vista: ecológicamente, son depredadores de otros insectos y pequeños invertebrados; en algunas zonas compiten con arañas y carábidos en la descomposición de la materia orgánica. En Nueva York, las hormigas dispersan un tercio de las herbáceas que ahí se desarrollan. Varias culturas las han incluido en su dieta, siendo las especies más consumidas *Atta mexicana*, *Myrmecosistus melliger* y *M. mexicanus* (Ramos, 1982).

No obstante su importancia, es un grupo que no se ha estudiado mucho. En la región Neotropical, donde se incluye a México, se han registrado, según Kempf, 2,162 especies, siendo ésta la región más rica en mirmecofauna (Hölldobler & Wilson, 1990).

Dentro de los trabajos más específicos sobre la mirmecofauna de la región de Chamela, se puede mencionar el estudio realizado por Watkins II (1988) sobre la subfamilia Ectoninae en la Estación de Biología de Chamela.

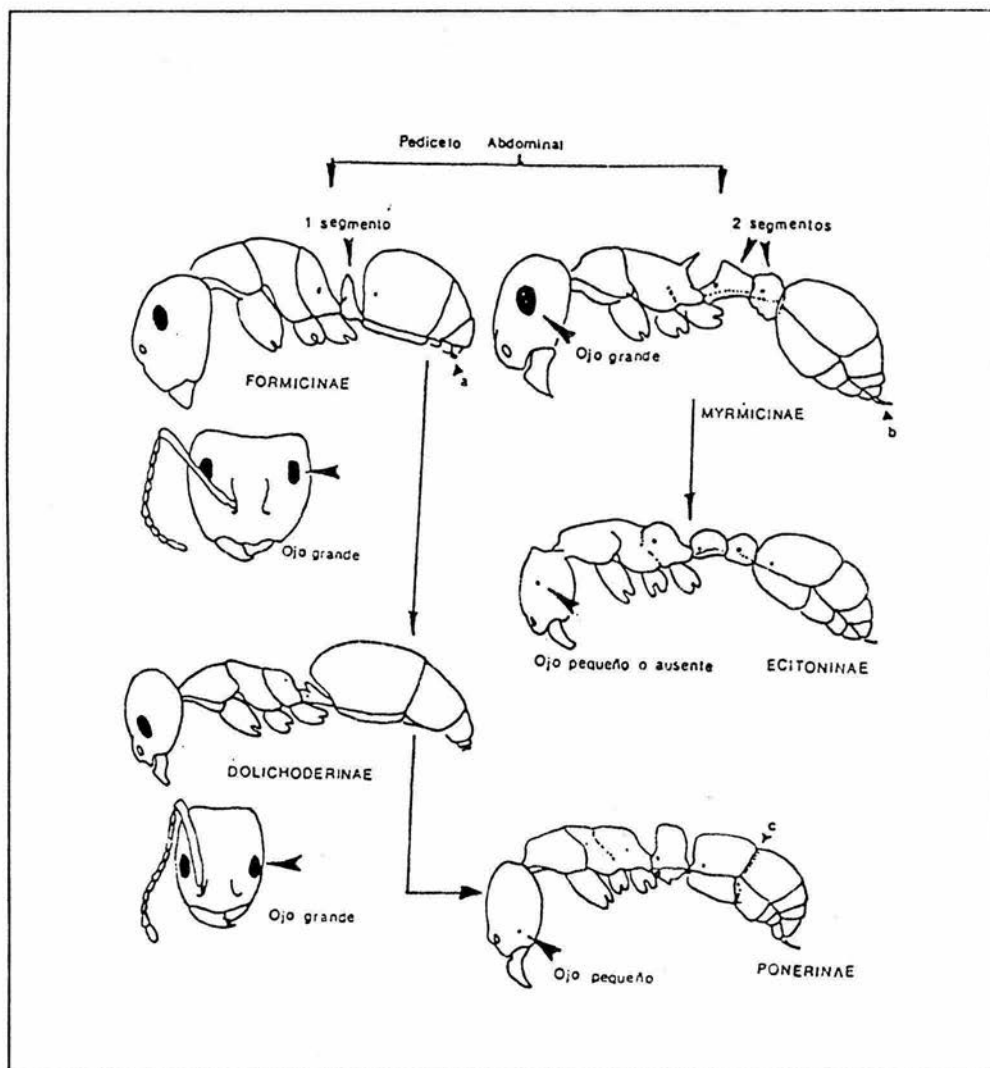


Figura 3. Principales subfamilias de hormigas. a=acidoporo, b=aguijón, c=constricción entre el pospedicelo y el gaster.

Modificado de DuBois, 1994.

El género *Crematogaster* está incluido dentro de la subfamilia Myrmicinae, una de las más grandes y con representantes en todo el Mundo (Wilson, 1979). Presenta antenas con 11 artejos y un par de espinas propodeales. El postpeciolo está conectado a la superficie dorsal del gaster, el cuál tiene forma de corazón en vista dorsal, con el ápice agudo. Es uno de los géneros con mayor número de especies en el mundo y, al mismo tiempo, posee importancia económica porque sirve de equilibrio con insectos del Orden Homoptera que son plagas (MacKay *et al.*, 1984). Algunas especies transportan a homópteros a los cultivos de piña y cacao para que se alimenten y también se ha observado que cuando las poblaciones de homópteros son muy grandes, las hormigas se comen a las larvas y adultos (Way, 1963).

Sus hábitos son preferencialmente arborícolas y resultan muy abundantes en el dosel de las selvas (Basset *et al.*, 1992). No obstante, es uno de los grupos de cuya biología se conoce poco, debido principalmente a que anidan en plantas donde su recolecta es difícil (MacKay *et al.*, 1984).

Debido a que no existen trabajos que reporten el uso de técnicas de espectroscopía Infrarroja y Raman como herramientas que permitan corroborar la separación específica de organismos, este trabajo se plantea como una primera propuesta para la aplicación práctica de dichas técnicas.

Aprovechando parte del material colectado dentro del proyecto DGAPA (UNAM) IN2078/9 "Efectos del Uso de la Selva Baja Caducifolia en la Fauna de Artrópodos", se escogió al género *Crematogaster* por ser el más abundante y haber sido plenamente identificadas dos especies.

Por otro lado, este trabajo también pretende ser una aportación al conocimiento de la mirmecofauna mexicana.

a) OBJETIVOS GENERALES.

i) Caracterizar mediante el uso de espectroscopías Raman e Infrarroja por transformada de Fourier la ultraestructura química de dos especies de hormigas: *C. sumichrasti* y *C. brevispinosa*.

ii) Desarrollar la tecnología y metodología de análisis química ultraestructural como una herramienta de auxilio y apoyo a la caracterización de una fauna local de hormigas y a la bromatología.

iii) Realizar observaciones de morfología externa e interna detallada utilizando técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido que ayuden a cotejar las diferencias entre las dos especies.

b) OBJETIVOS PARTICULARES.

i) Contribuir al conocimiento de la mirmecofauna de la Estación de Biología Chamela, Jal.

ii) Evaluar el potencial nutricional de distintas especies de hormigas mediante la interpretación de espectros Raman e Infrarrojo.

iii) Aplicar una tecnología novedosa en el estudio ultraestructural de algunas especies de hormigas.

MATERIAL Y METODO.

A) ZONA DE ESTUDIO.

La Estación de Biología Chamela de la UNAM comprende una parte de la costa del Estado de Jalisco (México), principalmente entre el Río San Nicolás al norte y Río Cuitzmala al sur, en la Latitud 19° 30' N y Longitud 105° 03'W (Figura 4).

El ambiente físico es de tierra baja (la mayor parte abajo de 200 m snm), las rocas son riolitas y basaltos, mientras en la región circundante el granito es abundante; los suelos son arenosos, neutros, con poca materia orgánica. El clima es poco estacional en cuanto a la temperatura, con promedios mensuales máximos de 28.8 a 32.2 °C, mínimos de 15.9 a 22.6°C. La precipitación pluvial promedio anual es de 707 mm. En la época de secas no se presentan vientos alisios sino locales; los huracanes se presentan con cierta frecuencia. Los tipos de vegetación son bosques tropicales, caducifolio y subperennifolio. La diversidad de especies de plantas leñosas es alta; la flora de la Estación sobrepasa las 780 especies y las dos familias con más diversidad son Leguminosae y Euphorbiaceae (Bullock, 1988).

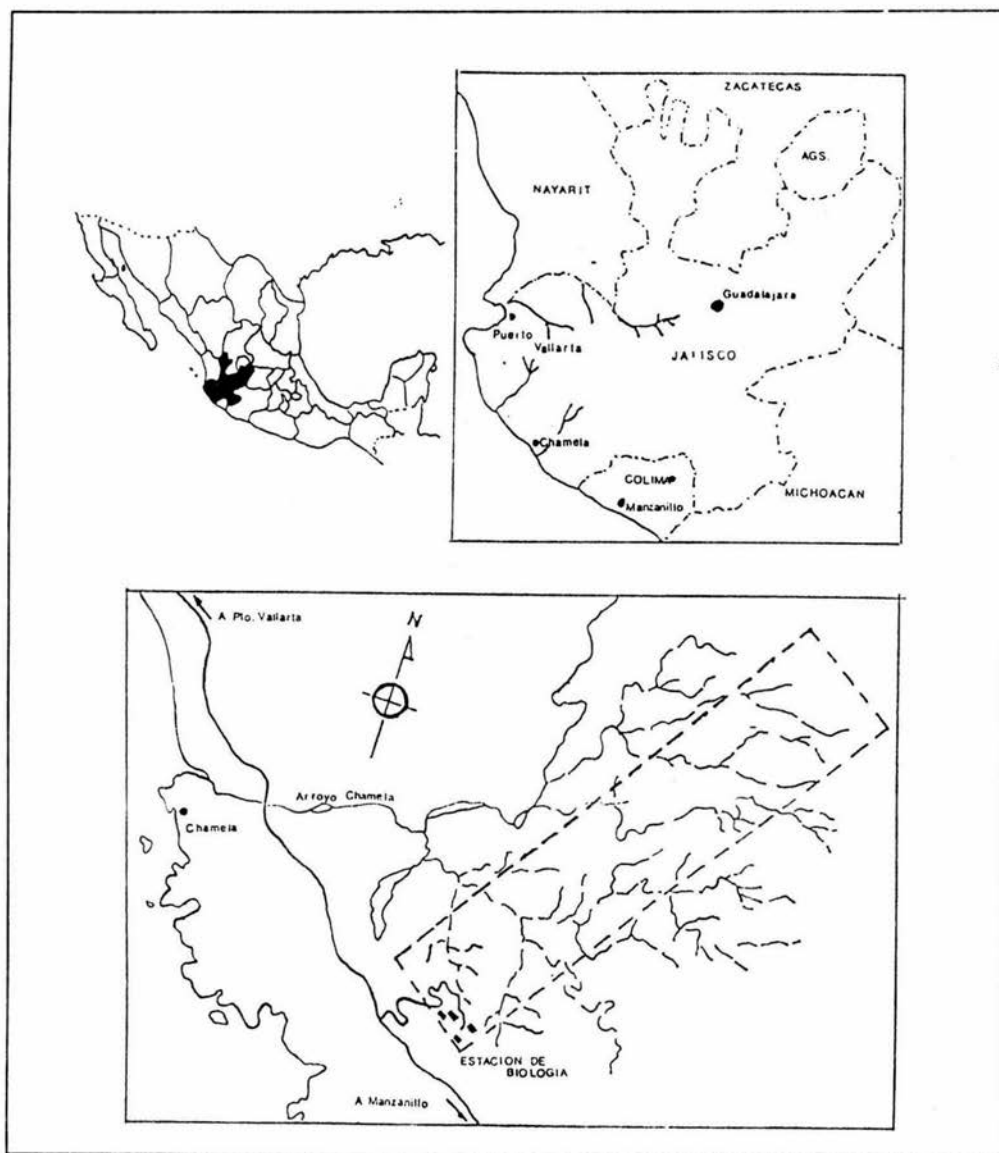


Figura 4.- Localización de la zona de estudio en el Estado de Jalisco.

B) COLECTA

Para la colecta de hormigas se realizaron muestreos en los años de 1991 a 1993 mediante tres métodos diferentes.

El primero consistió en la obtención de muestras de suelo y hojarasca, los cuales se realizaron mensualmente de julio de 1991 a julio de 1992. Tales muestras fueron procesadas en embudos de Berlesse-Tullgren durante seis días, tres sin luz y tres con luz.

El segundo muestreo incluyó el uso de trampas de Malaise en dos cuencas del sistema hidrológico de la Estación (Cervantes, 1988) denominadas cuencas I y IV (Cervantes *et al.*, 1988), en cada cuenca se colocaron 5 trampas, que permanecían abiertas una semana cada 15 días, durante el período comprendido entre julio de 1991 y julio de 1992.

Finalmente, se realizaron fumigaciones del follaje de la selva en distintos sitios durante los meses de Agosto y Septiembre de 1992 y en Marzo de 1993. En cada ocasión se delimitó un área de 100 m², de la cuál, con la ayuda de embudos de 0.5 m de diámetro, se cubrió un 30% del total. El insecticida utilizado fue aplicado con una nebulizadora, entre las 4 y 6 de la mañana. Se utilizó un insecticida a base de piretrinas naturales, que son fotodegradables y atacan el sistema nervioso de los insectos, paralizándolos.

El material obtenido mediante los tres métodos de colecta fué preservado y almacenado en alcohol 70%.

C) PROCESAMIENTO DEL MATERIAL.

C1) Microscopía.

Una vez obtenido el material biológico se procedió a la separación, cuantificación e identificación del mismo.

La identificación de las hormigas a nivel de género se realizó con el auxilio de claves como las de MacKay (1988).

Se montaron algunos ejemplares con el fin de tener una colección de referencia, así como para mandar algunos con especialistas y corroborar su identificación.

Al mismo tiempo que se separaron e identificaron, se seleccionaron las especies más abundantes, para realizar los análisis de espectroscopía Raman e Infrarrojo, así como los de microscopía óptica (MO) y electrónica de transmisión (MET) y barrido (MEB), además de que se trabajó con la fauna más representativa de la región. Los análisis de espectroscopía y microscopía se realizaron en el Laboratorio de Caracterización Óptica del Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto de Física de la UNAM.

En la preparación de los ejemplares se siguieron las técnicas convencionales para MET y MEB (Bozzola & Russell, 1992), con algunas modificaciones de acuerdo al tipo de material con el que se trabajó.

Para elegir el fijador que mejor funcionara (para los estudios mediante microscopía), algunas hormigas fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato 0.1M pH 7.4 y otras de ellas en fijador de Karnovsky, en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4, aunque no se observaron diferencias aparentes entre un fijador y otro.

En la preparación de los ejemplares para observación en Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), después de fijar por 3 hrs, se realizaron tres lavados con buffer de cacodilato o fosfato (según el fijador utilizado) de 10 min. cada uno y luego se dejaron durante 2 hrs. en una mezcla de osmio al 1% en buffer de cacodilato o fosfato quedando una concentración final de 0.1M y pH 7.4. Se procedió entonces a deshidratar con alcoholes graduales de 70%, 80%, 90% y 100%, dejando los organismos 10 min. en cada alcohol. Finalmente, se realizó la preinclusión, poniendo los ejemplares en óxido de propileno durante 15 minutos, luego en una mezcla 3:1 de óxido de propileno y resina "Epon 812" durante 12 hrs., después en una mezcla 1:1 durante 24 hrs., siguiendo la mezcla 1:3 durante 12 hrs. y, finalmente se incluyó el espécimen en resina "Epon 812" pura durante 48 hrs a 60° C para formar bloques de inclusión.

Una vez listos los bloques se realizaron los cortes convenientes de la cabeza y el

abdomen del espécimen, utilizando un ultramicrotomo RCM MT 6000-XL. Los cortes fueron montados tanto para observación en microscopía óptica como para electrónica de transmisión.

Los cortes semifinos se utilizaron para microscopía óptica, se contrastaron con azul de toluidina y se montaron con Bálsamo de Canadá. Las observaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio óptico con contraste de fase Zeiss.

Los cortes finos para observación en microscopía electrónica de transmisión, se contrastaron con acetato de uranilo y una mezcla de citrato de plomo y sodio y montados en rejillas, observándose en un microscopio JEOL 100 CX con configuración analítica.

Los organismos utilizados en el estudio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), después de haberse fijado y lavado con buffer, fueron colocados en alcohol al 70%, realizándose en algunos casos disecciones. Los organismos completos se sometieron a un lavado con buffer en el sonicador durante 7 períodos de 5 segundos cada uno, antes de ser pasados por alcoholes graduales para su deshidratación.

Luego se les puso una gota de hexametildisilazano, que permite desecar la muestra sin maltratarla, según la técnica de Nation (1983). Posteriormente fueron pegados al portamuestras con pintura de plata y cubiertas con una capa delgada de oro para su observación. Para ello se utilizó un microscopio de barrido JEOL JSM-5200.

Las sustancias utilizadas en el procesamiento de muestras para microscopía óptica y electrónica, fueron preparadas según las técnicas de Mercer y Birbeck (1966) y Millonig (1976). En el Apéndice I se muestra la preparación de sustancias utilizadas y las técnicas generales.

C2) Espectroscopía.

Para los análisis de proteínas, para cada una de las especies, se pesaron en húmedo 2 gr. de hormigas (alrededor de 100 organismos), se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron finamente. Se agregaron 5 ml de buffer de fosfatos 0.1M pH 7 y de una solución 1% de cloruro de sodio y se homogenizó la muestra, dejando reposar en el refrigerador durante 24 hrs. Posteriormente se centrifugó la muestra utilizando una centrífuga IEC-Centra-HN, a 5000 rpm durante 5 minutos.

Se colocó media gota del sobrenadante obtenido en una ventana de bario como portamuestras para ser leído en Infrarrojo, realizándose 32 barridos para obtener el espectrograma. Para leer en Raman se utilizó aproximadamente 0.5 ml del sobrenadante, conteniéndolo en un tubo de cuarzo como portamuestras, obteniéndose el espectro del promedio de 400 barridos.

El precipitado fué secado al aire y, una vez seco, se tomó una pequeña cantidad y se mezcló con bromuro de bario, que funciona como blanco, colocándose en un portamuestras y

leyéndose en Infrarrojo. En este caso se hicieron 70 barridos. Para leer en Raman, la mezcla de muestra y bromuro de potasio se colocó en el tubo de cuarzo y se realizaron 400 barridos.

Las lecturas en Infrarrojo y Raman se llevaron a cabo en un espectrómetro Nicolet 510 FT-IR y Nicolet Raman 910 respectivamente.

Se localizó la longitud de onda a la que corresponden los picos obtenidos en los espectrogramas y se identificó a que compuesto pertenecen.

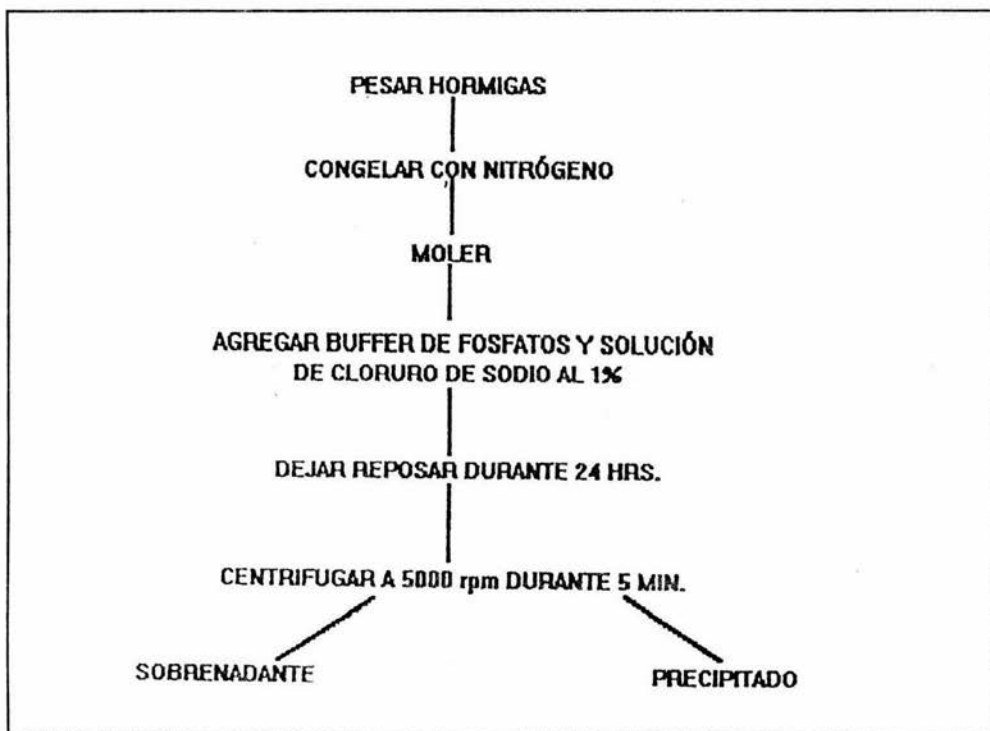


Figura 5.- En el diagrama se resumen los diferentes pasos en el procesamiento de las muestras para espectroscopía.

RESULTADOS.

A) MIRMECOFAUNA DE CHAMELA

Las especies encontradas se muestran en la siguiente lista faunística, donde se indica también el método de colecta que se utilizó en su captura.

Como puede observarse en la tabla, se encontraron un total de 34 géneros: con el método de fumigación se colectaron 24, con trampas de malaise 23 y en suelo y hojarasca, 10 géneros.

Cabe señalar que en selvas altas de Nueva Guinea se han reportado 59 géneros y en bosques de Florida y Michigan menos de 30 (Wilson, 1959), lo que indica que la fauna de hormigas existente en Chamela tiene una diversidad considerable.

En cuanto al número de organismos, los más abundantes fueron *Crematogaster sumichrasti* con 238 y *Crematogaster brevispinosa* con 294 (Figura 6), realizándose con ellos los análisis de microscopía y espectroscopía.

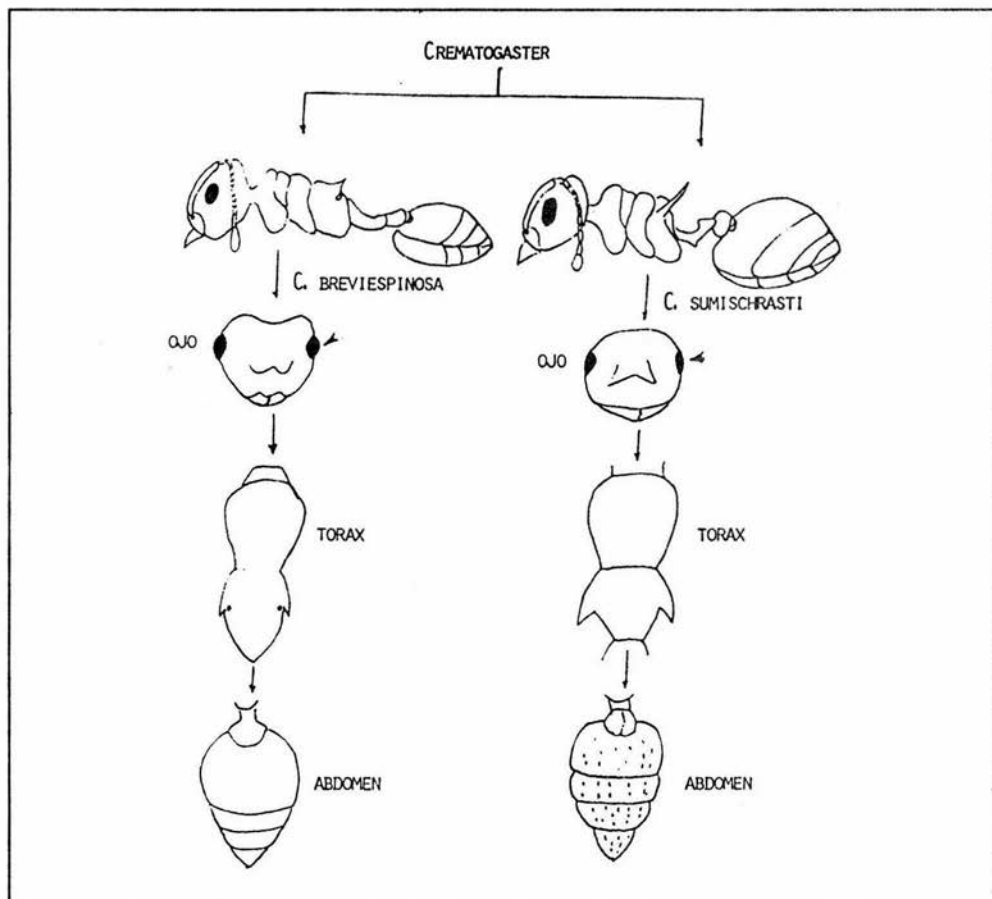


Figura 6.- Características principales de *C. sumichrasti* y *C. brevispinosa*.

HORMIGAS DE LA ESTACIÓN DE BIOLOGÍA

CHAMELA, JAL.

Taxa	Trampa de Malaise	Fumigación	Suelo y Hojarasca
<i>Crematogaster brevispinosa</i>	X	X	X
<i>C. sumichrasti</i>	X	X	
<i>Zacryptocerus multiespinosus</i>	X	X	
<i>Pheidole sp.</i>	X	X	
<i>Pseudomyrmex gracilis</i>	X	X	
<i>P. palidus</i>	X	X	
<i>P. major</i>	X		
<i>P. unicolor</i>	X		
<i>Solenopsis sp.</i>	X	X	X
<i>Forelius sp.</i>	X	X	
<i>Smithistruma sp.</i>		X	X
<i>Conomyrma sp.</i>		X	
<i>Tapinoma sp.</i>	X	X	X
<i>Hypoclinea sp.</i>		X	
<i>Iridomyrmex sp.</i>	X	X	
<i>Myrmecina sp.</i>	X	X	
<i>Neostruma sp.</i>		X	
<i>Leptothorax sp.</i>	X	X	X
<i>Amblyopone sp.</i>		X	
<i>Strumigenys sp.</i>		X	X
<i>Pachycondyla vilosa</i>	X	X	
<i>Neivamyrmex graciellae</i>	X	X	

Taxa	Trampa de Malaise	Fumigación	Suelo y Hojarasca
<i>Acromyrmex sp.</i>		X	
<i>Ectatomma sp.</i>	X		X
<i>Atta mexicana</i>	X		X
<i>Camponotus sp.</i>	X		
<i>Eciton vagans</i>	X		
<i>Odontomachus sp.</i>	X		
<i>Prionopelta sp.</i>	X		
<i>Paratrechina sp.</i>	X		
<i>Prenolepis sp.</i>	X		
<i>Lasius sp.</i>	X		
<i>Aphaenogaster sp.</i>	X		X
<i>Brachymyrmex sp.</i>	X		X
<i>Gnamptogenys sp.</i>		X	
<i>Megalomyrmex sp.</i>		X	
<i>Cyphomyrmex sp.</i>		X	
<i>Hypoponera sp.</i>		X	
<i>Typhlomyrmex sp.</i>		X	

B) MICROSCOPIA

Con auxilio de técnicas de microscopía electrónica de transmisión y barrido, así como de microscopía óptica, se observaron las características morfológicas y anatómicas de *C. breviespinosa* y *C. sumichrasti* como se muestra en las fotografías siguientes.

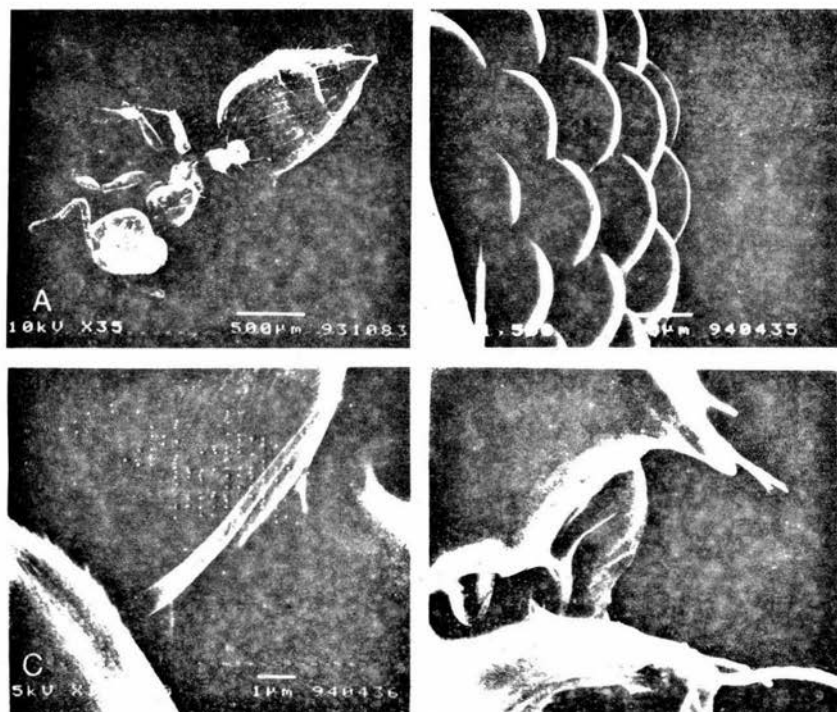


Lámina I. Microscopía Electrónica de Barrido en *C. sumichrasti*. A. Vista general B. Ojo compuesto. C. Acercamiento del ojo y sedas entre las facelas. D. Vista del metatórax.

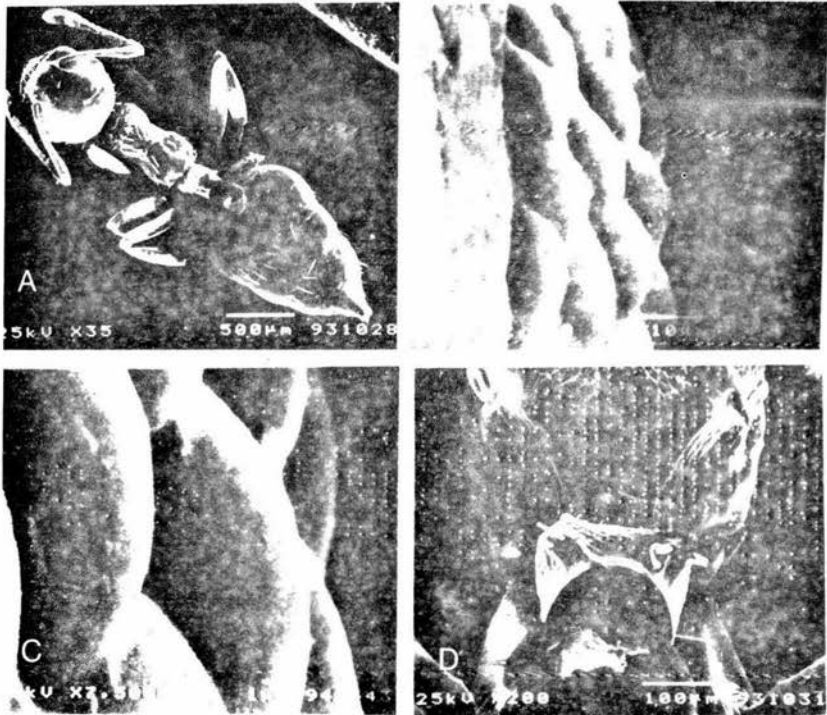


Lámina II. Microscopía Electrónica de Barrido en *C. brevispinosa*. A. Vista general. B. Ojo compuesto. C. Acercamiento del ojo. D. Vista del metatórax donde se observan las aperturas de la glándula metatorácica.

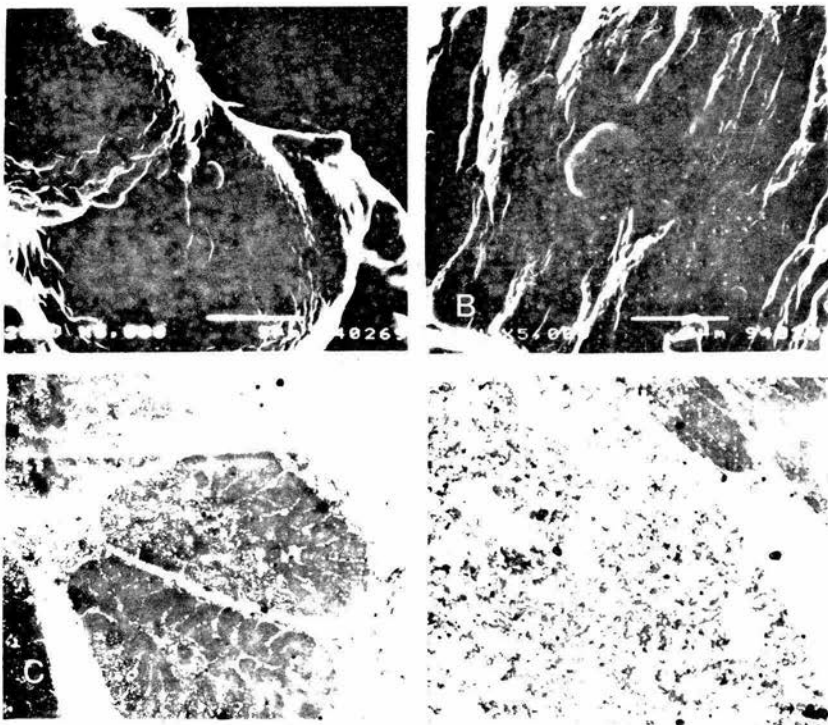


Lámina III. A. Túbulo de Malphigio y hemocitos en *C. sumichrasti*. B. Túbulo de Malphigio y hemocito en *C. brevispinosa*. C. Corte de túbulo de Malphigio en *C. sumichrasti* (MET). D. Corte de músculo y glándula en el abdomen de *C. sumichrasti* (MET).

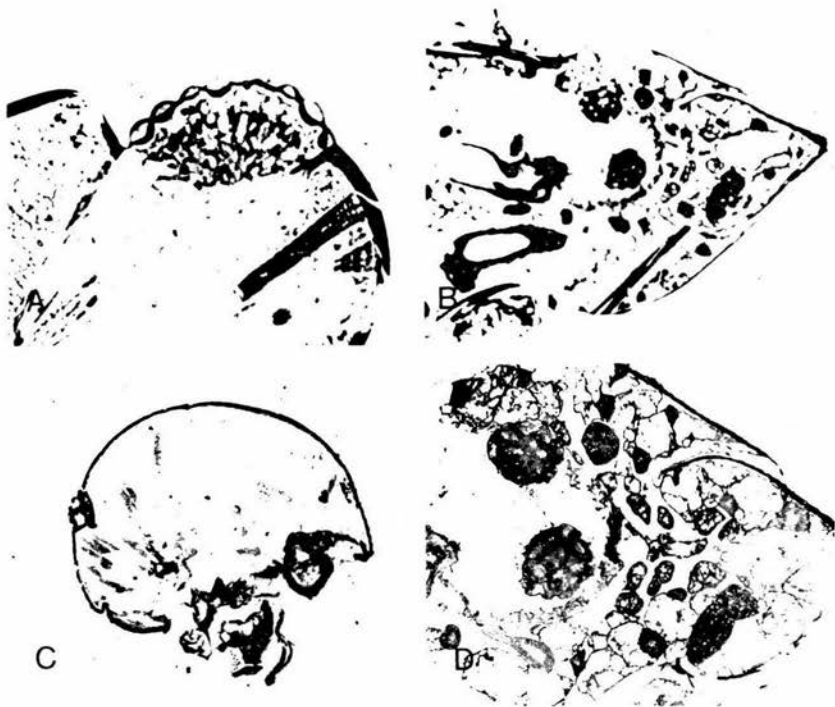


Lámina IV. Microscopía óptica. A. Corte longitudinal de cabeza en *C. sumichrasti*, se aprecia la musculatura del aparato bucal y ojo. B. Corte longitudinal del abdomen donde se aparecia la musculatura y los túbulos de Malphigio. C. Corte de cabeza de *C. brevispinosa*. D. Corte del abdomen.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM

La presencia de sedas entre las ommatidias en los ojos de insectos ha sido registrada, generalmente, en aquellos que viven en árboles o que son polinizadores, como en las abejas. El que sólo *C. sumichrasti* las presente, puede relacionarse a que esta especie tenga mayor preferencia por el medio arborícola, ya que sólo se le encontró en el dosel y sotobosque de la selva, mientras que *C. brevispinosa* también fué colectada en el suelo y hojarasca y algunos nidos fueron observados en la parte baja de los troncos de los árboles. Esto indicaría que, pese a ser ambas especies con hábitos arborícolas, no compiten por el mismo espacio, ya que *C. sumichrasti* ocupa las partes más altas en los árboles de la selva, mientras que *C. brevispinosa* habita en zonas más bajas.

La secreción de la glándula metatorácica se ha relacionado con el marcaje de territorio en distintos grupos de hormigas (Jaffe & Puche, 1984). En *C. brevispinosa* las aberturas de la glándula son muy evidentes, y es muy posible que su función sea el marcaje del territorio, ya que en *C. sumichrasti* no se observaron estas aberturas, y se ha comprobado que las secreciones utilizadas por esta especie en el marcaje de territorio se producen en la cabeza y en el gaster (Jaffe & Pino, 1989).

Por otro lado, se observó que la musculatura de la región cefálica y del proventrículo, en las dos especies está muy desarrollada, ya que al alimentarse preferencialmente de las secreciones azucaradas de insectos homópteros, esta musculatura les facilita la absorción y regurgitación del alimento (Caetano, 1984).

Relacionado también con el tipo de dieta se encuentra la longitud del tubo digestivo. En las dos especies el tubo digestivo fue largo, coincidiendo con su dieta rica en carbohidratos, ya que en insectos con una dieta rica en proteínas se han observado tubos digestivos cortos (Chapman, 1975).

Así pues, de las observaciones mediante microscopía pueden obtenerse datos para interpretar aspectos biológicos de las especies, como son hábitat, conducta y hábitos alimenticios.

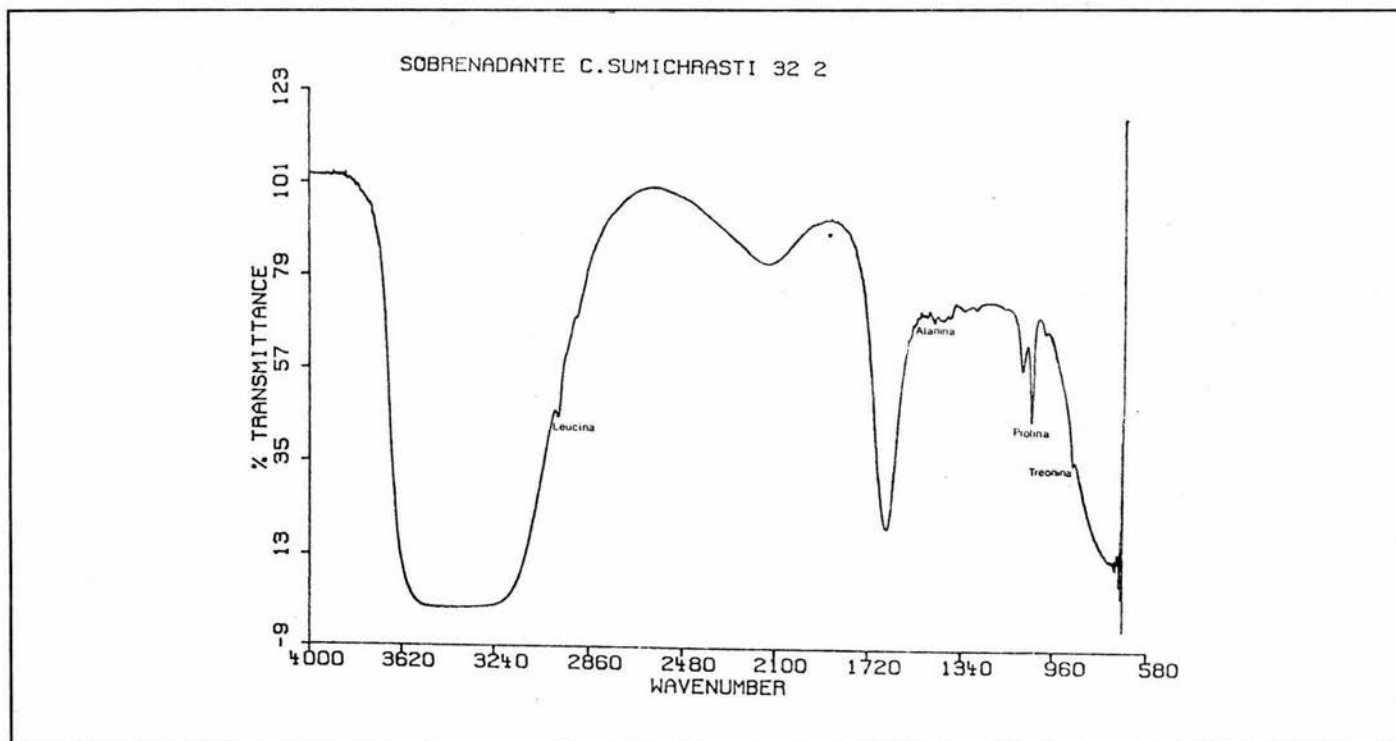
C) ESPECTROSCOPIA.

Se obtuvieron espectrogramas del sobrenadante de ambas especies tanto en Infrarrojo como en Raman, mientras que del precipitado sólo en Infrarrojo se obtuvo espectrograma, ya que al leerse en Raman se observó gran fluorescencia, lo que impide identificar los picos.

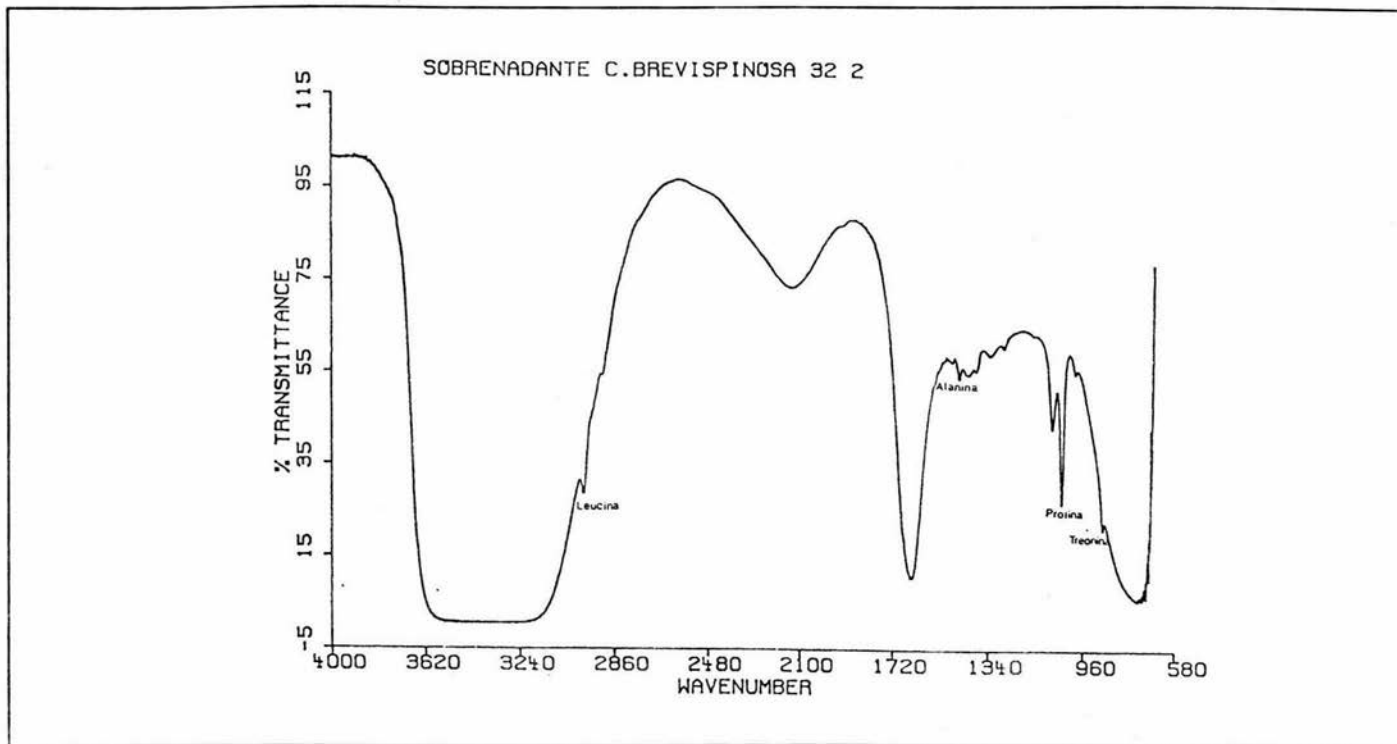
A continuación se presentan los espectros obtenidos de las dos especies, tanto en Raman como en Infrarrojo.

Los espectros 1, 2, 3 y 4 corresponden a las lecturas en Infrarrojo, y el 5 y el 6 a Raman. Los nones son de *C. sumichrasti* y los pares de *C. brevispinosa*.

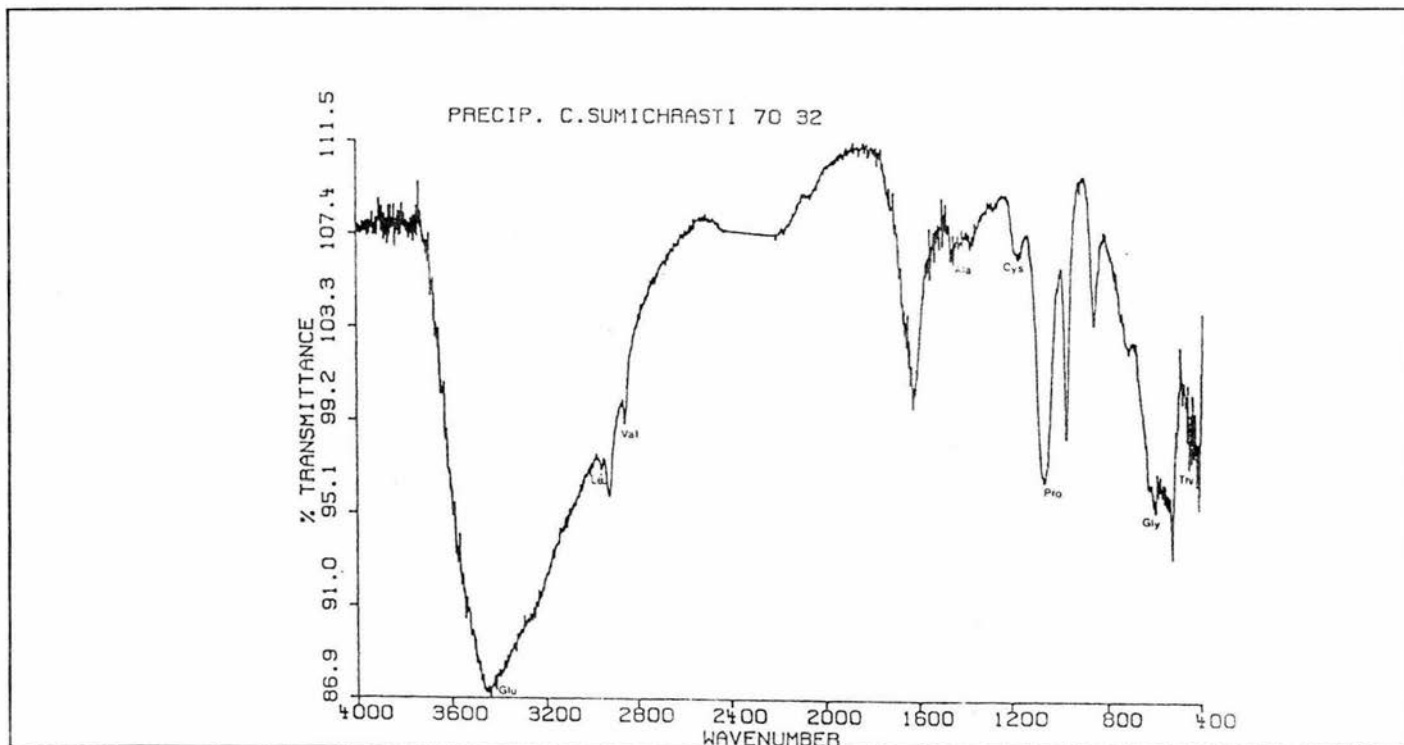
Como puede observarse, en general, los espectros de las dos especies, tanto en Raman como en Infrarrojo, son muy parecidos, aunque difieren en la magnitud de los picos.



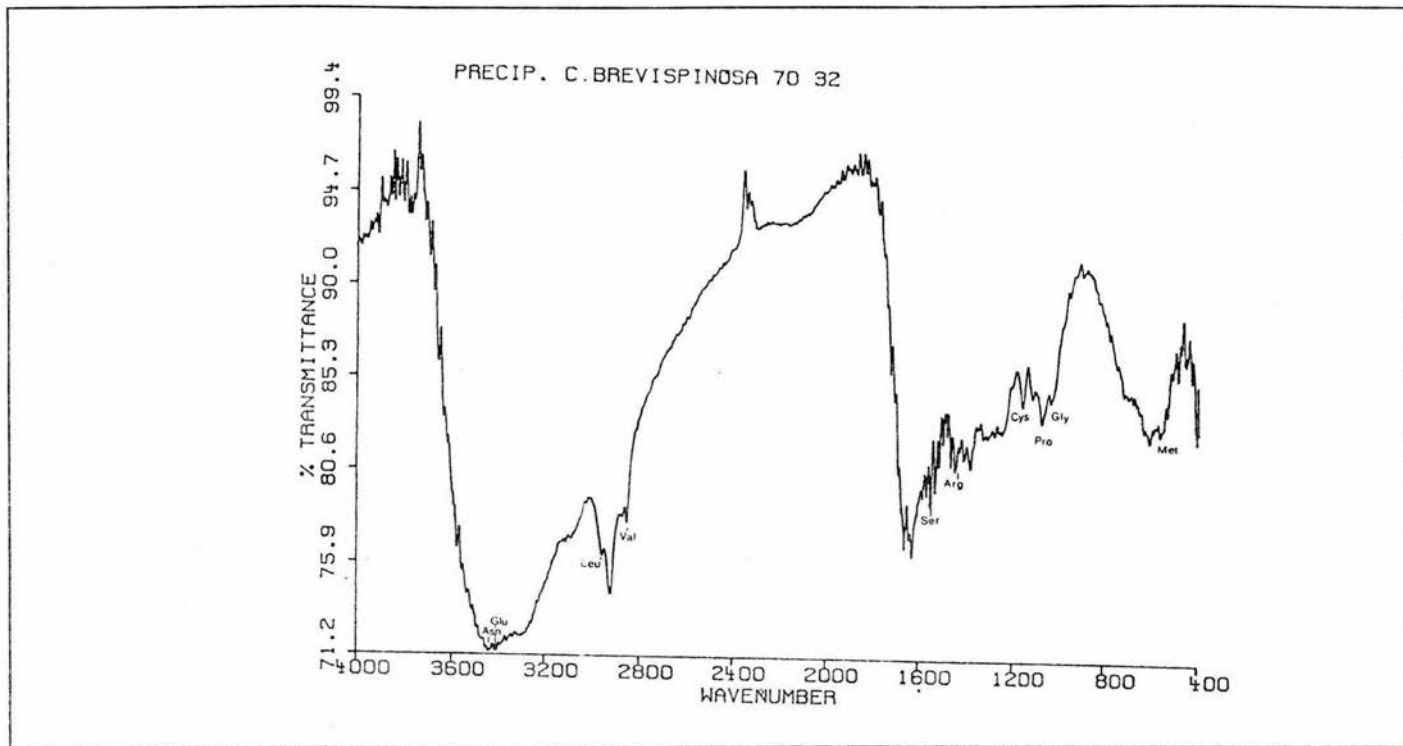
Espectro 1. Lectura en Infrarrojo del sobrenadante de *C. sumichrasti*.



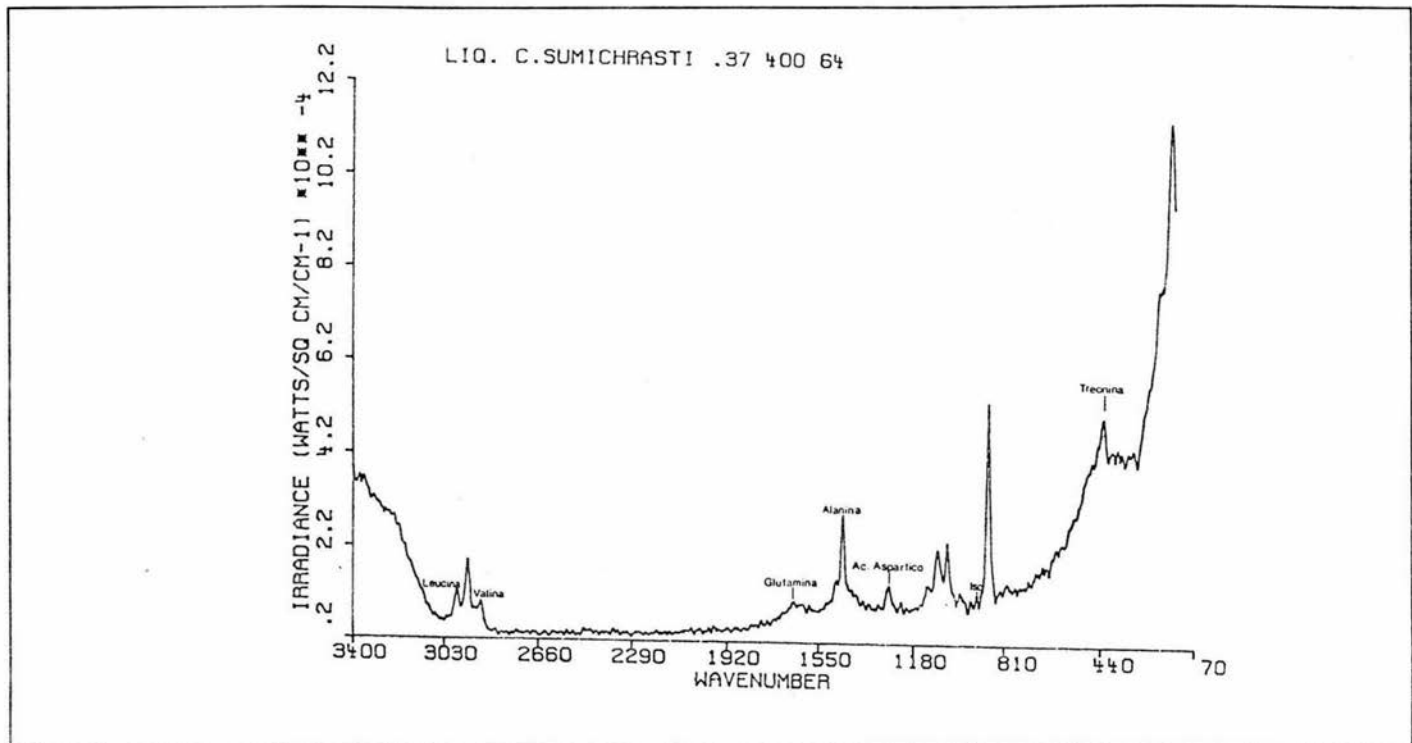
Espectro 2. Lectura en Infrarrojo del sobrenadante de *C. brevispinosa*.



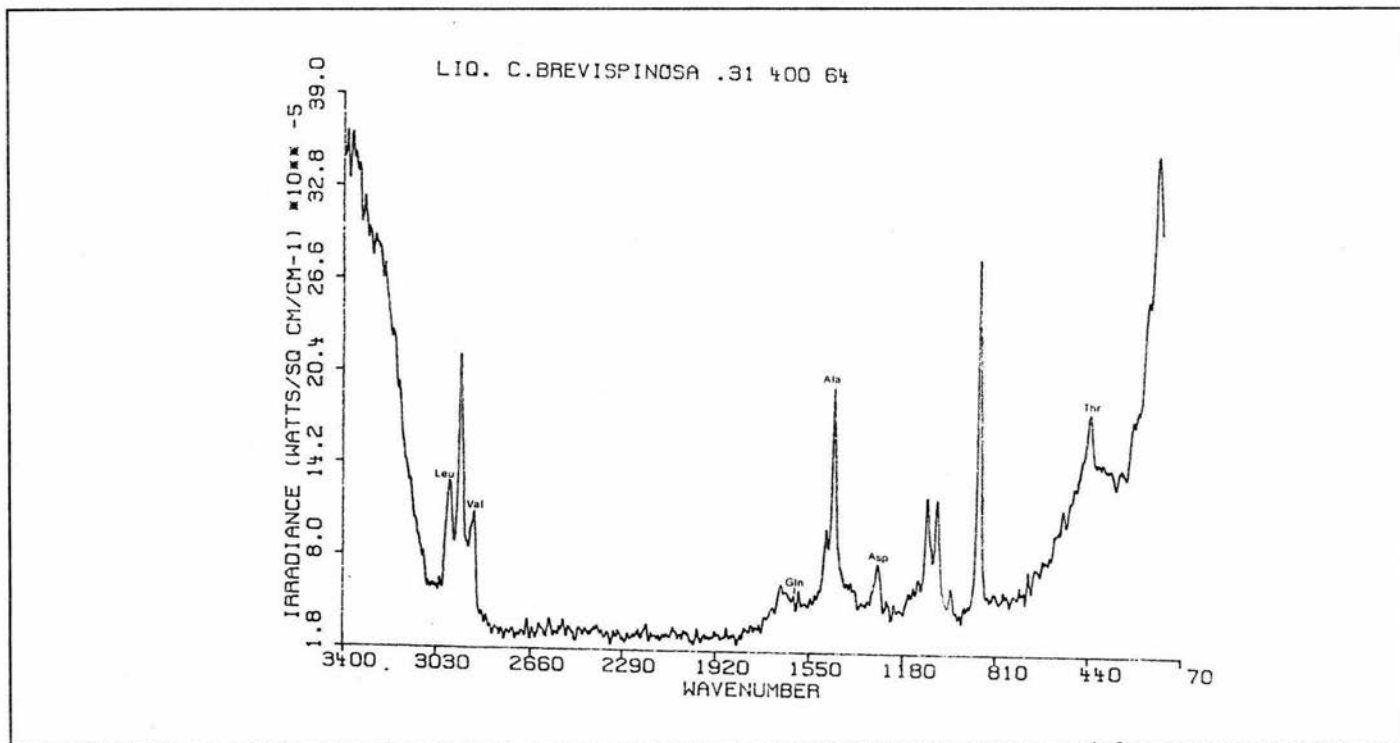
Espectro 3. Lectura en Infrarrojo del precipitado de *C. sumichrasti*.



Espectro 4. Lectura en Infrarrojo del precipitado de *C. brevispinosa*.



Espectro 5. Lectura en Raman del sobrenadante de *C. sumichrasti*.



Espectro 6. Lectura en Raman del sobrenadante de *C. brevispinosa*.

Se tomaron también espectros del buffer de fosfatos, tanto en Infrarrojo como en Raman, para eliminar los picos que se debían al buffer y no a la muestra (Figuras 7 y 8).

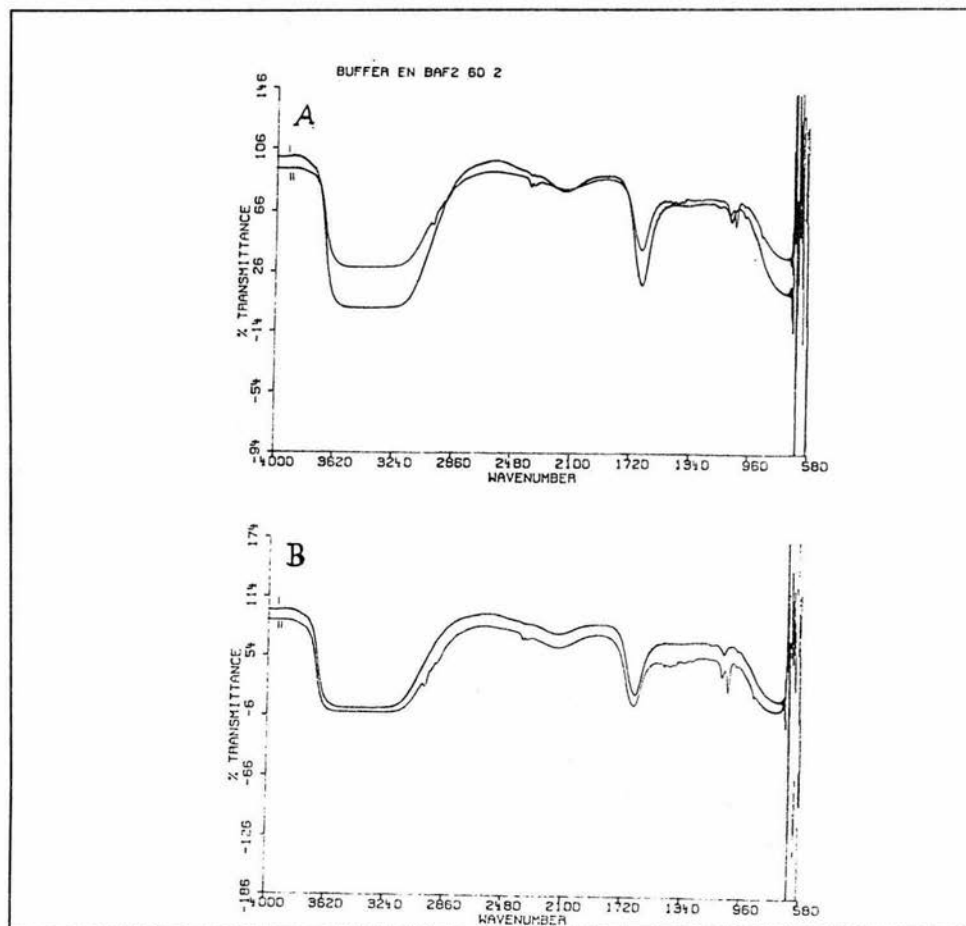


Figura 7. Espectros en Infrarrojo del buffer de fosfatos y el sobrenadante. El espectro A corresponde a *C. sumichrasti* el espectro B a *C. brevispinosa*. En ambos casos I es el espectro del buffer y II el de la muestra.

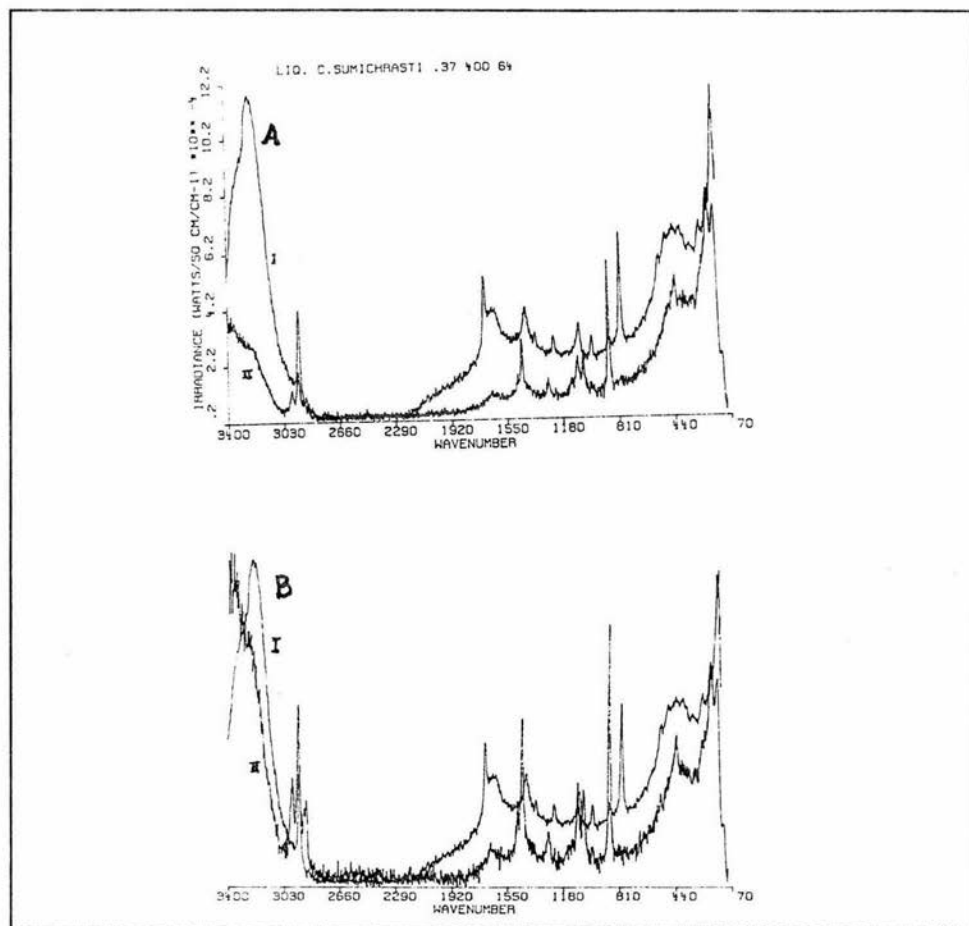


Figura 8. Espectros obtenidos en Raman de la lectura del buffer y el sobrenadante. El espectro A es de *C. sumichrasti* el B de *C. brevispinosa*. En los dos casos I es del buffer y II de la muestra.

Los espectros presentan bandas de absorción que son características de aminoácidos, de 1400 a 3600 cm^{-1} (Pretsch *et al.*, 1980). En el siguiente cuadro se muestran las bandas de absorción características de los aminoácidos.

**BANDAS DE ABSORCIÓN DE IR CARACTERÍSTICAS
DE AMINOÁCIDOS (EN CM^{-1})**

<i>Asignación</i>	<i>Intervalo normal</i>	<i>Observaciones</i>
N-H st O-H st	3400 - 2000	Generalmente intensa, ancha, muy estructurada. Subintervalos: zwitterión: 3100-2000, claro submáximo a 2200-2000 hidrocloruro: 3350-2000 sal Na: 3400-3200
+ NH ₃ δ as	1660 - 1590	Débil; en el hidrocloruro, en el límite inferior del intervalo
+ NH ₃ δ si	1550 - 1480	Media
COO ⁻ st as	1760 - 1595	Intensa Subintervalos: zwitterión: 1595 hidrocloruro: 1755-1700, en α - aminoácidos: 1760-1730 sal Na: 1595

Tomado de Pretsch *et al.* (1980)

Debido a que en los espectros obtenidos se tiene una mezcla de aminoácidos, se buscaron, en la bibliografía (Pouchert, 1985; Nakamoto, 1986), los espectros de infrarrojo de los distintos aminoácidos (en el Apéndice II se muestran los espectros de los aminoácidos

tomados del Aldrich Library of FT-IR Spectra), los cuáles se compararon con el espectro obtenido, y de esta manera se encontraron los picos correspondientes a cada aminoácido. A continuación se muestra una tabla con las abreviaturas correspondientes a los aminoácidos (Lehninger, 1983).

TAQUIGRAFÍA DE LOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA DE TRES LETRAS	SÍMBOLO DE UNA LETRA
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Acido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Como puede observarse, los espectros 1 y 2, correspondientes a los sobrenadantes leídos en Infrarrojo, son idénticos y se encontraron los mismos aminoácidos. Por otra parte, se observó una diferencia considerable tanto en la lectura de los precipitados como en los sobrenadantes leídos en Raman.

En los precipitados se encontró un mayor número de picos de aminoácidos que pudieron ser identificados, con un total de 12 (en los espectros de las dos especies), mientras que en los sobrenadantes se encontraron solamente 8, siendo 4 observados mediante Infrarrojo y 7 con Raman.

En la tabla I se muestran los aminoácidos localizados tanto en *C. brevispinosa* como en *C. sumischrasti* mediante espectroscopía Infrarroja.

Ya que los espectros de Raman son complemento de los de Infrarrojo, se tomaron como base éstos para la identificación de los aminoácidos en los espectros Raman. En la tabla II se muestran los aminoácidos así identificados.

En total, se identificaron 15 aminoácidos mediante los dos métodos; ocho aminoácidos (aspargina, ácido glutámico, arginina, cisteína, prolina, serina, glicina y metionina), se observaron solamente en los espectros de Infrarrojo, mientras que los picos de glutamina, isoleucina y ácido aspártico, aparecieron unicamente en las lecturas de Raman.

En las dos especies se encontraron 14, los aminoácidos que no se compartieron en ambas especies fueron Isoleucina (leído en Raman), sólo presente en *C. sumischrasti*, y Metionina (leído en Infrarrojo), que se detectó solamente en *C. breviespinosa*. Cabe señalar que en *C. breviespinosa* la mayoría de los aminoácidos se presentaron en el precipitado.

TABLA I
AMINOACIDOS IDENTIFICADOS EN LOS ESPECTROS
DE INFRARROJO

AMINOÁCIDO	LONG. DE ONDA	<i>Crematogaster breviespinosa</i>	<i>Crematogaster sumischrasti</i>	ESP.
Aspargina	3438.6	X		4
Acido glutámico	3406.9-3400	X	X	3,4
Leucina	2988.3-2955.8	X		2,4
	2978.3-2960		X	1,3
Valina	2852.9-2853.5	X	X	3,4
Serina	1598.8	X		4
Alanina	1454.1-1442.7	X	X	1,2,3
Arginina	1438.5	X		4
Cisteina	1172.4-1160	X	X	3,4
Prolina	1071-1074.5	X	X	3,4
	1040-1034.2	X	X	1,2
Glicina	1033.2-549.6	X	X	3,4
Treonina	456	X		4
	872.1-865.1	X	X	1,2
Metionina	560.5	X		4

ESP= Espectro.

TABLA II
AMINOACIDOS IDENTIFICADOS EN LOS ESPECTROS
DE RAMAN

<i>AMINOACIDO</i>	<i>LONG. DE ONDA</i>	<i>Crematogaster breviespinosa</i>	<i>Crematogaster sumischrasti</i>
Leucina	2976.9-2973.7	X	X
Valina	2880.5-2880.4	X	X
Glutamina	1592.5-1588.5	X	X
Alanina	1453.1-1450.5	X	X
Ac. Aspártico	1276.4-1275.4	X	X
Isoleucina	921.5		X
Treonina	438,6-432.6	X	X



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

DISCUSION.

Los resultados obtenidos de los análisis por espectroscopía Raman e Infrarroja, de las dos especies de *Crematogaster*, no sólo ofrecen información sobre la composición química de las mismas, sino que, los espectrogramas obtenidos pueden servir como un elemento en la identificación de las hormigas.

De los 15 aminoácidos encontrados, 12 son compartidos por las dos especies, y tres son exclusivos para cada una de las especies. Por un lado la isoleucina sólo se presenta en *C. sumichrasti*, mientras que la metionina y arginina se observaron únicamente en *C. brevispinosa*. Comparando con lo reportado en otras especies de hormigas, como *Atta mexicana*, donde se han encontrado 18 aminoácidos, utilizando métodos de aminogramas (Ramos, 1982), se puede considerar que mediante espectroscopías Raman e Infrarroja se puede tener una buena detección de aminoácidos, no obstante se debe tomar en cuenta que, debido a que se trata de una mezcla, algunos aminoácidos pueden haber quedado enmascarados por otros y no es fácil identificarlos. Así, los espectros indican que estas especies de hormigas podrían tener cierto potencial nutricional, además de que tales espectros puede servir como una herramienta en la caracterización de las especies.

Por otra parte, también podemos relacionar lo encontrado en los espectros con aspectos de morfología y comportamiento de los organismos.

Como se muestra en la tabla I, *C. brevispinosa* tuvo más aminoácidos tanto en número como en cantidad (de acuerdo a la amplitud de sus picos), y fué así mismo, la especie que se encontró en mayor abundancia (294 organismos). Esta especie, además de forrajear en los árboles, también lo hace en el suelo y hojarasca de la selva, e incluso se le ha observado alimentándose de pequeños insectos muertos (Quiróz y Garduño, 1989). Tales hábitos podrían intergrar una dieta más rica que la de *C. sumischrasti*, que se limita a forrajear en el dosel de la selva, lo que implicaría que *C. brevispinosa* sea más rica desde el punto de vista protéico.

Por otra parte, los estudios realizados en *C. brevispinosa* y *C. sumischrasti*, mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de transmisión (MET) y barrido (MEB), apoya lo que se obtuvo con espectroscopía. Tales estudios refuerzan el conocimiento que se tiene del género y permiten relacionar las observaciones de las características morfológicas apreciadas, con aspectos biológicos como son hábitat, comportamiento y hábitos alimenticios, y que concuerdan con las observaciones realizadas en estos aspectos por algunos investigadores (Quiróz y Garduño, 1989). Con ello que comprende mejor el papel que desempeñan estas especies dentro de la comunidad que integran.

En cuanto a la mirmecofauna existente en Chamela, de acuerdo con la cantidad de géneros encontrados, y comparando con los registros que se tienen de selvas altas (donde existe la fauna más rica de hormigas en el mundo), la región de Chamela puede considerarse de alta riqueza mirmecológica, pese a esto es poca la información que se tiene sobre las hormigas de Chamela.

La mayoría de los géneros encontrados se tienen representados en la Colección Regional de la Estación de Biología de Chamela, aunque no todos están determinados a nivel de especie.

Este tipo de estudios, que integran la información obtenida mediante distintos métodos (uso de claves, MO, MET, MEB, espectroscopía Raman y espectroscopía Infrarroja), abren nuevos caminos en el conocimiento de los organismos, que nos permiten comprender mejor su funcionamiento en el espacio que ocupan.

CONCLUSIONES.

México, pese a encontrarse en una de las zonas más ricas en mirmecofauna del mundo, es uno de los países más desconocidos en este sentido en el Nuevo Mundo. Se han reportado alrededor de 100 géneros de hormigas y se piensa que existen más de 1,000 especies (MacKay, 1988). La diversidad encontrada en la Estación de Biología de Chamela, 34 géneros, sin utilizar un tipo de colecta específico para la captura de hormigas, hace pensar que se trata de una región con una gran riqueza mirmecológica, que valdría la pena estudiar más a fondo.

La identificación de los compuestos constitutivos de los organismos, mediante técnicas de espectroscopía Raman e Infrarroja por Transformada de Fourier, ofrece grandes posibilidades de aplicación en distintos campos de la Biología, en particular en la Taxonomía.

La espectroscopía no sólo aporta nuevas herramientas en el estudio de los organismos, sino que refuerza y complementa el conocimiento que se tenga de ellos, ya que el conocimiento debe ser integral.

La realización de espectros de distintas especies, no sólo de hormigas, sino de otros grupos de insectos, puede auxiliar enormemente en la caracterización de especies que con métodos convencionales puedan resultar muy parecidas, ya que se puede localizar compuestos que sean característicos de cada especie, además de que, una vez identificado el compuesto, se le puede buscar una aplicación práctica, ya sea en el consumo humano, como en la interpretación

de fenómenos ecológicos en las poblaciones.

Los resultados obtenidos son de gran importancia, ya que constituyen un antecedente para el uso de técnicas de espectroscopía Raman e Infrarroja en el estudio de aminoácidos en insectos.

Por otra parte, de acuerdo con los objetivos iniciales del trabajo, los resultados muestran que todos fueron ampliamente cumplidos: se sentaron las bases para la obtención de muestras de insectos que puedan ser analizadas mediante espectroscopía Raman e Infrarroja; mediante los espectros obtenidos se determinaron los aminoácidos integrantes de *C. brevispinosa* y *C. sumichrasti*, encontrándose que la metionina y arginina sólo se presentan en la primera especie y la isoleucina es característica de la segunda; se detalló la morfología de las dos especies mediante estudios de microscopía y las observaciones se relacionaron con el conocimiento previo que se tenía sobre las mismas; se determinó la existencia de una alta riqueza mirmecológica en la región, y finalmente, aunque no se reporta que las especies estudiadas sean comestibles, la cantidad de aminoácidos esenciales encontrados en ellas indican que tienen un potencial nutricional considerable, de tal forma que podrían ser consideradas para integrarse a la dieta humana, ya que son muy abundantes, una vez que se realicen los estudios pertinentes sobre este punto. Por otra parte, estas técnicas pueden implementarse en otros insectos de los cuales se sepa que sean consumidos por el hombre.

Así mismo, los estudios de microscopía electrónica y óptica ponen de manifiesto que el estudio de la morfología es un aspecto que no pasa de moda, ya que a partir de las observaciones realizadas, además de caracterizar y diferenciar a las especies, podemos interpretar aspectos de su hábitat, comportamiento, hábitos alimenticios, etc.

No obstante, la preparación y obtención de muestras es susceptible de ser mejorada, lo que implica que se obtengan espectros más puros, hecho que facilita el análisis e interpretación de los mismos, logrando con esto obtener mayor información mediante este método.

BIBLIOGRAFÍA

- Arêas, E., J. R. Giglio, E. C. Arantes & Y. Kawano. 1987. Raman and infrared spectra of toxin gamma from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 915 (2): 292-298.
- Basset, Y., H. P. Aberlenc & B. Delvare. 1992. Abundance and stratification of foliage arthropods in a lowland rainforest of Cameroon. *Ecological Entomology*, 17 (4): 310-318.
- Bermejo, D. 1988. **Introducción a la Espectroscopía Raman**. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 80 pp.
- Bozzola, J. J. & L. D. Russell. 1992. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists**. Jones and Bartlett Publishers. Boston, MA. 542 pp.
- Bullock, S. H. 1988. Rasgos del Ambiente Físico y Biológico de Chamela. Jalisco, México. *Folia Entomol. Mex.*, 77: 5-17.
- Caetano, F. H. 1984. Morfologia comparada do trato digestivo de Formigas da Subfamilia Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). *Papéis Avulsos Zool., S. Paulo*, 35 (23): 257-305.
- Carvajal Moreno, R. y J. M. Vergara Cabrera. 1985. **La Alimentación del futuro**. Tomo I. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 284 pp.
- Cervantes Servín, L. 1988. Intercepción de lluvia por el dosel en una comunidad tropical. *Ingeniería Hidráulica en México III* (2): 38-42.
- , R. Domínguez, M. Maass. 1988. Relación lluvia-escurrimiento en un sistema pequeño de cuencas de Selva Baja Caducifolia. *Ingeniería Hidráulica en México III* (1): 30-41.
- Chapman, R. F. 1975. **The insects, structure and function. XII**. American Enselvier Publishing Company, Unc., New York. 819 pp.
- D'Esposito, L. & J. L. Koenig. 1978. Applications of Fourier Transform Infrared to synthetic Polymers and Biological Macromolecules in Ferraro, J.R. & L. J. Basile. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Application to Chemical System**. Vol. 1. Academy Press Inc. London. 311pp.

-
- DuBois, M. D. 1994. Checklist of Kansas Ants. *The Kansas School Naturalist*, 40 (2): 15 pp.
- Gibbs, A. & J. H. Crowe. 1991. Intra-individual variation in cuticular lipids studied using fourier transform infrared spectroscopy. *J. Insect Physiol.*, 37 (10): 743-748.
- Hölldobler, B. & E. O. Wilson. 1990. **The Ants**. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 732 pp.
- Huyghe, P. 1992. An Acquired Taste. *The Sciences*, 17: 8-11 pp.
- Jaffe, K. & H. Puche. 1984. Colony specific territorial marking with the metapleural gland secretion in the ant *Solenopsis germinata*. *J. Insect Physiol.*, 30: 265-270.
- & E. Pino. 1989. On chemical communication in the ant *Crematogaster sumichrasti* Mayr (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae). *Revta. bras. Ent.*, 33 (1): 149-155.
- Lehninger, A. L. 1983. **Bioquímica**. 2a. ed. Omega, Barcelona. 950 pp.
- MacKay, W. P. & E. MacKay. 1988. Clave de los géneros de hormigas en México (Hymenoptera: Formicidae). *Mem. II Simposio Nacional de Insectos Sociales*. Oaxtepec, Morelos. 1-82 pp.
- , F. Pérez-Domínguez, L. I. Valdez y P. Vielma- Orozco, 1984. La biología de *Crematogaster larreae* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Folia Entomol. Mex.*, 62: 75-80.
- Mercer, D. H. & M. S. C. Birbeck. 1966. **Electron Microscopy. A Hand book for Biologists**. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 102 pp.
- Millonig, G. 1976. **Laboratory Manual of Biological Electron Microscopy**. Mario Saviolo Ed. Vercelli, Italy. 67 pp.
- Nakamoto, K. 1986. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. Fourth Edition. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons Eds. New York. 484 pp.
- Nation, J. L. 1983. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, 58(6): 347-351.
- Perkins, W. D. 1986. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. Part I. Instrumentation. *J. Chem. Educ.*, 63(1): A5-A10.
-

- 1987. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Part II. Advantages of FT-IR. *J. Chem. Educ.*, 64(11): A269-A271.
- Pouchert, Ch. J. 1985. **The Aldrich Library of FT-IR Spectra**. Vol. I. Aldrich Chemical Company Inc. 960 pp.
- Powell, R. G., K. L. Mikolajczak, B. W. Zilkowski, H. S. M. Lu, E. K. Mantus & J. Clardy. 1991. Dithyrenitrile: An unusual insect antifeedant from *Dithyrea wislizenii*. *Experientia*, 47 (3): 304-306.
- Pretsch, E., T. Clerc, J. Seibl & W. Simon. 1980. **Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos**. Alhambra. Madrid, España. 307 pp.
- Quiroz, L. N. y L. M. P. Garduño. 1989. Algunos aspectos ecológicos de las hormigas del género *Crematogaster* Lund (Hymenoptera: Formicidae) en el estado de Morelos, México. *Mem. II Simposio Nacional de Insectos Sociales*. Oaxtepec, Morelos: 125-143.
- Ramos Elorduy de Conconi, J. 1982. **Los insectos como fuente de proteínas en el futuro**. Limusa. 143 pp.
- , J. M. Pino Moreno y O. González Meza. 1981. Digestibilidad in vitro de algunos insectos comestibles en México. *Folia Entomol. Mex.*, 49: 141-154.
- , R. Bourges y M. Pino. 1982. Valor nutritivo y calidad de proteína de algunos insectos comestibles de México. *Folia Entomol. Mex.*, 53: 111-118.
- Watkins II, J. F. 1988. The army ants (Formicidae: Ecitoninae) of the Chamela Biological Station in Jalisco, México. *Folia Entomol. Mex.*, 77: 379-393.
- Way, M. J. 1963. Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera. *Annual Review of Entomology*, 8: 307-344.
- Wilson, E. O. 1979. **The insect societies**. Fifth printing. The Belknap Press of Harvard Press Cambridge, Massachusetts and London, England. 540 pp.
- Yokoyama, I., Y. Miwa & K. Machida. 1991. Simulation of Raman Spectra of Formic Acid Monomer and Dimer in the Gaseous State by an Extended Molecular Mechanics Method. *J. Phys. Chem.*, 95: 9740- 9746.

APÉNDICE I

FORMALHEIDO AL 4% GLUTARALDEHIDO AL 1% EN BUFFER DE FOSFATOS.

Para 100 ml de fijador:

1.16 gr	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.27 gr	NaOH
86.00 ml	Agua destilada
10.00 ml	Formaldehido al 37% o 40%
4.00 ml	Glutaraldehido al 25%
6	
2.00 ml	Glutaraldehido al 50%

USAR 86 ml de agua destilada cuando se usa glutaraldehido al 25% ó 88 ml de agua destilada cuando se usa glutaraldehido al 50%

pH final =7.2

BUFFER DE FOSFATO DE SODIO.

Solución A = 0.2 M de solución de fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.8 gr en 1000 cc de H_2O bidestilada.

Solución B = 0.2 M de solución de fosfatos dibásicos de sodio. Si el reactivo es ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 53.65 gr en 1000 cc de agua bidestilada. Si el reactivo es ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) 71.7 gr en 1000 cc de agua bidestilada.

Para preparar 100 ml de solución A :

2.78 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Para preparar 250 ml de solución B:

13.41 gr de $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

MEZCLA.

X ml de solución A y z ml de solución B aforadas a un total de 200 ml para dar el pH indicado y la molaridad de 0.1 M.

Ax (ml)	Bz (ml)	pH
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
13.0	87.0	7.5
8.5	91.5	7.6
5.3	94.0 (94.7)	8.0

Cuando se trabaja con osmio no es necesario aforar. Se diluye el buffer con el osmio y se obtiene la molaridad de 0.1

BUFFER DE CACODILATOS AL 0.1 M pH= 7.4

Solución A: 0.2 M de cacodilato de sodio.
42.8 gr en 1000 ml de agua bidestilada.

Solución B: 0.2 M de solución de HCl.

MEZCLA:

50 ml de Solución A y x ml de solución B quedando así al 0.2M.
Aforar a un total de 200 ml con agua bidestilada quedando 0.1M.

Bx (ml)	pH
2.7	7.4
4.2	7.2
6.3	7.0
9.3	6.8
13.3	6.6
18.3	6.4
23.3	6.2

ACETATO DE URANILO (PARA CONTRASTAR)

Pesar 200 mg de acetato de uranilo y agregar 10 cc de agua destilada.

PREPARACION DE RESINA EPON

10.8 ml	Epon
10.8 ml	DSSA (Anhidrido Dodecenyl Succinico)
3.5 ml	NMA (Anhidrido Metil Neadico)
0.75 ml	DMP {2-4-6 (Dimetil-aminometil) fenol}

Mezclar perfectamente quedando una mezcla de resina semi-dura.

AZUL DE TOLOUIDINA

Pesar 1 gr de azul de toluidina por cada 100 ml de tetraborato de sodio al 5% ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$).

Se pone a calentar el tetraborato hasta disolución y se agrega el azul de toluidina poco a poco, continuando con el calentamiento.

CITRATO DE PLOMO Y SODIO

1.

H ₂ O destilada	10 ml
Citrato de plomo	0.01-0.04 g
NaOH 10N (=40%)	0.1 ml

Agitar en un tubo hasta disolver.

2.

H ₂ O destilada	30 ml
Nitrato de plomo	1.33 g
Citrato de sodio (NaC ₆ H ₆ O ₇ · H ₂ O)	1.76 g

Preparar en un matraz Erlenmeyer de 50 ml mezclando a intervalos, por 30 min.

NaOH 1N (=4%)	8 ml
---------------	------

Mezclar hasta disolver completamente

3.

H ₂ O destilada	12 ml
----------------------------	-------

NaOH 1N (=4%)	4.0 ml
Citrato de plomo	0.1 g

Disolver

H ₂ O (destilada)	36.0 ml
------------------------------	---------

FIJADOR DE KARNOSKY.

En un matraz de 125 ml poner 25 cc de H₂O bidestilada.

En la platina magnética calentar a 60°C. Agitación moderada con un imán magnético.

Agregar 2 gr de Parafomaldehido. Cuando el vapor se observa en las partes superiores de las paredes del matraz, se agrega de 2 a 4 gotas de NaOH 1N hasta que se aclare completamente (no poner más de 4 gotas).

Enfriar el fondo del matraz con agua corriente por unos 2 min, agregar 20 ml de buffer de cacodilato de sodio 0.2M pH 2.4, 5 ml de glutaraldehído al 50% frío. Agregar 25 mg de CaCl_2 . Se toma el pH de la solución que debe ser de 7.2 a 7.4.

Se ajusta en tal caso con CaCl_2 si es alcalino y con NaOH si es ácido. Aforar para tener un volumen final de 50 ml.

Agregar 50 ml de buffer de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4.

TETRAÓXIDO DE OSMIO.

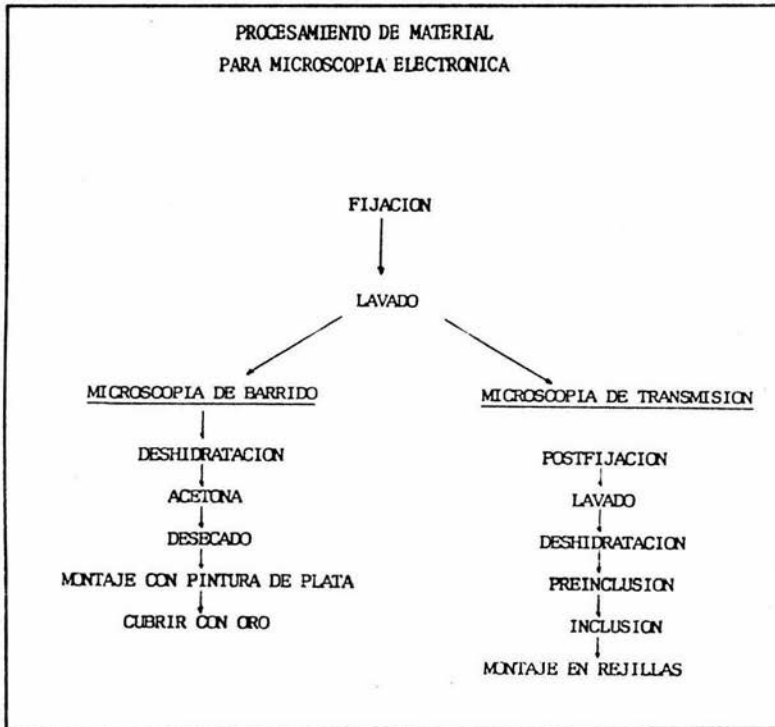
Se lava la cápsula de osmio (1 gr) con agua corriente hasta quitar la etiqueta, se seca la ampollita y en la parte central se marca con un lápiz diamante, posteriormente se pone en un frasco ámbar, agitando fuertemente hasta que se rompa la ampollita, se agregan 50 cc de H_2O bidestilada.

Para preparar este fijador es indispensable que todas las maniobras se lleven a cabo en la campana de extracción, ya que los vapores de este reactivo son nocivos.

Se deja toda la noche la solución para que se disuelvan bien los cristales de OsO_4 .

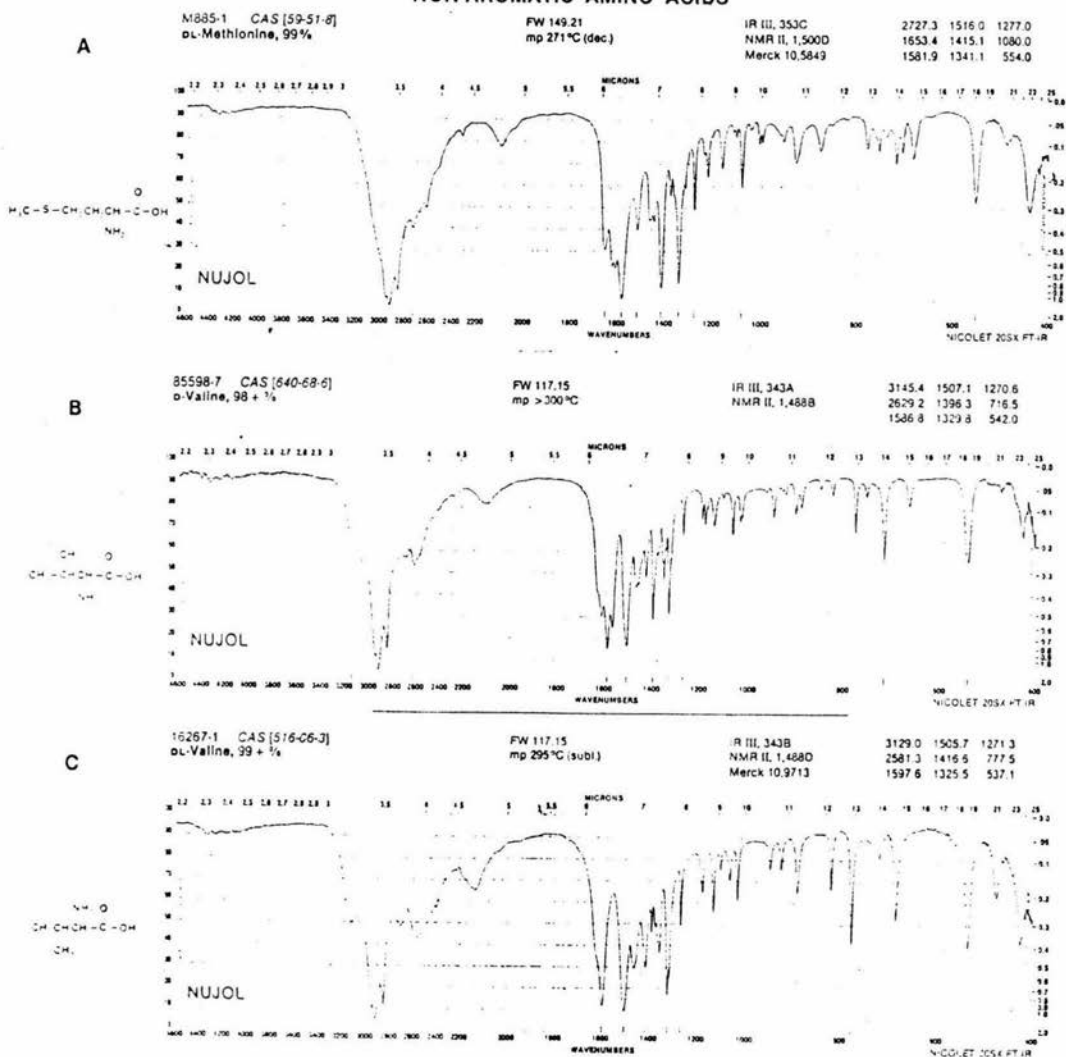
Se forra el frasco con papel aluminio. La concentración final de esta solución es del 2%.

MÉTODO GENERAL DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA.



ESPECTROS EN INFRARROJO DE AMINOÁCIDOS PUROS TOMADOS DE Pouchert, 1985.

NON-AROMATIC AMINO ACIDS



NON-AROMATIC AMINO ACIDS

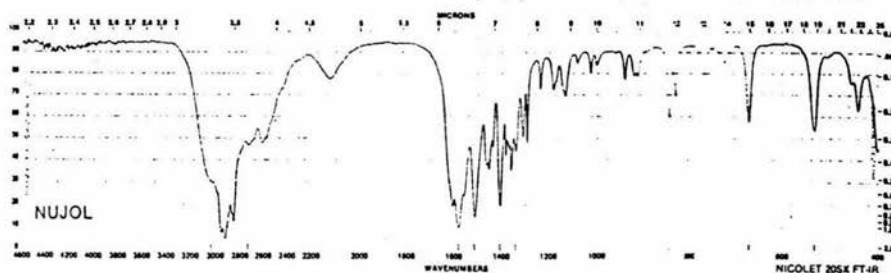
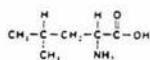
A

85544-8 CAS [328-38-1]
D-Leucine

FW 131.18
mp >300°C

IR III, 343H
NMR II, 1.489A

3029.1	1513.8	847.3
2734.7	1407.9	669.2
1582.1	1343.2	534.5



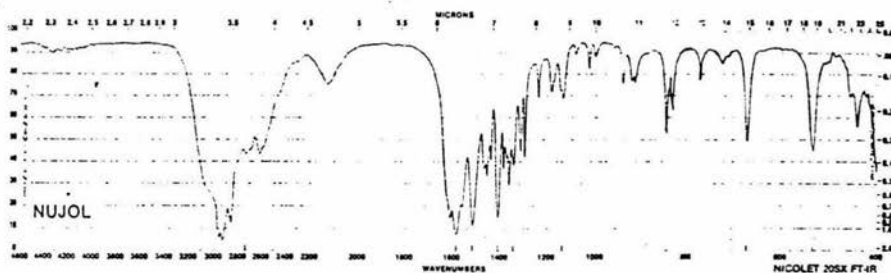
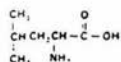
B

L50-2 CAS [61-90-5]
L-Leucine, 99%

FW 131.18
mp >300°C

IR III, 344A
NMR II, 1.425B
Merck 10.5258

2735.1	1407.8	847.4
1582.2	1343.4	669.2
1513.8	1136.6	534.2



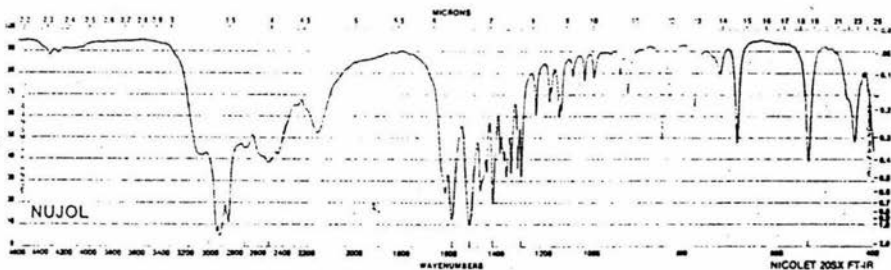
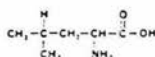
C

16272-8 CAS [328-39-2]
DL-Leucine, 99+ %

FW 131.18
mp 293°C (subl.)

IR III, 344B
Merck 10.5258

3019.2	1587.4	1296.2
2719.0	1513.1	849.0
2513.5	1415.5	537.3



NON-AROMATIC AMINO ACIDS

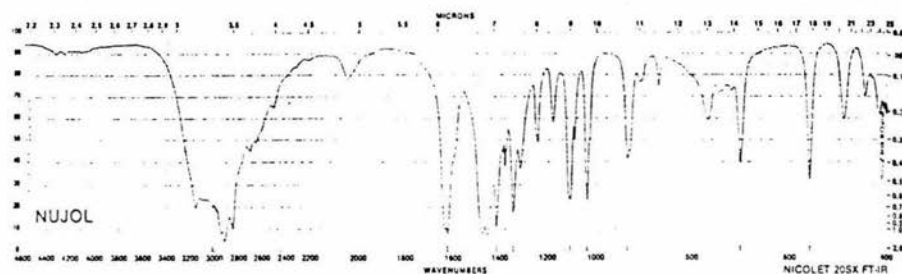
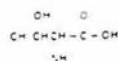
T3422-3 CAS [6028-28-0]
DL-Threonine

FW 119.12
mp 244°C (dec)

IR III, 346G
NMR II, 1.492C
Merck 10.9229

3026.3	1347.4	936.3
1626.5	1111.8	702.9
1417.7	1041.3	560.9

A



NON-AROMATIC AMINO ACIDS

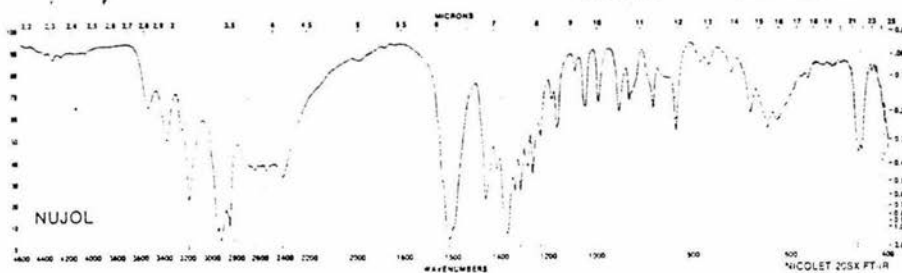
17182-4 CAS [609-36-9]
DL-Proline, 99%

FW 115.13
mp 208°C (dec)

IR III, 347H
NMR II, 1.504A
Merck 10.7585

3191.8	1614.8	1235.2
2646.4	1415.3	835.2
2416.1	1317.2	461.7

A



NON-AROMATIC AMINO ACIDS

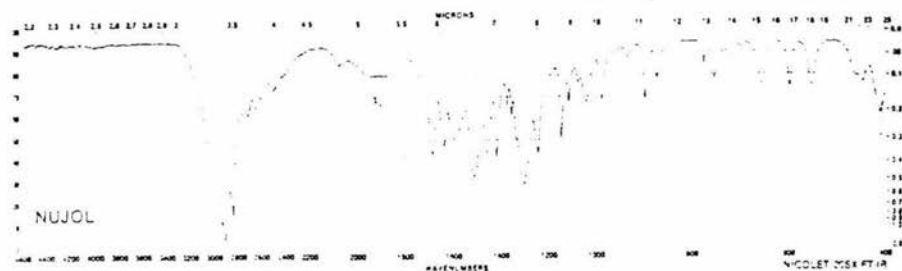
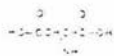
21909-6 CAS [1783-96-6]
D-Aspartic acid, 99 + %

FW 133.10
mp >300°C

IR III, 350G
NMR II, 1.456D
Merck 10.853

3008.8	1602.9	1310.1
2734.9	1517.3	1249.4
1691.5	1421.9	1153.1

A

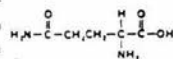
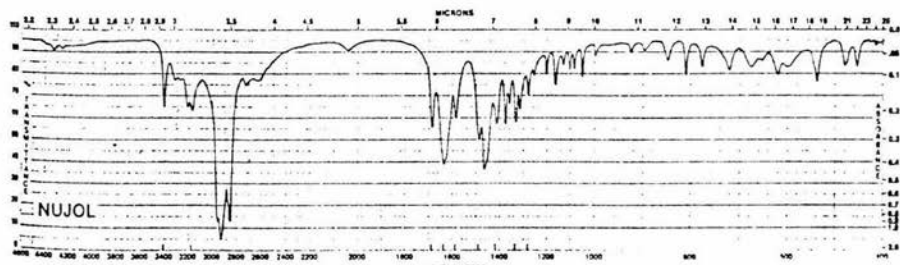


G320-2 CAS [56-85-9]
L-Glutamine, 99%

FW 146.15
mp 185°C (dec)

IR III, 463D
Merck 10,4332

3406.5 1637.3 1416.8
3173.7 1586.5 1334.1
1687.8 1488.3 1281.7



D

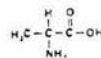
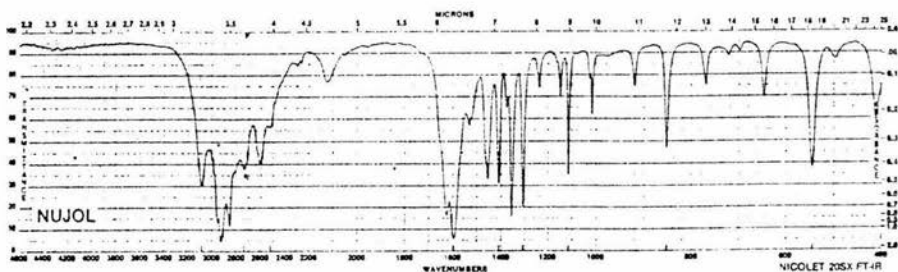


13522-4 CAS [302-72-7]
DL-Alanine, 99%

FW 89.09
mp 289°C (dec)

IR III, 341F
Merck 10,190

3083.8 1593.6 1115.3
2735.3 1410.2 852.0
2522.1 1308.3 545.4



D



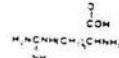
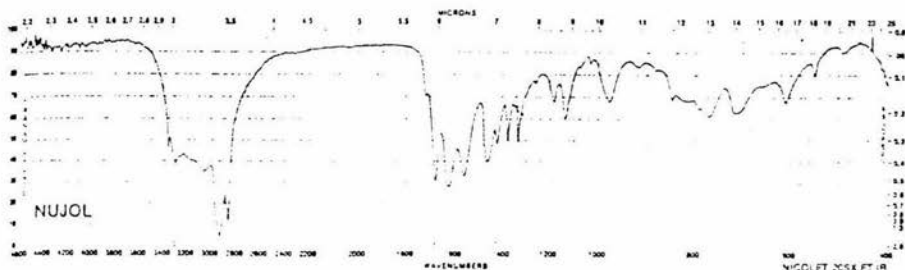
NON-AROMATIC AMIDES

A9240-6 CAS [74-79-3]
L-Arginine, 98 + %

FW 174.20
mp 223°C (dec)

IR III, 465H
NMR II, 1,859B
Merck 10,797

3297.8 1618.0 1332.7
3059.6 1557.7 1138.4
1677.1 1421.4 772.2



A